

**Exposição crônica ao chumbo aumenta a reatividade vascular através de mecanismos dependentes do estresse oxidativo e da ciclooxigenase-2: ativação da via das MAPKs**

**Maylla Ronacher Simões**

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas  
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, março de 2015

# **Exposição crônica ao chumbo aumenta a reatividade vascular através de mecanismos dependentes do estresse oxidativo e da ciclooxigenase-2: ativação da via das MAPKs**

Maylla Ronacher Simões

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 06/03/2015 por:

---

Prof. Dr<sup>o</sup>. Dalton Valentim Vassallo – Orientador, UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mercedes Salaíces – Orientadora no exterior, UAM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon – UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde - UFES

---

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira - UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virgínia Soares Lemos - UFMG

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon – UFES

Coordenador do PPGCF, UFES

**Simões, Maylla Ronacher, 1986**

**Exposição crônica ao chumbo aumenta a reatividade vascular através de mecanismos dependentes do estresse oxidativo e da ciclooxigenase-2: ativação da via das MAPKs.** [Vitória] 2015

173 p., 29,7 cm (UFES, D. SC., Ciências Fisiológicas, 2015)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Exposição ao chumbo; 2. Via das MAPKs; 3. Estresse oxidativo; 4. Ciclooxigenase-2; 5. Reatividade vascular; 6. Pressão arterial.

Dedico esta tese de doutorado à minha família que amo profundamente. O apoio de vocês me possibilitou realizar esse sonho.

Obrigada Luiz, Ivete, Rakel e Rahone.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, guiando meus passos e mostrando o caminho por onde seguir. Obrigada Senhor por me permitir realizar este trabalho.

Aos meus pais, Luiz e Ivete, por todo amor e incentivo. Pela força dada durante todos os momentos. Agradeço a minha irmã Rakel, por existir na minha vida e comemorar comigo cada vitória. Também ao meu noivo Rahone que esteve ao meu lado todos os dias desta caminhada. Seu apoio foi essencial. E aos demais familiares e amigos, que compartilham sempre da minha felicidade.

Ao Prof. Dr. Dalton, meu querido Chefe, por guiar meus caminhos profissionais desde o mestrado, oferecendo-me sua orientação, confiança e amizade; pelas conversas motivadoras que me fizeram acreditar que tudo seria possível e assim seguir adiante em todos os momentos de incerteza e por acreditar em mim sempre.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mercedes, por acogerme tan bien em Madrid, por la oportunidad de hacer mi doctorado sándwich com usted, por toda la orientación que me ha dado aquí en Brasil y sobre todo en España duraten la ejecución y el desarrollo de esto trabajo; por siempre estar involucrado en mi vida profesional y sobre todo por su amistad.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Jesús Alonso por la ayuda en todos los momentos allí en España y aquí en Brasil, por su amistad y apoyo científico. Muchas gracias!

Aos professores do nosso laboratório: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>Ivanita, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Leonardo e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Frizera, obrigada por todo apoio, ensinamentos e opiniões. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento.

À Rose, por toda ajuda e orientação, dadas de coração nesses dois últimos anos de doutorado.

Aos queridos companheiros de laboratório (LEMC): Aurélia, Carol, Cindy, David, Dieli, Emilia, Emily, Fabiana Siman, Fabiana Simões, Gilson, Kamila, Kelly, Marito, Paula, Renata, Rogério, Sâmia, Teca, Tati, Thaís, Thiago e Vinícius.

Gracias a las queridas compañeras del L4/UAM: Ana, Andrea, Laura, Marisol, Olga, Rosa y Sonia. A todos de los otros laboratorios de la UAM, que he trabajado durante todo el año. Graciás también a Angela, Raquel y Roberto que siempre estuvieron

presente para me ensinarem todo com presteza, atención y paciencia. Também a Javier, Laura y Ana García por los momentos de gracia en la hora de la comida.

À Bruna e Priscila, que embarcaram comigo numa experiência ímpar para o exterior. Vocês foram minha base e força para enfrentar a distância e a saudade. Sem vocês jamais teria conseguido. Bruna, obrigada por todos esses anos de amizade e parceria, você é uma amiga muito querida. Pri, obrigada pelo apoio e amizade ao longo destes anos em especial pela amizade infalível que me concedeu em Madrid. Agradeço também por nossas viagens inesquecíveis! Foram muitas aventuras e momentos especiais, que me trouxeram alegria e força para continuar. Muito obrigada meninas!

Às amigas Mirian e Lorena, pelo apoio durante toda esta caminhada e pelos momentos inesquecíveis que vivemos aqui e em Madrid. Vocês foram referências na minha vida.

À Edna, obrigada por sua alegria contagiante, pela amizade e companheirismo. Obrigada pelos dias de experimentos mais divertidos.

À Jonaina, por compartilhar comigo sua amizade, aprendizagem e todos os momentos vividos nestes 7 anos de LEMC.

À Karol Zuqui e Cindy, obrigada pela amizade, convívio, cuidado e pelos adoráveis momentos de risos.

Aos amigos, Luciana Passamani e Patrick pelo apoio nos momentos difíceis e pelos ótimos momentos vividos no exterior.

Aos queridos companheiros do PPGCF / UFES, pela amizade e companhia dentro e fora da universidade.

Aos demais professores do PPGCF / UFES, pela contribuição em minha formação.

Aos funcionários do PPGCF / UFES, pelos serviços prestados.

A todos los funcionarios de la UAM.

Àqueles que me esqueci de mencionar, agradeço pelo apoio.

À CAPES, CNPq e à FAPES/FUNCITEC, pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>30</b>
1.1 O CHUMBO .....	30
1.2 FONTES DE EXPOSIÇÃO E UTILIZAÇÃO .....	30
1.3 CINÉTICA DO CHUMBO NO ORGANISMO.....	33
1.4 EFEITOS DO CHUMBO NOS DIVERSOS ÓRGÃOS E SISTEMAS .....	34
1.5 EFEITOS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	36
1.6 TÔNUS VASCULAR E SUA REGULAÇÃO .....	39
<b>1.6.1 Óxido Nítrico</b> .....	<b>41</b>
<b>1.6.2 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)</b> .....	<b>43</b>
<b>1.6.3 Prostanóides</b> .....	<b>44</b>
<b>1.6.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)</b> .....	<b>47</b>
<b>1.6.5 Relação recíproca entre espécies reativas de oxigênio e prostanóides..</b> .....	<b>51</b>
1.7 PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS - MAPK .....	52
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>57</b>
2.1 OJETIVO GERAL.....	57
2.2 OJETIVO ESPECÍFICO .....	57
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>60</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	60
<b>3.1.1 Dosagem do chumbo sanguíneo</b> .....	<b>60</b>
<b>3.1.2 Avaliação da pressão arterial sistólica</b> .....	<b>61</b>
<b>3.1.3 Avaliação do peso corporal e hipertrofia</b> .....	<b>61</b>
3.2 REATIVIDADE VASCULAR .....	62
<b>3.2.1 Avaliação da função vascular - Aorta</b> .....	<b>62</b>
<b>3.2.1.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular</b> .....	<b>63</b>
<b>3.2.1.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio</b> .....	<b>64</b>
<b>3.2.2 Avaliação da função vascular - Artéria mesentérica</b> .....	<b>65</b>
<b>3.2.2.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular</b> .....	<b>67</b>
<b>3.2.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio</b> .....	<b>67</b>
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS – REATIVIDADE VASCULAR .....	68

3.3.1 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a resposta constritora à fenilefrina, dilatadora a acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em artérias aorta e mesentérica de ratos. ....	68
3.3.2 Efeito do tratamento por 30 dias com acetato de chumbo sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	69
3.3.3 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos nos efeitos do tratamento por 30 dias com acetato de chumbo sobre a resposta à fenilefrina .....	70
3.3.3.1 Influência do tratamento por 30 dias com acetato de chumbo na via do óxido nítrico.....	71
3.3.3.2 Influência do tratamento por 30 dias com acetato de chumbo sobre os radicais livres na resposta contrátil à fenilefrina. ....	71
3.3.3.3 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico no tratamento por 30 dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina. ....	71
3.4 CULTURA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA .....	72
3.4.1 Obtenção das células musculares lisas vasculares.....	72
3.4.2 Crescimento das culturas primárias de células de músculo liso.....	73
3.4.3 Caracterização das células de músculo liso vascular .....	74
3.4.4 Protocolos experimentais em células de músculo liso vascular. ....	75
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO .....	77
3.6 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO .....	79
3.7 ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE .....	81
3.8 EXPRESSÃO PROTEICA PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT .....	82
3.9 MIGRAÇÃO CELULAR .....	86
3.10 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	87
3.11 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	89
3.12 FÁRMACOS, REAGENTES e ANTICORPOS .....	90
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>95</b>
4.1 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO.....	95
4.2 PESO CORPORAL .....	95
4.3 PESO DO CORAÇÃO E O CRESCIMENTO ÓSSEO DE RATOS .....	95
4.4 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	95
4.5 EXPERIMENTOS COM AORTA E ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA .....	96



4.5.1 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil ao cloreto de potássio em artérias aorta e mesentéricas de ratos.....	96
4.5.2 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil a fenilefrina.....	97
4.5.3 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	98
4.5.4 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	99
4.5.5 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	101
4.5.5.1 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a produção vascular de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	103
4.5.5.2 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a expressão protéica da gp91phox, Cu/ZnSOD e MnSOD.....	104
4.5.6 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina.....	105
4.5.6.1 Expressão proteica da isoforma constitutiva da ciclooxigenase (COX-2).....	107
4.5.7 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) em aorta e artéria mesentérica.....	109
4.6 RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE CULTURA DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.....	112
4.6.1 Efeitos da exposição ao acetato de chumbo sobre a viabilidade celular de células musculares lisas vasculares.....	112
4.6.2 Efeitos da exposição ao acetato de chumbo na produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em células musculares lisas.....	113
4.6.3 Efeitos do chumbo sobre a expressão gênica de NOX1 e NOX4 em células musculares lisas.....	115
4.6.4 Efeitos do chumbo sobre a expressão proteica das isoformas da SOD em células musculares lisas.....	116

4.6.5 Efeitos do chumbo sobre a expressão gênica e proteica de COX-2 e COX-1 em células musculares lisas.....	117
4.6.6 Via de sinalização das MAPK está envolvida no aumento dos níveis de RNAm de NOX e COX-2 induzido pelo chumbo.....	118
4.6.7 Efeitos do chumbo sobre a migração e proliferação de células musculares lisas.....	121
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>124</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO.....	124
5.2 EFEITO DO CHUMBO NO COMPORTAMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E SOBRE PARÂMETROS PONDERAIS .....	125
5.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR 30 DIAS A BAIXA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO EM ARTÉRIAS AORTA E MESENTÉRICA .....	126
5.3.1 Efeitos do chumbo sobre a resposta vascular a fenilefrina e o papel do endotélio .....	127
5.3.2 Efeito da exposição por 30 dias ao chumbo sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio .....	129
5.3.3 Efeitos da exposição por 30 dias ao chumbo sobre a biodisponibilidade do óxido nítrico em anéis de aorta torácica e de artérias mesentéricas de ratos.....	130
5.3.4 O papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos efeitos do chumbo sobre a reatividade vascular em artérias aortas e mesentéricas de ratos.....	133
5.3.5 O papel dos prostanóides derivados da ciclooxigenase (COX) no efeito do chumbo sobre a reatividade vascular em artérias aortas e mesentéricas de ratos.....	135
5.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ACETATO DE CHUMBO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS EXPLANTADAS DE AORTA DE RATOS.....	138
<b>6 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>143</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>145</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>176</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Valores do peso corporal (g) dos animais do grupos Controle (Ct) e chumbo (Pb).....95

**Tabela 2:** Valores de pD2 e de resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artéria aorta de ratos controle e chumbo nas condições: controle, sem endotélio (E-) e após incubação com L-NAME, apocinina, Indometacina .....108

**Tabela 3:** Valores de pD2 e resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e chumbo nas condições: controle, sem endotélio (E-) e após incubação com L-NAME, apocinina, SOD, Indometacina, SC-19220 .....109

**Tabela 4:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade (pD2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta e mesentérica intactos de animais controle (ACh Ct) e tratados por 30 dias com chumbo (ACh Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com a fenilefrina.....110

**Tabela 5:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade (pD2) induzidas pelo nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta e mesentérica intactos de animais controle (NPS Ct) e tratados por 30 dias com chumbo (NPS Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com a fenilefrina.....111

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura I:** Mecanismos de relaxamento induzidos pelo óxido nítrico. CML: célula muscular lisa; CGs: guanilato ciclase solúvel; GTP: 5`-trifosfato de guanossina; IP3: 1,4,5-trifosfato de inositol; MLCK: quinase de cadeia leve da miosina; MLCK-P: quinase de cadeia leve da miosina fosforilada; NO: óxido nítrico; PKG: proteína quinase G; SERCA: Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático.....42
- Figura II:** Síntese de prostanóides e mecanismos de sinalização. AA: ácido araquidônico; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; CML: célula muscular lisa; COX: ciclooxigenase; PLA2: fosfolipase A2; PLC: fosfolipase C.....45
- Figura III:** Expressão celular das isoformas da NADPH oxidase na parede do vaso sanguíneo. Conformação das isoformas NOX-1 e NOX-4 da NADPH oxidase. A) Localização celular (células endoteliais, célula do músculo liso vascular, fibroblastos, macrófagos e células T) das isoformas da NADPH oxidase (NOX-1, NOX-2, NOX-4 e NOX-5) através da seção transversal de uma artéria; B) Localização das isoformas da NADPH oxidase em cada uma das suas possíveis localizações intracelulares (Drummond et al., 2011).....50
- Figura IV:** Aorta torácica, de rato Wistar, imersa em solução fria de Krebs-Henseleit, após a remoção do tecido conectivo e adiposo, sendo dividida em segmentos de 4 mm (modificado de Fiorim, 2011).....62
- Figura V:** Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular in vitro (adaptado de Silveira, 2010).....63
- Figura VI:** Registro com curvas representativas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. Teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min com força basal de 1,5 gramas); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Contração induzida pelo KCl (75 mM);

G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Contração com fenilefrina 1 $\mu$ M; J) Contração induzida pela fenilefrina; K) Adição de acetilcolina 10 $\mu$ M. O tempo foi registrado em minutos, representado no eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força registrada em gramas (g), observada no eixo vertical. (Dias, 2011).....	65
<b>Figura VII:</b> Fotografia do leito mesentérico mostrando as artérias com suas ramificações.....	66
<b>Figura VIII:</b> Esquema representativo do miógrafo de arame onde foram realizados os experimentos de reatividade vascular.....	67
<b>Figura IX:</b> Esquema geral representativo de protocolo experimental realizado para avaliar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos. ACh=acetilcolina (adaptado de Wiggers, 2008).....	68
<b>Figura X:</b> Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10 <sup>-10</sup> a 3x10 <sup>-4</sup> M) (adaptado Batista, 2009).....	70
<b>Figura XI:</b> Fotografia de CMLV em que aparece as fibras de $\alpha$ -actina (verde).....	75
<b>Figura XII:</b> Esquema representativo do protocolo experimental utilizado em cultura de células de músculo liso de aorta.....	76
<b>Figura XIII:</b> Protocolo para mensuração da produção de ânion superóxido pela técnica de dihidroetídeo (DHE) (Adaptado de Batista, 2014).....	80
<b>Figura XIV:</b> Esquema do protocolo de migração celular (método Wound Healing): A) ferida feita com ponta de pipeta P10; B) desenho, por fora da placa, da linha perpendicular à ferida; C) local da foto no tempo zero, antes dos estímulos; D) condição controle; E) condição estimulada com acetato de chumbo. (Adaptado de Batista, 2014).....	87
<b>Figura 1:</b> Valores da pressão arterial sistólica (PAS) obtidos por meio da pletismografia de cauda em ratos dos grupos controle (Ct) e chumbo (Pb) durante quatro semanas de tratamento. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA (duas vias), P<0, 05.....	96

**Figura 2:** Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em segmentos de artéria aorta torácica e artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos dos grupos controle (Ct) e chumbo (Pb). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 70mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e da sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste *t* não pareado: \* $P < 0,05$ , Ct vs Pb.....97

**Figura 3:** Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina, em segmentos de artéria aorta torácica (A-B) e artérias mesentéricas de resistência (D-E) de ratos controle (Ct) (A-D) e chumbo (Pb) (B-E). Em C e F, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em aorta e artéria mesentérica, respectivamente, de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAAC foi utilizado o Teste *t* não pareado. \* $P < 0,05$  E+ vs E-; & $P < 0,05$  Ct vs Pb.....99

**Figura 4:** Efeito do L-NAME (100  $\mu$ M), inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta e artérias mesentérica de resistência de ratos dos grupos controle (Ct) (A-D) e tratados com chumbo (Pb) (B-E). Em C e F, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em aorta e artéria mesentérica, respectivamente, de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAAC foi utilizado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  Ct/Pb vs L-NAME. & $P < 0,05$  Ct vs Pb..... 100

**Figura 5:** Efeito do inibidor da NADPH oxidase, Apocinina, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artéria aorta torácica e mesentérica de ratos dos grupos controle (Ct) (A-D) e chumbo (Pb) (B-E). Em C, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em aorta de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{máx}$ ) e sensibilidade (pD2) e dAAC foi utilizado o Teste-t não pareado. \* $P < 0,05$  Ct/Pb vs Apocinina. & $P < 0,05$  Ct vs Pb.....102

**Figura 6:** Efeito da superóxido dismutase - SOD (150 U/mL) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos controle (Ct) (A) chumbo (Pb) (B). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{máx}$ ) e sensibilidade (pD2) foi utilizado o Teste-t não pareado. \* $P < 0,05$  Pb vs SOD.....103

**Figura 7:** Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em cortes transversais de anéis de aorta de ratos controle (painel à esquerda) e chumbo (painel à direita). O gráfico representa a Intensidade de Fluorescência em unidade arbitrária (UA) emitida por DHE nos dois grupos experimentais. Os resultados (média ± EPM). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado.\* $P < 0,05$ . Aumento de 40x para fotografar.....104

**Figura 8:** Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica da gp91phox e de duas isoformas da superóxido dismutase (SOD) de aorta de ratos controle (Ct) e chumbo (Pb). (A) gp91phox, (B) SOD-CuZn e (C) SOD-Mn. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão de gp91phox, SOD-CuZn, SOD-Mn e da  $\alpha$ -actina. Os resultados (média ± EPM) estão mostrados como expressão proteica da gp91phox, SOD-CuZn e SOD-Mn em relação à  $\alpha$ -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct.....105

**Figura 9:** Efeitos da indometacina (10  $\mu$ M), inibidor inespecífico da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de aorta e artérias mesentéricas de ratos dos grupos controle (Ct) (A-C) e chumbo (Pb) (B-D). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) foi utilizado o Teste-t não pareado. \*  $P < 0,05$  Ct/Pb vs Indometacina. &  $P < 0,05$  Ct vs Pb.....106

**Figura 10:** Efeitos do antagonista de receptor de prostaglandina (EP1) (10  $\mu$ M), sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos controle (Ct) (A) e chumbo (Pb) (B). Os resultados (Média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste-t não pareado. \*  $P < 0,05$  Ct vs SC-19220.....107

**Figura 11:** Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica da isoforma constitutiva da ciclooxigenase (COX-2) em aorta torácica e artéria mesentérica de ratos dos grupos controle (Ct) e chumbo (Pb). (A) COX-2-aorta, (B) COX-2-mesentérica. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da COX-2 e da  $\alpha$ -actina de ambos os grupos. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da COX-2 e da  $\alpha$ -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. \*  $P < 0,05$  vs Ct.....108

**Figura 12:** Resposta dilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artéria aorta (A) e artéria mesentérica (B) de ratos dos grupos controle e chumbo. Os resultados (Média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração à FE. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e da sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste-t não pareado. \*  $P < 0,05$  vs Ct.....110



**Figura 13:** Resposta dilatadora induzida pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em segmentos de artéria aorta (A) e artéria mesentérica (B) de ratos dos grupos controle e chumbo. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à FE. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{máx}$ ) e da sensibilidade (pD2) foi utilizado o Teste-t não pareado.....111

**Figura 14:** Efeito do acetato de chumbo na viabilidade das células do músculo liso de aorta de rato. As CMLVs foram cultivadas em meio de crescimento celular e depois foram tratadas com diferentes concentrações de chumbo (10, 20 e 100 µg/dL) durante 48 h. A porcentagem de sobrevivência das células foi avaliada pelo método de MTT. Resultados (média ± EPM) apresentados como valores relativos comparados ao controle (100%). Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.....112

**Figura 15:** Efeitos do chumbo (20 µg/dL) por 48 horas na produção de ânions superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ) em CMLVs, na presença ou ausência de mito-TEMPO (5 µmol/L) e Tempol (10 µmol/L). Na parte superior, encontram-se microfotografias representativas da fluorescência emitida pelo dihidroetídeo (DHE) em CMLVs em situação controle, exposta ao chumbo e expostas ao chumbo na presença de mito-TEMPO e Tempol. O gráfico representa a intensidade de fluorescência em unidade arbitrária (UA) emitida por DHE. Os resultados estão expressos em média ± EPM. \*P<0,05 vs Ct, &P< 0,05 vs Pb. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.....114

**Figura 16:** Efeitos do chumbo (20 µg/dL, 48h) sobre a atividade enzimática da NADPH oxidase em CMLVs, na presença ou ausência de ML 171 (0.5 µmol/L), Tempol (10 µmol/L), Celecoxib (10 µmol/L), Rofecoxib (10 µmol/L). Resultados (média ± EPM) expressados como Unidades Relativas de Luz (URL) comparada ao controle (1). \*P<0,05 vs Ct, &P<0,05 vs Pb. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.....115

**Figura 17:** Efeitos do chumbo (20 µg/dL) sobre os níveis de RNAm de NOX1 e NOX4 em CMLVs, na presença e na ausência de celecoxib e rofecoxib. Resultados (média ± EPM) expressados como Unidades Relativas de Luz (URL) comparada ao controle (1). \*p < 0,05 vs Ct, &p < 0,05 vs Pb. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.....116

**Figura 18:** Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica das isoformas da superóxido dismutase (SOD) em CMLVs. (A) SOD-Mn, (B) SOD-CuZn e (C) SOD-EC. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão de SOD-Mn, SOD-CuZn, SOD-EC e da β-actina em células com e sem estímulo. Os resultados (média ± EPM) estão mostrados como expressão proteica da SOD-Mn, SOD-Cu/Zn e SOD-EC em relação à β-actina. . Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. \*P<0,05 vs Ct.....117

**Figura 19:** A: Efeitos do chumbo (20 µg/dL) sobre os níveis de RNAm de COX-2 em CMLVs, na presença e na ausência de Tempol (10 µmol/L). B: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica das isoformas indusível e constitutiva da ciclooxigenase (COX-2) em CVLMs. (B) COX-2, (B) COX-1. Resultados (média ± EPM) expressados como Unidades Relativas de Luz (URL) comparada ao controle (1) e mostrados como expressão proteica da COX-2 e COX-1 em relação à β-actina. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses. Para análise comparativa foi usado ANOVA uma-via e pós-teste de Tukey e Teste-t não pareado. \*P<0,05 vs Ct. &P<0,05 vs Pb.....118

**Figura 20:** Chumbo induz a fosforilação das MAPKs ERK1/2 e p38. Efeitos do chumbo sobre a ativação de (A) ERK1/2, (B) p-38 MAPK, (C) JNK e (D) Akt em CMLVs. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão das MAPKs ERK1/2, p-38, JNK e da Akt nos tempos de exposição ao chumbo. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como a razão entre MAPK fosforilada e o total da MAPK e normalizados para os valores obtidos em células controles não estimuladas. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses. Para análise comparativa foi usado ANOVA uma-via seguida por teste Tukey. \*P<0.05 vs Ct (0).....119

**Figura 21:** Participação da MAPKs na modulação de COX-2 e produção de EROs. Efeitos de U0126 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) e SB203580 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) sobre a expressão de RNAm de (A) NOX-1, (B) NOX-4 e (C) COX-2 induzida por chumbo em CMLVs. Resultados (média  $\pm$  EPM) expressados como Unidades Relativas de Luz (URL) comparada ao controle (1). \* $P < 0.05$  vs Ct, & $P < 0.05$  vs Pb. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.....120

**Figura 22:** Efeitos do acetato de chumbo (20  $\mu\text{g/dL}$ , 24 h) na migração celular de CMLVs. Fotos capturadas com auxílio de microscópio invertido, no tempo zero e após 24 horas de estímulo com o chumbo. Resultados (média  $\pm$  EPM) apresentados como valores relativos comparados ao controle (1). Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.....122

**Figura 23:** Efeito do acetato de chumbo (20  $\mu\text{g/dL}$ ) por 48 h sobre a proliferação celular de CMLVs. Resultados (média  $\pm$  EPM) apresentados como valores relativos comparados ao controle (1). Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.....122

**Figura 24:** Sumarização esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. A exposição ao chumbo, em baixas concentrações, ativa vias de sinalização das MAPKs (ERK1/2 e p38) que resultam na ativação da ciclooxygenase e-2 (COX-2) e da NOX1 e NOX4, subunidades da NADPH oxidase, que atuam em conjunto para produzir as alterações vasculares que podem contribuir para a ocorrência de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares. EROs: espécies reativas de oxigênio, CMLV: células musculares lisas vasculares.....143

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem

(E-) - Endotélio removido mecanicamente

(E+) - Endotélio íntegro

(i.p.) - Intraperitoneal

(i.m.) - Intraperitoneal

(OH<sup>·</sup>) - radicais hidroxil

°C - Graus Celsius

5-HT - serotonina

AA - Ácido Araquidônico

AAC - Áreas Abaixo da Curva

ACh - Acetilcolina

ADP - Adenosina difosfato

ALAD - Ácido δ-amino Levulínico Dehidratase

Apo - Apocinina

APS - persulfato amônico

ATP - Adenosina Trifosfato

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BH4 - tetrahidropterina

CMLVs – células musculares lisas vasculares

COX - Ciclooxygenase

COX-1 - Isoforma da ciclooxygenase tipo 1

COX-2 - Isoforma da ciclooxygenase tipo 2

Ct - Grupo Controle

dAAC - Diferenças das áreas abaixo das curvas

DAG - diacilglicerol

DHE – dihidroetídeo

DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

EDCF - fatores constritores derivados do endotélio

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

eNOS - Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico

EP1 - receptor de prostaglandina

EPM - Erro Padrão da Média

ERK1/2 - quinases reguladas por sinal extracelular 1/2

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

ET - Endotelina

FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo

FE - Fenilefrina

FMN - Flavina mononucleotídeo

GMPc - 3'5'-monofosfato cíclico de guanossina

GPx - Glutathione Peroxidase

H<sub>2</sub>O - Água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HOCl - ácido hipocloroso

IARC - Agency for Research on Cancer

IBMP - índices Biológicos Máximos Permitidos

Indo - Indometacina

iNOS - isoforma induzível da sintase de óxido nítrico

IP3 - 1,4,5 – inositol trifosfato

JNK1/2/3 - quinase JUN N-terminal 1/2/3

KCl- cloreto de potássio

kDa - kilodalton

L-NAME - Inibidor não-seletivo da NOS, o N-nitro-L-arginina metil éster

M - Molar

MAPKs – Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MDA - Malondialdeído

min - Minuto

MLCK - cadeia leve da miosina

MLV - Músculo liso vascular

MS - Ministério da Saúde

NADPH - adenina dinucleotídeo fosfato

NHANES - The Third National Health and Nutrition Examination Survey

nNOS - Isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NPS - Nitroprussiato de sódio

NR7 - Norma Regulamentadora nº 7 do Ministério do Trabalho

$O_2^{\cdot-}$  - Ânion superóxido

$ONOO^-$  - Peróxido de nitrito

PA - Pressão Arterial

PAS - Pressão Arterial Sistólica

Pb - Grupo chumbo

PBS - Solução tampão fosfato-salino

Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - tetróxido de trichumbo

PbO - óxido de chumbo

PD2 - Prostaglandina D2

pD2 - Sensibilidade

PGE2- Prostaglandina E2

PGF<sub>2α</sub> - Prostaglandina F<sub>2α</sub>

PGH2 - Prostaglandina H2

PGI2 - Prostaciclina I2

PKA - Proteína quinase A

PKG - Proteína quinase G

PLA2 - Enzima fosfolipase A2

ppm - partículas por milhão

P/S - Penicilina e estreptomicina

R<sub>máx</sub> - Resposta máxima

sGC - guanilato ciclase solúvel

-SH - Radical sulfidril

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

SOD-Cu/Zn; SOD1 - Superóxido dismutase cobre/zinco

SOD-Mn; SOD2 - Superóxido dismutase mitocondrial

SOD-EC; SOD3 - Superóxido dismutase extracelular

TXA2 - Tromboxano A2

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

WHO - World Health Organization

## RESUMO

Alguns estudos mostram a associação entre exposição ao chumbo e o risco de doenças cardiovasculares. A exposição crônica a baixas concentrações produz hipertensão e, no entanto, os mecanismos subjacentes não estão totalmente esclarecidos. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar se a exposição crônica a baixa concentração de chumbo, durante 30 dias, afeta a função vascular de aorta e mesentéricas de resistência, e avaliar o papel do estresse oxidativo, das vias dependentes da ciclooxygenase-2 e das MAPKs, nas alterações vasculares induzidas pela exposição ao chumbo. Para isso, foram utilizadas aortas e mesentéricas de ratos Wistar tratados com chumbo (1ª dose: 10 µg/100 g; doses subsequentes: 0,125 µg/100 g, por via intramuscular, 30 dias) e cultura de células musculares lisas vasculares (VSMCs) de aorta de ratos Sprague-Dawley estimulados com chumbo (20 µg/dL). Os níveis de chumbo no sangue dos ratos tratados atingiu uma concentração de  $21,7 \pm 2,38$  µg/dL. Esta exposição aumentou a pressão arterial sistólica e a resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta e mesentéricas, reduziu o relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta e não afetou o relaxamento ao nitroprussiato de sódio. A remoção do endotélio e o L-NAME (100 µM), deslocaram mais a resposta à fenilefrina em aorta dos animais não tratados do que dos tratados com chumbo, no entanto, não foi observada diferença nos anéis de mesentéricas. A apocinina (30 µM) promoveu redução da resposta à fenilefrina que foi maior em aorta de ratos tratados com chumbo do que as não tratadas. Em anéis de mesentéricas a apocinina não alterou a reatividade vascular, porém a SOD (150 U ml<sup>-1</sup>) levou a uma pequena redução da resposta vasoconstrictora à fenilefrina. A indometacina (10 µM) promoveu uma maior redução na resposta à fenilefrina em anéis de aorta e mesentérica tratada com chumbo em relação as não tratadas. O antagonista de receptores EP1, SC-19220 (10 µM) também reduziu a resposta à fenilefrina em mesentéricas de ratos expostos ao metal. O tratamento com chumbo promoveu aumento da expressão proteica vascular da gp91phox, SOD-Cu/Zn, SOD-Mn e COX-2. Em cultura de CMLVs o chumbo promoveu 1) aumento da produção de ânion superóxido, aumento da atividade da NADPH oxidase e da expressão gênica e/ou proteica de NOX1, NOX4, SOD-Mn, SOD-EC e COX-2 e 2) ativação das MAPKs ERK1/2 e p38. Tanto os



antioxidantes (mito-TEMPO, 5  $\mu\text{mol/L}$ ; tempol, 10  $\mu\text{mol/L}$  e ML171, 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) como os inibidores COX-2 (Celecoxib, 10  $\mu\text{M}$  e Rofecoxib, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) normalizaram a produção de ânion superóxido, a atividade da NADPH oxidase e os níveis de mRNA de NOX1, NOX4 e COX-2. O bloqueio das vias de sinalização de ERK1/2 e p38 aboliram a indução da expressão de NOX1, NOX4 e COX-2, causada pelo chumbo. Em conclusão, os resultados aqui apresentados demonstram que o tratamento com baixas doses de chumbo aumenta a pressão arterial sistólica, promove disfunção vascular e ativa vias de sinalização das MAPKs. Estes efeitos estão associados com a ativação de proteínas inflamatórias tais como a NADPH oxidase e COX-2 que atuam em conjunto para contribuir com a disfunção vascular.

**Palavras-chave:** exposição ao chumbo; via das MAPKs, estresse oxidativo, ciclooxigenase-2, reatividade vascular, pressão arterial.

## ABSTRACT

Some studies show an association between lead exposure and the risk of cardiovascular disease. Chronic exposure to low lead concentration produces hypertension; however, the underlying mechanisms remain unclear. Thus, the aim of this study was to examine whether chronic exposure to low concentrations of lead for 30 days, affects the vascular function of aorta and mesenteric arteries, and evaluate the role of oxidative stress, the cyclooxygenase-2 dependent pathways and of MAPKs, in vascular changes induced by lead exposure.

For this, aortas and mesenteric arteries were used from lead-treated Wistar rats (1st dose: 10 µg/100 g; subsequent doses: 0.125 µg/100 g, intramuscular, 30 days) and aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) from Sprague Dawley rats stimulated with lead (20 µg/dL) were also used. After treatment, the blood levels attained  $21.7 \pm 2.38$  µg/dL. This exposure increased systolic blood pressure and aortic and mesenteric rings contractile response to phenylephrine, reduced acetylcholine-induced relaxation in aortic rings and did not affect sodium nitroprusside relaxation.

Endothelium removal and L-NAME left-shifted the response to phenylephrine more in untreated than in aortas from lead-treated rats, however no difference was observed in mesenteric rings. When using apocynin (30 µM), we observed that there was a reduced response to phenylephrine which was greater in treated than in untreated aortas. In mesenteric rings apocynin did not change the reactivity, although SOD (150 U ml<sup>-1</sup>) led to a small reduction in vasoconstriction response to phenylephrine. Indomethacin (10 µM) decreased more the response to phenylephrine in aortas and mesenteric arteries from treated than from untreated rats. The EP1 antagonist SC-19220 (10 mM) reduced the response to phenylephrine only in mesenteric rings from rats exposed to the metal. Treatment with lead caused an increased vascular protein expression of gp91phox, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD and COX-2. In cultured VSMCs lead 1) increased superoxide anion production, NADPH oxidase activity and gene and/or protein levels of NOX1, NOX4, Mn-SOD, EC-SOD and COX-2, and 2) activated ERK1/2 and p38 MAPK. Both antioxidants (mito-TEMPO-5 µmol/L, tempol-10 µmol/L e ML171-0,5 µmol/L) and COX-2 inhibitors (Celecoxib- 10 µM e Rofecoxib-10 µmol/L) normalized superoxide anion production, NADPH oxidase activity and mRNA levels of NOX1, NOX4 and COX-2. Blockade of the ERK1/2 and p38 signaling

pathways abolished lead-induced NOX1, NOX4 and COX-2 expression. In conclusion, the results presented here demonstrated that treatment with low doses of lead increased systolic arterial blood pressure, promoted vascular dysfunction and activated MAPK signaling pathways. These effects are associated with the activation of inflammatory proteins such as NADPH oxidase and COX-2 that act in concert to contribute to vascular dysfunction.

**Keywords:** lead exposure; MAPK pathway; oxidative stress; cyclooxygenase-2; vascular reactivity; blood pressure.

## ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O CHUMBO

Historicamente, a humanidade está intimamente relacionada com a utilização de metais pesados, como chumbo, mercúrio e cádmio. Há existência de relatos da utilização do mercúrio e chumbo para fabricação de utensílios e ferramentas datados dos séculos XV e XVI a.C (Espanol Cano, 2001).

O chumbo pertence à família química dos metais do grupo IV b da tabela periódica. Seu número atômico é 82, seu símbolo químico é o Pb (Paoliello & Chasin, 2001). É um metal cinza-azulado, brilhante, inodoro, maleável, insolúvel nos solventes orgânicos e muito resistente à corrosão. Encontra-se em estado sólido à temperatura ambiente, se funde a 327 °C, com temperatura de vaporização a 1725 °C. É encontrado na natureza tanto na forma livre como em associação com diversos outros metais. Estas propriedades determinam sua ampla aplicação na indústria e grande importância comercial no mercado mundial (WHO, 1995; IUPAC, 2003).

O chumbo inorgânico pode apresentar estados de oxidação +2 e +4. O íon estável do chumbo é o  $Pb^{2+}$  e combinado com o enxofre forma a galena ( $PbS = 86,6\%$  de Pb e  $13,4\%$  de S) um dos mais abundantes minérios e do qual é extraído quase todo o chumbo primário (DNPM, 2001). O  $Pb^{4+}$  forma os compostos orgânicos tetrametilchumbo  $Pb(CH_3)_4$  e tetraetilchumbo  $Pb(C_2H_5)_4$ , os mais importantes do ponto de vista comercial, visto que já foram amplamente empregados como aditivos em combustíveis (Conterato, 2007).

### 1.2 FONTES DE EXPOSIÇÃO E UTILIZAÇÃO

O chumbo é relativamente abundante na crosta terrestre, sendo o quinto metal mais abundante no planeta (Matos, 2007). Sua concentração média no solo é de 10 a 20 mg/kg. Na atmosfera, essa concentração foi estimada em cerca de  $0,0005 \mu g/m^3$  no ar e em águas superficiais a concentração natural do metal é em torno de  $0,02 \mu g/L$  (WHO, 1995).

As maiores fontes naturais de chumbo são as emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas, e as fontes geológicas de chumbo são as rochas

ígneas e metamórficas (WHO, 1995; Paoliello & Chasin, 2001). As fontes antropogênicas são obtidas principalmente a partir da recuperação do metal de sucatas e rejeitos. A contaminação do solo pode se dá por todas essas fontes: natural, geológica ou através de atividades exercidas pelo homem (antropogênicas) (Paoliello & Chasin, 2001). No Brasil, o chumbo secundário é obtido, principalmente, da reciclagem de baterias automotivas, industriais e de telecomunicações, em usinas refinadoras nos estados de Pernambuco, São Paulo e Rio de Janeiro (DNPM, 2007; Brasil, 2013).

O chumbo é utilizado em mais de 200 processos industriais diferentes. Na forma de ligas e compostos é empregado na fabricação de produtos de alta tecnologia como, por exemplo, proteção de reatores nucleares, finas placas de componentes eletrônicos, bem como de baterias, tintas e corantes, cerâmicas, cabos e munição (Kreusch, 2005). Cerca de 40% do chumbo é usado como um metal, 25% em ligas e 35% em compostos químicos (ATSDR, 1993; Parmeggiani, 1983).

Na forma de ligas, o chumbo é utilizado nos processos de soldagem. Na indústria eletrônica, além de promover a adesão de componentes à superfície de placas, têm a importante função de propiciar a ligação elétrica entre os componentes e os circuitos eletrônicos (Kreusch, 2005). O chumbo metálico é usado na forma de lâmina, canos ou cabos, proporcionando maior flexibilidade e resistência à corrosão. Serve como protetor contra radiações ionizantes e também é utilizado como metalizante para coberturas protetoras, na manufatura de baterias (Kreusch, 2005).

Os óxidos de chumbo são usados nas placas de baterias elétricas e acumuladores, como componentes na manufatura de borracha (PbO), como ingredientes nas tintas (Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e constituintes de vitrificados, esmaltes e vidros. Estima-se que a manufatura da bateria representa cerca de 70% do consumo mundial desse metal (WHO, 1995).

A indústria química utiliza amplamente o chumbo. O arseniato de chumbo é empregado na fabricação de inseticida; o carbonato de chumbo é empregado na síntese do cloreto de polivinila (PVC); o acetato de chumbo tem importante uso como impermeabilizador, verniz, antiferrugem em pinturas, reagente analítico; o naftenato de chumbo é um secativo (de Capitani *et al.*, 2009; Paoliello & Chasin, 2001). Este metal também é utilizado em fertilizantes ou adubos agrícola, distribuindo-se no meio ambiente (ATSDR, 1993).

Os sais de chumbo formam as bases de muitas tintas e pigmentos, porém muitos países têm restringido seu uso. Nos Estados Unidos concentrações de chumbo em tintas e pigmentos acima de 0,06% e na Nova Zelândia acima de 0,5% não são permitidas (WHO, 1995). Após anos sem regulamentação no Brasil, em agosto de 2008 foi publicada a Lei nº 11.762, que regulariza o uso de pigmentos e secantes à base de chumbo em tintas imobiliárias. A lei estabelece que tintas imobiliárias não possam conter chumbo em concentração igual ou superior a 0,06%, em peso (Brasil, 2008).

O chumbo tetraetílico durante muito tempo no Brasil (1922) foi usado na gasolina para aumentar a potencia dos motores de carros e obter maior economia de combustível (Landrigan, 2002). Porém desde 1978 foi proibido e no seu lugar utiliza-se o etanol (Paoliello & Chasin, 2001). Esta proibição levou a uma redução drástica da população em geral ao contato com o chumbo (Pirkle *et al.*, 1998). Entretanto, em vários países, ainda há locais em que a gasolina é fonte permanente de exposição a este metal.

Frente a várias fontes de exposição ao chumbo, alguns países estabeleceram concentrações máximas de chumbo no sangue para pessoas expostas e não expostas. A Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) recomenda como segura uma concentração de chumbo sanguínea inferior 30 µg/dL em adultos não expostos e 60 µg/dL em adultos expostos ocupacionalmente. No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (1988) do Ministério do Trabalho, estabelece os valores de referência, para pessoas não ocupacionalmente expostas e os Índices Biológicos Máximos Permitidos (IBMP) em trabalhadores expostos, de 40 µg/dL e 60 µg/dL de sangue, respectivamente (Brasil, 1988; Jacob *et al.*, 2002). A NR-7 (Portaria nº 24, de 29/12/94), também determina o monitoramento anual dos efeitos tóxicos do chumbo através de exames médicos em trabalhadores expostos.

Entretanto, é comprovado que níveis de chumbo no sangue, inferiores aos fixados por estes órgãos, podem provocar alterações de humor, disfunções da memória, da associação verbal, da inteligência visual e da atenção em trabalhadores expostos ao metal, assim como alterações cardiovasculares (Cordeiro *et al.*, 1996; Kasperczyk *et al.*, 2009).

Nos países desenvolvidos, o controle das fontes de poluição de chumbo vem sendo implementado gradativamente, com uma intensa atuação dos órgãos ambientais e

da saúde pública. No Brasil, o controle é praticamente inexistente, devido à falta de dados sobre a real exposição da população brasileira e interesse dos órgãos nacionais de fiscalização. Por isso, se faz necessário, estudos que mostrem os riscos desta exposição para maior conhecimento da nossa realidade e, desse modo, incentivar os órgãos de saúde pública e de meio ambiente nas ações de controle (Moreira & Moreira, 2004).

### 1.3 CINÉTICA DO CHUMBO NO ORGANISMO

Em virtude da ampla utilização, o chumbo é um dos contaminantes mais comuns do ambiente, como relatamos anteriormente. Esta grande utilização proporciona a contaminação direta de pessoas ocupacionalmente expostas e, indiretamente, à população em geral. Assim, todos os seres humanos têm chumbo em seus organismos como resultado da exposição às fontes exógenas (Moreira & Moreira, 2004). No entanto, este metal não possui nenhuma função fisiológica conhecida no organismo e seus efeitos tóxicos já são conhecidos há muito tempo por afetarem praticamente todos os órgãos e sistemas (Xie *et al.*, 1998).

Sabendo-se que o chumbo é um elemento tóxico que se acumula no organismo, e como o propósito de correlacionar a quantidade de chumbo no ambiente aos seus efeitos tóxicos nos diversos órgãos e sistemas, é importante entender a cinética deste metal no organismo: sua absorção, distribuição, armazenamento e eliminação.

O chumbo inorgânico entra no organismo por inalação (principal forma da exposição ocupacional) ou ingestão (via predominante para a população em geral). Já os compostos orgânicos de chumbo são capazes de penetrar através da pele íntegra, e os compostos de chumbo tetra alquila podem ser absorvidos por estas três vias. No organismo o chumbo não é metabolizado, e sim, complexado por macromoléculas, sendo diretamente absorvido, distribuído, armazenado e excretado (Paoliello & Chasin, 2001).

A absorção de chumbo proveniente de fontes ambientais é dependente da quantidade de metal, do seu estado físico e químico, além de ser influenciado por fatores relacionados ao hospedeiro (idade, genética, estado fisiológico) e condições nutricionais (Paoliello & Chasin, 2001). Uma vez absorvido, o chumbo se distribui entre o sangue, os tecidos moles (rins, medula óssea, fígado e cérebro) e os tecidos



mineralizados (ossos e dentes) (ATSDR, 1993). Como o chumbo é qualitativamente um análogo biológico do cálcio, o seu sítio primário de armazenamento no organismo é o osso, que contém aproximadamente 90% a 95% do conteúdo corpóreo total de chumbo (Moreira & Moreira, 2004). A concentração de chumbo no sangue é menor do que 2% do seu total no organismo, sendo que 90% a 99,8% deste metal estão ligados à membrana e a frações de proteínas (principalmente à hemoglobina) das células vermelhas e o restante está no plasma ligado à albumina,  $\alpha_2$ -globulina ou como íons livres (Goyer, 1991; Sanín *et al.*, 1998). O plasma é o componente do sangue que contém chumbo livre para cruzar as membranas celulares e possivelmente causar seus efeitos tóxicos (Moreira & Moreira, 2004).

A eliminação do chumbo no organismo humano é extremamente lenta (Moraes, 2014). Sua excreção pode ocorrer por várias vias, porém a excreção renal e a gastrointestinal são as de maior importância prática. A excreção gastrointestinal acontece por secreção pancreática e biliar, possivelmente na forma de um complexo chumbo-glutationa. O chumbo não absorvido pelo trato gastrointestinal é eliminado nas fezes (cerca de 15 %) e o que foi absorvido é amplamente excretado pela urina, por filtração glomerular (75-80 %). No entanto, os mecanismos de eliminação pela bile e urina ainda não estão completamente elucidado (Moreira & Moreira, 2004). Outras possíveis formas de eliminação do chumbo se dão através do suor, descamação cutânea, cabelo, unhas (< 8 %) e através do leite materno, estas em quantidades muito pequenas (Tsalev & Zaprianov, 1985).

Abordaremos a seguir, acerca dos efeitos tóxicos desse metal nos diferentes sistemas do organismo.

#### 1.4 EFEITOS DO CHUMBO NOS DIVERSOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

O chumbo é capaz de promover efeitos adversos no organismo humano, devido a sua alta toxicidade e capacidade cumulativa. A intoxicação aguda pelo chumbo é bastante rara, mas muito perigosa, podendo levar a morte, enquanto que a intoxicação crônica é mais comum e bastante danosa ao organismo. A cronicidade da exposição ao chumbo pode gerar distúrbios gastrointestinais, neuromusculares e sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), além de alterar o sistema cardiovascular e o renal (Paoliello & Chasin, 2001; Jacob *et al.*, 2002).

Os mecanismos de toxicidade propostos envolvem vários processos bioquímicos, principalmente os que estão relacionados ao funcionamento de membranas celulares e enzimas. As alterações no funcionamento de enzimas estão principalmente relacionadas às interações desse metal com os grupamentos sulfidril (-SH) de proteínas que estão intimamente relacionadas à ativação de proteínas quinases C, fazendo desse um dos principais mecanismos de toxicidade. Outro importante mecanismo de toxicidade do chumbo se dá pela sua capacidade de mimetizar o íon cálcio e interagir com diversas proteínas, como sua interação com a calmodulina através da interação com os grupamentos carboxilas (Moreira & Moreira, 2004).

O sistema nervoso é o sistema mais sensível à intoxicação por chumbo, sendo a encefalopatia um dos mais sérios desvios tóxicos induzidos por este metal em crianças e adultos (Moreira & Moreira, 2004). Os sintomas de neurotoxicidade incluem irritabilidade, dor de cabeça, diminuição de atenção, perda de memória, déficit cognitivo, cefaléia, tremor muscular, alucinações, redução na velocidade de transmissão do impulso nervoso, tontura, fraqueza e parestesia (Paoliello & Chasin, 2001; Moreira & Moreira, 2004).

Hanninen *et al.* (1998) estudaram 54 trabalhadores de uma fábrica de baterias e concluíram que as alterações neuropsicológicas encontradas nos sujeitos com exposições passadas altas e presentes baixas indicam que concentrações de chumbo no sangue na faixa de 51,8 a 101,4 µg/dL podem causar danos prolongados, ou mesmo permanentes na função do sistema nervoso central. Outros estudos, controlados, demonstraram associação entre os altos valores de chumbo no sangue de crianças, com aumento de delinquência na juventude observada no final da infância e início da fase adulta (Needleman *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 2001). Contudo, ainda não são bem conhecidos os níveis em que as primeiras anormalidades neurofisiológicas aparecem, mas alguns trabalhos sugerem que alterações leves já podem aparecer em concentrações abaixo do que se considera seguro pelo Índice Biológico Máximo Permitido para trabalhadores expostos (60 µg/dL) e pessoas não ocupacionalmente expostas (40 µg/dL).

O sistema renal também é alvo do chumbo. Seus efeitos tóxicos ocorrem na presença de níveis relativamente altos de chumbo no sangue. Sabe-se que em trabalhadores expostos, a nefropatia por chumbo é bem documentada e

caracterizada por redução da função renal e na maioria das vezes é acompanhada por hipertensão (Saryan & Zen, 1994; WHO, 1995). As alterações funcionais são semelhantes às encontradas em casos de lesões nos túbulos proximais, sendo caracterizada por diminuição da absorção de aminoácidos, glicose, ácido cítrico e fosfato (Moraes, 2014). Clinicamente a toxicidade é verificada por proteinúria, hematúria e presença de cilindros na urina (Kosnett, 2003). A nefropatia aguda ocorre principalmente em crianças sob exposição aguda ao chumbo, sobretudo pela via oral e a nefropatia crônica é descrita principalmente em trabalhadores expostos, cuja exposição primária é por inalação (Paoliello *et al.*, 2003; Moreira & Moreira, 2004).

Também, segundo a *Agency for Research on Cancer* (IARC), há evidências relativas à carcinogenicidade do chumbo e seus compostos em animais, porém em humanos ainda é incerto. Essas evidências foram comprovadas em animais mediante estudos que apontam o acetato e o fosfato de chumbo como causa de tumores em rins de ratos (ATSDR, 1993; Saryan & Zen, 1994). Assim, de acordo com a IARC, o chumbo e os compostos de chumbo foram classificados como “possivelmente carcinogênicos para humanos” (WHO, 1995).

Além destes, os sintomas intestinais que caracteriza a exposição ao metal aparecem como a cólica, caracterizada por espasmos intestinais que provocam dor abdominal intensa, associada com náuseas, vômito e perda de peso (Paoliello, 2003).

Quanto ao sistema hematológico, a forte ligação do chumbo ao grupamento sulfidríla de proteínas, leva a alterações da via de síntese do heme, na molécula de hemoglobina, uma vez que cerca de 99% do chumbo sanguíneo está ligado às células vermelhas (Lawton & Donaldson, 1991). Estas alterações são observadas nas enzimas ácido delta-aminolevulínico desidratase (ácido delta-ALAD), ferroquelatase e coproporfirinogênio oxidase, todas envolvidas na biossíntese do heme (Paoliello & Chasin, 2001). A interferência na produção do heme e a subsequente redução da sua quantidade corporal é uma das principais causas da patologia relacionadas ao chumbo, principalmente a inibição da eritropoiese, provocando anemias (Souza & Tavares, 2009).

## 1.5 EFEITOS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

A hipertensão arterial é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, sendo essas doenças atualmente responsáveis por um grande percentual de morbi-mortalidade em vários países. Estima-se que 20 % da população mundial apresenta hipertensão arterial, e no Brasil esse percentual pode chegar em torno de 40 % em algumas regiões do país (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial).

Dentre os fatores que contribuem para gênese e/ou manutenção da hipertensão estão incluídos fatores extrínsecos como se pode citar: obesidade, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo, aumento do consumo de sal (Bakris & Mensah, 2002) e a exposição a metais pesados como o chumbo (Vaziri *et al.*, 1997, 1999), mercúrio (Vassallo *et al.*, 1999; da Cunha *et al.*, 2000) e cádmio (Massó *et al.*, 2007; Gonick, 2008). E fatores intrínsecos, que incluem alterações funcionais do sistema- renina-angiotensina, aumento da atividade simpática, resistência à insulina, hereditariedade (Harrap, 1994); modificações dos parâmetros hemodinâmicos (alterações no débito cardíaco e na resistência vascular periférica) (Folkow, 1982); e raça (Freis, 1973).

Como descrito anteriormente, a exposição a agentes tóxicos, incluindo chumbo e outros metais, é um fator de risco e pode contribuir para o surgimento ou agravamento da hipertensão e de doenças cardiovasculares. Entretanto, após cem anos dos primeiros estudos que correlacionam a exposição ao chumbo às alterações nos parâmetros cardiovasculares, o papel do chumbo nos mecanismos envolvidos nestas alterações ainda não está completamente elucidado (Navas-Acien *et al.*, 2007). Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem uma relação entre exposição por chumbo, hipertensão e doenças cardiovasculares (Schwartz, 1991; Moller & Kristensen, 1992; Maheswaran *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1998; Lustberg and Silbergeld, 2002). Sabe-se que seus efeitos na saúde humana dependem dos níveis sanguíneos e da duração da exposição. Diante disso, vários estudos são necessários para determinar a correlação entre concentrações sanguíneas de chumbo e aumento da pressão arterial; as diferenças entre os efeitos das exposições agudas e crônicas sobre a pressão arterial; as alterações promovidas pelo chumbo no sistema cardiovascular e os mecanismos intracelulares pelos quais o chumbo provoca estas alterações.

Em acordo com o exposto, estudos *in vivo* e *in vitro* com animais vêm mostrando que a exposição crônica ao chumbo causa hipertensão e doenças cardiovasculares por alterar o sistema renina-angiotensina, principalmente por aumentar a atividade da ECA (Carmignani *et al.*, 1999; Sharifi *et al.*, 2004; Simões *et al.*, 2011), inibir a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Weiler *et al.*, 1990), induzir o estresse oxidativo, reduzir a biodisponibilidade de NO (Gonick *et al.*, 1997; Grizzo & Cordelline, 2008; Vaziri, 2008; Silveira *et al.*, 2014), e esgotar as reservas de antioxidantes (Farmand *et al.*, 2005). O chumbo pode agir também como substituto do cálcio na via de sinalização do cálcio por interagir com calmodulina, PKC (proteína kinase C), com canais para potássio dependentes de cálcio (Goldstein, 1993; Watts *et al.*, 1995), além de estimular a proliferação das células do músculo liso vascular (Fujiwara *et al.*, 1998).

Estudos de Vaziri e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento crônico por 12 semanas com 100 ppm de acetato de chumbo em água de beber, foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica (PAS) no grupo de ratos que recebeu o metal. Em outro trabalho, pesquisadores encontraram aumento de pressão arterial sistólica a partir da segunda semana de tratamento com 100 ppm de acetato de chumbo. Houve aumento progressivo da pressão arterial sistólica até a oitava semana, na qual atingiu valor aproximado de 180 mmHg (Sharifi *et al.*, 2004). Os trabalhos de Carmignani e colaboradores (1999 e 2000) demonstraram aumento da pressão arterial sistólica e diastólica de ratos tratados por 10 meses com 60 ppm de acetato de chumbo na água de beber. Corroborando com estes achados, Roncal e colaboradores (2007) também demonstram que ratos submetidos ao tratamento crônico com 150 ppm de acetato de chumbo na água de beber, por 16 semanas, obtiveram aumento da pressão arterial sistólica.

Ademais, trabalhos realizados por nosso grupo mostraram que o tratamento *in vivo* com o chumbo agudo, promove aumento da pressão arterial com aumento da participação do sistema renina-angiotensina em apenas 2 horas de exposição (Simões *et al.*, 2011). Vassallo *et al.*, (2008) mostraram que a administração aguda de chumbo (100  $\mu\text{M}$ ) reduz a contratilidade miocárdica. Contudo, outro estudo com os ratos expostos agudamente a baixa concentração de chumbo (8  $\mu\text{M}$ ) mostrou um aumento na pressão sistólica ventricular esquerda (Fioresi *et al.*, 2013).

A reatividade vascular também pode ser alterada pela exposição a esse metal pesado. Webb *et al.* (1981), observaram aumento da força contrátil na presença de

norepinefrina e metoxamina em artéria caudal de ratos tratados com 100  $\mu\text{M}$  de acetato de chumbo em relação ao grupo controle. Silveira *et al.* (2010) em leito de artéria caudal, mostraram que 100  $\mu\text{M}$  de chumbo levou a alterações no endotélio, promovendo maior liberação de vasoconstritores derivados da ciclooxigenase e de espécies reativas de oxigênio, aumentando a reatividade vascular. Avaliando a hipertensão induzida pelo chumbo em ratos Marques e colaboradores (2001) mostraram que esta se relaciona com o prejuízo do relaxamento vascular endotélio-dependente e não-dependente. Esse fato é acompanhado de aumento da expressão proteica que promove por um lado, ativação de proteínas que inibem a  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, da eNOS e “downregulation” da guanilato ciclase solúvel (sGC). Segundo esses autores, essas respostas parecem envolver as espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre o sistema de relaxamento NO/cGMP na parede vascular dos ratos tratados com chumbo. Este achado foi correlacionado com o envolvimento das EROs e da COX-2, que estão aumentados nos animais tratados com o chumbo (Courtois *et al.*, 2003).

Para melhor compreender os efeitos da exposição ao chumbo sobre os vasos sanguíneos, é necessária uma breve revisão sobre os componentes vasculares e a regulação do tônus vascular.

## 1.6 TÔNUS VASCULAR E SUA REGULAÇÃO

Artérias são compostas basicamente por três camadas estruturais. A camada de células mais interna que envolve o lúmen, delimitada pela camada elástica interna, é túnica íntima. Esta é composta por um arranjo linear e longitudinal de células endoteliais e membrana basal contendo tecido conjuntivo, células sub-endoteliais (pericitos) e esporádicas células musculares lisas vasculares (CMLVs). A túnica ou camada média é o tecido compreendido entre a lamina elástica interna e a externa, composto de um arranjo de células musculares lisas dispostas em forma circunferencial embebidas em matriz extra-celular rica em colágeno, elastina/fibrilina e proteoglicanos. A camada localizada externamente à lâmina elástica externa, ou túnica adventícia, é composta de fibroblastos arrumados longitudinalmente, inseridos na matriz extra-celular rica em colágeno e elastina, pequenos vasos e terminações nervosas (Hillebrands, *et al.*, 2001).

Fisiologicamente, o endotélio atua como barreira semipermeável entre o sangue e a musculatura lisa vascular (Ross, 1995). Particularmente, um grande volume de investigações nas últimas décadas evidenciou um papel crucial do endotélio no controle parácrino da estrutura e função vascular. Este possui importante função na homeostase, modulação e regulação de várias funções fisiológicas, como a inflamação, agregação plaquetária, fibrinólise, angiogênese e mecanorecepção (Jaffe, 1985; Vane *et al.*, 1990; Ramos, 1992). Além de manter o balanço entre vasodilatação e vasoconstricção, também exerce efeito sobre a inibição, promoção da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (Félétou, 2009).

O músculo liso vascular (MLV) é responsável pelo controle da resistência periférica total, pelo tônus arterial e venoso e pela distribuição do fluxo sanguíneo. O tônus do músculo liso vascular é um fator determinante de resistência vascular. A regulação deste é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais. A ativação de receptores localizados na membrana do MLV, por neurotransmissores ou hormônios dá início a uma série de processos celulares que lideram a contração desse músculo. O principal determinante de mudança da resistência vascular é a alteração do diâmetro da luz do vaso. A alteração do lúmen arterial pode se dar por modificações estruturais ou do balanço de fatores vasodilatadores e vasoconstritores produzidos, principalmente, pelo endotélio vascular (Deussen *et al.*, 2006).

Para desencadear a contração, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático. Este aumento pode resultar tanto do influxo do  $\text{Ca}^{+2}$  através de canais específicos da membrana citoplasmática, quanto de liberação dos estoques intracelulares, como o retículo sarcoplasmático, aumentando a oferta do  $\text{Ca}^{+2}$  à maquinaria contrátil (Lincoln *et al.*, 2001).

Assim, para entender a ação do chumbo no sistema cardiovascular, em especial na regulação do tônus do músculo liso vascular através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras vamos discutir sobre algumas vias que participam do controle do tônus vascular. Ao final discorreremos em especial sobre a cascata de sinalização intracelular das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), um dos nossos objetivos de estudo neste trabalho.

### 1.6.1 Óxido Nítrico

Furchgott e Zawadziki, em 1980, mostraram que o endotélio liberava um fator vasodilatador capaz de modular o tônus vascular, o qual denominou de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDHF). Em 1984, estes mesmos pesquisadores demonstraram que um EDHF era o óxido nítrico (NO), um gás que se difunde facilmente pelas membranas celulares promovendo vasodilatação (Moncada *et al.*, 1991; Heller *et al.*, 1999).

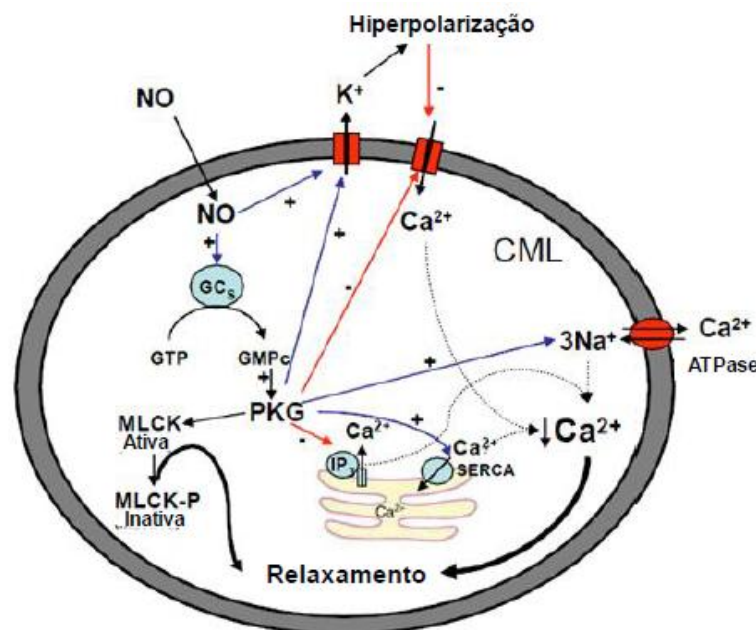
Dentre os componentes vasodilatadores do endotélio, o NO é um dos mais importantes participantes, sendo um componente fundamental na manutenção da homeostase dos vasos, incluindo a modulação do tônus vascular através do seu potente efeito vasodilatador. Além disso, este radical livre está envolvido na regulação do crescimento celular, além de possuir ação inibitória sobre a adesão e agregação plaquetária (Moncada *et al.*, 1991; Cannon III, 1998).

O NO é sintetizado nas células endoteliais, por ação da sintase do óxido nítrico (NOS) pela conversão de L-arginina a L-citrulina e NO, necessitando de oxigênio, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e BH<sub>4</sub> (tetrahidrobiopterina) (Stuehr *et al.*, 1991; Hevel *et al.*, 1991; Michel & Vanhoutte., 2010). Existem três isoformas da sintase do NO: duas constitutivas, presentes em células endoteliais (eNOS) ou em células neuronais (nNOS), e que tem sua ativação dependente do complexo cálcio-calmodulina; e outra a iNOS, que não está presente constitutivamente mas que pode ser induzida por estímulos imunológicos, que pode ser expressa em macrófagos, células endoteliais e são ativadas pela concentração de cálcio intracelular (Forstermann *et al.*, 1994).

A produção de NO, sob condições fisiológicas, é realizada pelas células endoteliais estimuladas por vários fatores físicos e químicos, como estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de cisalhamento, agregação plaquetária, histamina, catecolaminas, aldosterona, vasopressina, bradicinina, adenosina difosfato (ADP), serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh) entre outras (Moncada *et al.*, 1994; Marín & Rodriguez-Martínez, 1995). Para produzir relaxamento vascular o NO se difunde para o músculo liso vascular e por ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) promove aumento da concentração intracelular de GMPc (3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina). O GMPc ativa a proteína quinase G



(PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e assim o relaxamento vascular. Além disso, a PKG via canais para  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$  e voltagem hiperpolarizam a membrana plasmática promovendo relaxamento. Dentre todas as ações da PKG que também promovem relaxamento vascular podemos ressaltar a fosforilação do fosfolambam (PLB) que deixa de inibir a  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumentando a recaptação de cálcio e a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLCK) diminuindo sua sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  (Marín & Rodríguez-Martinez, 1995; Lincoln *et al.*, 2001). A PKG ativa canais para  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ , inibindo assim a entrada de  $Ca^{2+}$  do conteúdo extracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana (Figura I). Todos estes mecanismos contribuem para a diminuição da  $Ca^{2+}$  intracelular, e conseqüentemente o relaxamento do músculo liso vascular (Moncada *et al.*, 1991., Cannon III., 1998; Lincoln *et al.*, 2001; Triggle *et al.*, 2003 ).



**Figura I:** Mecanismos de relaxamento induzidos pelo óxido nítrico. CML: célula muscular lisa; CGs: guanilato ciclase solúvel; GTP: 5'-trifosfato de guanosina; IP3: 1,4,5-trifosfato de inositol; MLCK: quinase de cadeia leve da miosina; MLCK-P: quinase de cadeia leve da miosina fosforilada; NO: óxido nítrico; PKG: proteína quinase G; SERCA:  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático.

Outra reação do NO é a formação de S-nitrosotiois (SNO) que tem propriedade de unir-se de forma covalente aos tíois ou aos metais de transição podendo modificar a

função destas proteínas. O NO também pode reagir com radicais livres derivados do oxigênio especialmente os ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e perder sua atividade vasodilatadora e ainda produzir substâncias citotóxicas como o peróxido de nitrito ( $ONOO^-$ ) e radicais hidroxila ( $OH^-$ ) (Padmaja & Huie, 1993; Stoclet *et al.*, 1999). Essa perda de atividade pode contribuir com os mecanismos fisiopatológicos associados à hipertensão (Kerr *et al.*, 1999; Chatterjee & Catravas, 2008). Estudos com exposição crônica ao acetato de chumbo mostram indução da disfunção endotelial e redução da biodisponibilidade de NO devida à ação das espécies reativas de oxigênio (Ding *et al.*, 1998; Vaziri *et al.*, 1999; 2001; Silveira *et al.*, 2014).

### 1.6.2 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

O endotélio modula o tônus vascular não apenas pela vasodilatação promovida pelo NO e pela prostaciclina. Estudos demonstraram que mesmo após a utilização de inibidores da sintase do NO e da via da COX, ainda há um relaxamento residual. Desta forma, concluíram que existia outro vasodilatador que não os derivados da L-arginina e da COX (Cowan & Cohen, 1991; Zygmunt *et al.*, 1994; García-Pascual *et al.*, 1995; Mombouli *et al.*, 1997).

Após estudos que mostravam a existência de mudança do potencial de repouso da membrana plasmática do músculo liso vascular, concluíram que a hiperpolarização da membrana muscular lisa é outro mecanismo que explica o relaxamento dependente do endotélio (Nagao & Vanhoutte, 1991; Garland & McPherson, 1992). A ativação dos canais para potássio do músculo liso vascular, por fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) leva a hiperpolarização por diminuir a atividade dos canais de  $Ca^{2+}$  tipo L voltagem dependente, reduzindo assim o cálcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  promovendo o relaxamento (Nelson & Quayle, 1995). Atualmente sabe-se que os canais de potássio envolvidos na hiperpolarização promovida pelo EDHF são: os canais de  $K^+$  voltagem dependentes ( $K_v$ ); os canais de  $K^+$  de larga condutância ativados por alterações de  $Ca^{+2}$  intracelular ( $BK_{Ca}$ ); os canais de  $K^+$  retificador ( $K_{ir}$ ) e os canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2010). Todavia, a natureza química do EDHF ainda não está bem estabelecida e muitos são os estudos que especulam qual seria a substância responsável pela hiperpolarização (Félétou & Vanhoutte, 2004). Alguns trabalhos apontam como possíveis candidatos a EDHF os produtos do ácido araquidônico pela

via da citocromo P450, o íon potássio, o óxido nítrico de estoques intracelulares, o peróxido de hidrogênio ou mesmo o acoplamento elétrico entre as células endoteliais e musculares lisas através de junções comunicantes (gap junctions) (Rabelo *et al.*, 2003; Scotland *et al.*, 2005; Félétou & Vanhoutte, 2006). A contribuição dos EDHF é significativamente maior em vasos de pequeno diâmetro que em grandes artérias (Woolfson & Poston, 1990; Urakami-Harasawa *et al.*, 1997).

Diante do exposto, vemos que as respostas mediadas pelos EDHFs são importantes na homeostase vascular, todavia podem ser alteradas em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, aterosclerose e diabetes mellitus (Félétou *et al.*, 2010).

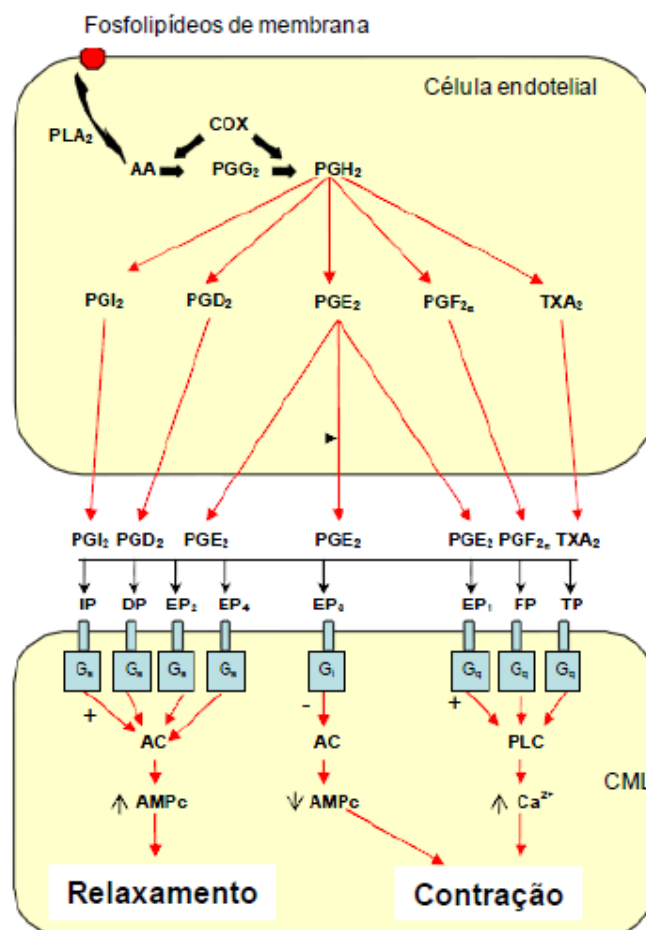
### 1.6.3 Prostanóides

Outras substâncias liberadas pelo endotélio com poder vasomotor e antiplaquetário são os prostanóides (Wright *et al.*, 2001). Os mais comuns são prostaciclina  $I_2$  ( $PGI_2$ ), prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), prostaglandina  $D_2$  ( $PD_2$ ), prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) e o tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ). Hoje se sabe que estes fatores constritores derivados do endotélio (EDCF) são prostanóides derivados do ácido araquidônico (AA), sendo este um constituinte dos fosfolípidios de membrana, que é liberado por ação da fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ). Após sua liberação o AA será oxidado pela ciclooxigenase (COX), enzima chave na síntese de prostanóides, e convertido a prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ), precursor imediato de muitos prostanóides (BOS, *et al.*, 2004) (Figura II).

Existem inúmeros prostanóides derivados da via do AA-COX, como citados acima. Cada prostanóide exerce sua função vasoconstritora ou vasodilatadora quando acoplado a um receptor específico ligado à proteína  $G_s$  (estimulatória) ou  $G_i$  (inibitória), que quando ativados estimulam ou inibem a adenilato ciclase (AC), e, como consequência produzem, respectivamente, aumento ou redução dos níveis intracelulares de AMPc e, então, promovem o relaxamento do músculo liso vascular ou vasoconstrição (Félétou *et al.*, 2010).

Cada tipo de prostanóide possui seu receptor específico de membrana, acoplados a proteínas G. A  $PGI_2$ ,  $PGE_2$  e  $PGD_2$  se ligam aos receptores específicos  $IP$ ,  $EP_2/EP_4$  e  $DP$ , respectivamente, que estão acoplados a proteína  $G_s$  e sua ativação,

após toda a sinalização intracelular, produzirá vasodilatação. Moncada *et al.* (1977) descobriu a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), a primeira substância vasodilatadora dependente do endotélio. A prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), uma vez liberada induz o relaxamento da musculatura lisa vascular e agregação plaquetária mediados pela ativação da enzima adenilato ciclase e consequentemente aumento de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) formado a partir da quebra de ATP (adenosina trifosfato) (Davidge, 2001). Esta ação depende de receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular. Esta interação também pode estimular a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que pode atuar abrindo canais de  $\text{K}^+$  sensíveis a ATP hiperpolarizando a membrana das CML e estimulando a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol, diminuindo a oferta deste íon à maquinaria contrátil causando relaxamento (Parkington *et al.*, 1995).



**Figura II:** Síntese de prostanóides e mecanismos de sinalização. AA: ácido araquidônico; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; CML: célula muscular lisa; COX: ciclooxigenase; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; PLC: fosfolipase C.

A PGE<sub>2</sub> quando se une ao receptor EP<sub>3</sub>, acoplado a proteína Gi, produz vasoconstrição. Em adição, a própria PGE<sub>2</sub>, a PGF<sub>2α</sub> e o TXA<sub>2</sub> produzem contração por união aos receptores EP<sub>1</sub>, FP e TP, respectivamente, que estão acoplados a proteína Gq. Esta união ativa a fosfolipase C (PLC) formando os segundos mensageiros inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), ativando a mobilização de cálcio intracelular e PKC (proteína quinase C) e iniciando a contração (BOS *et al.*, 2004) (Figura II). A PGF<sub>2α</sub> e o TXA<sub>2</sub> estimulam a atividade contrátil do músculo liso vascular através do acoplamento com receptores específicos. Esta interação levará o aumento de cálcio intracelular e a maior sensibilidade às proteínas contráteis (Luscher *et al.*, 1992; Davdge, 2001).

Nos anos 90, duas isoformas da ciclooxygenase (COX), a tipo 1 (COX-1) e tipo 2 (COX-2) foram identificadas, sendo que a primeira é constitutiva nas maioria das células e está relacionada com as funções fisiológicas, e a segunda é a isoforma induzida pelas citocinas, fatores mitogênicos e por estímulos pró-inflamatórios em vários tipos de células. Em vasos sanguíneos saudáveis a maioria dos prostanóides são formados pela isoforma constitutiva (COX-1), entretanto estes mediadores também podem ser sintetizados pela forma induzida (COX-2).

O aumento da expressão vascular da COX-2 está relacionada com condições patológicas associadas com processos inflamatórios como aterosclerose e hipertensão (Antman *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2005). Estudos mostraram a co-localização de COX-2 em CMLVs de aorta e artérias mesentéricas de rato (Bishop-Bailey *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2007). Esta presença contribui principalmente para a alteração do tônus vascular (Bishop-Bailey *et al.*, 1999), sendo este aumento da expressão vascular de COX-2 associado à hipertensão (Álvarez *et al.*, 2007). Assim, não só o endotélio vascular contribui com a liberação de prostanóide derivados da COX, o músculo liso vascular também participa do aumento dos prostanóides, especialmente em situações patológicas de maior estímulo da COX-2.

Em condições fisiológicas há um equilíbrio da formação de prostanóides vasodilatadores e vasoconstritores gerados pela COX participando, deste modo, da manutenção do tônus vascular. No entanto, em algumas doenças vasculares os prostanóides vasoconstritores podem estar aumentados (Vanhoutte *et al.*, 2005), o que foi confirmado por Alvaréz *et al.* (2005) que demonstraram aumento da

produção vascular de prostanóides vasoconstrictores sintetizados por COX-2 em modelos experimentais de hipertensão.

Estudos mostram que o acetato de chumbo interfere no metabolismo do ácido araquidônico (Grizzo & Cordelline, 2008; Courtois *et al.*, 2003; Karimi *et al.*, 2002). Corroborando com estes achados, estudo prévio em nosso laboratório mostrou o envolvimento de prostanóides vasoconstrictores derivados da COX no leito arterial caudal de ratos perfundidos com chumbo (100  $\mu\text{M}$ ) (Silveira *et al.*, 2010), o que parece contribuir com aumento da pressão arterial (Grizzo & Cordelline, 2008).

#### **1.6.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)**

O termo estresse oxidativo descreve a condição que envolve um aumento na produção das espécies reativas do oxigênio, onde há uma incapacidade das enzimas antioxidantes controlarem essa produção, ocasionando também um desequilíbrio na biodisponibilidade do sistema enzimático (Paravicini, 2008). O aumento do estresse oxidativo é evidenciado em várias doenças do sistema cardiovascular, sendo caracterizado por aumento de espécies reativas de oxigênio ou por uma redução das defesas antioxidantes (Suzuki *et al.*, 1995; Hamilton *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001; Lassègue *et al.*, 2012).

Todos os tipos de células podem produzir EROs, que são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio, altamente reativas que podem tanto retirar elétrons, doar elétrons ou reagir com outras moléculas. Participam da ativação e inativação de muitas vias de sinalização. Em condições normais, estas espécies são encontradas em baixos níveis no interior da célula e são constantemente geradas e destruídas por sistemas endógenos e estímulos ambientais. O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário porque estas espécies modulam a função vascular, seja por ação direta causada pelo estresse oxidativo ou por ativar vias de sinalização intracelulares que provocam a proliferação celular, remodelamento vascular, desenvolvimento de processo inflamatório e alteração no tônus vascular (Szasz *et al.*, 2007).

O ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), a mais importante EROs, é formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantinas oxidases. Após ser formado o ânion superóxido além de exercer seus

efeitos em diferentes vasos e órgãos pode dar origem a outras EROs. O  $O_2^{\bullet-}$  reage com o NO, inativa-o e dá origem ao peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), este contribui com a peroxidação lipídica (Stoclet *et al.*, 1999). A SOD dismuta o  $O_2^{\bullet-}$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  pode ser convertido em água por ação da glutationala peroxidase (GPx) ou da catalase. O  $H_2O_2$  também pode ser metabolizado pela mieloperoxidase e formar o ácido hipocloroso (HOCl) ou reagir com metais de transição e dar origem ao radical hidroxila ( $OH^-$ ). (Griendling *et al.*, 2000; Szocs *et al.*, 2002). Dentre as EROs, o  $O_2^{\bullet-}$ , o peroxinitrito e o radical hidroxila são as mais instáveis e reativas enquanto o peróxido de hidrogênio é a mais estável (Droge, 2002; Taniyama & Griendling, 2003).

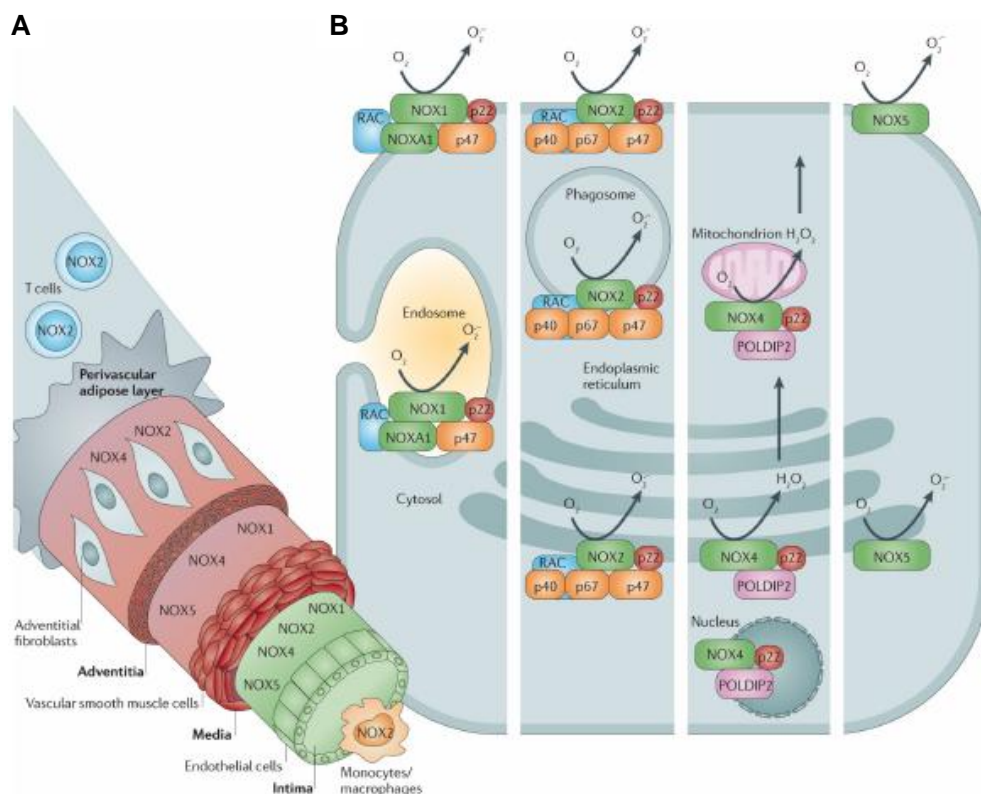
A mitocôndria além de ser fonte geradora de energia (ATP), pelo processo de fosforilação oxidativa é também a principal geradora de espécies reativas de oxigênio em condições fisiológicas e patológicas, pela adição de um elétron a molécula de oxigênio (Lee & Wei, 2007). Outras importantes fontes de EROs são as xantina oxidases, mieloperoxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases, NOS na falta de substrato ou cofatores, isoenzimas da citocromo P450 e as enzimas da família das NADPH oxidases (Cai & Harrison, 2000; Mueller *et al.*, 2005; Bedard & Krause, 2007; Koh *et al.*, 2009).

O complexo da NADPH oxidase, uma das principais fontes geradoras de ânion superóxido a nível vascular, é um heterodímero constituída por diferentes subunidades: gp91phox (mais conhecida como NOX, subunidade catalítica), p22phox, p47phox, p67phox, p40phox e rac2 (proteína G de baixo peso molecular). A p22phox é a subunidade essencial para o adequado funcionamento da NADPH oxidase, principalmente na formação de  $O_2^{\bullet-}$  nas células. Subunidades homólogas da gp91phox foram descritas, e estas fazem parte da família da NOX (vem de "Nonphagocytic NADPH oxidase"), composta pela NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 que são expressas em vários tecidos e estão ligadas a funções biológicas relacionadas com a defesa e o crescimento celular (McIntyre *et al.*, 1999; Lassègue & Clempus, 2003; Geiszt, 2006; Drummond *et al.*, 2011). Dentro da parede vascular, a localização das isoformas da NOX varia dependendo do tipo de célula e dos compartimentos celulares. Assim, as células endoteliais expressam NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5; CMLVs principalmente expressa NOX1, NOX4 e NOX5; e fibroblastos expressam principalmente NOX2 e NOX4 (Drummond *et al.*,

2011). NOX5 é apenas expresso em células humanas (Drummond *et al.*, 2011) (Figura III).

Os principais componentes do complexo enzimático NADPH oxidase, NOX1 e NOX4, são altamente expressos nas células vasculares e o aumento da expressão de diferentes NOXs, incluindo a NOX1 e NOX4, tem sido implicada em várias doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, hipertensão, diabetes, isquemia/reperfusão, restenose ou aneurismas da aorta abdominal. Assim, ROS derivados de NOX contribuem para o stress oxidativo, inflamação vascular, disfunção endotelial e remodelação vascular observado nestas patologias cardiovasculares (Dikalova *et al.*, 2005; Drummond *et al.*, 2011; Lassègue *et al.*, 2012; Montezano & Touyz, 2014).

As NADPH oxidases são ativadas e reguladas por diversos fatores, como forças mecânicas, hormônios e citocinas, dentre os quais se destacam a trombina, o Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF), o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a lactosilceramida, a Interleucina-1 e a LDL oxidada (Rueckschloss *et al.*, 2001).





**Figura III:** Diagrama esquemático que mostra a localização intracelular das diferentes isoformas de NADPH-oxidase (à direita) e a sua localização em diferentes tipos de células da parede vascular (à esquerda) (retirado de Drummond et al., 2011).

Outra fonte geradora de EROs é a xantina oxidase que utiliza a xantina, hipoxantina ou o NADH na geração de EROs enquanto a mieloperoxidase além de formar EROs utiliza o NO para gerar espécies reativas de nitrogênio provocando redução da biodisponibilidade do NO e aumento do estresse oxidativo (Harrison, 2002; Gaut *et al.*, 2002). As três isoformas da NOS também podem promover a formação de  $O_2^{\bullet-}$  quando estão desacopladas. Na eNOS o desacoplamento é causado pela ausência dos co-fatores L-arginina e tetrahidrobiopterina (BH4) (Vásquez-Vivar *et al.*, 1998; Andrew & Mayer, 1999). As mieloperoxidases são fontes geradores de EROs, que além de produzir radicais livres, utilizam o NO em suas reações, diminuindo a biodisponibilidade do mesmo e produzindo espécies reativas de nitrogênio (Taniyama & Griendling, 2003).

As três isoformas da SOD, a catalase e a glutathiona peroxidase constituem o principal sistema antioxidante que se contrapõe a ação das EROs. As diferentes isoformas da SOD, a SOD cobre/zinco (SOD-Cu/Zn; SOD1), SOD mitocondrial (SOD-Mn; SOD2) e a SOD extracelular (SOD-EC; SOD3), catalisam a reação que transforma de duas moléculas de ânion superóxido em  $H_2O_2$  e oxigênio. Das quais a SOD-EC, uma glicoproteína produzida em fibroblastos e células gliais, é a isoforma mais encontrada em vasos (McIntyre *et al.*, 1999). Outra enzima antioxidante é a glutathiona peroxidase, importante em baixos níveis de estresse oxidativo, transforma o  $H_2O_2$  em  $H_2O$ . Enquanto a catalase, importante antioxidante intracelular, é mais efetivo quando o estresse oxidativo está em altos níveis e participa da reação que transforma o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (Sindhu *et al.*, 2005; Cai, 2005). Em suma, a redução da atividade das enzimas antioxidantes resulta em aumento da formação de EROs levando à ações danosas aos vasos (Touyz & Schinffrin, 2004).

Quando há um desequilíbrio entre estes fatores citados, ou seja, aumento de EROs e redução do sistema antioxidante, surgem alterações e doenças em vários sistemas e órgãos especialmente o sistema cardiovascular (Griendling & Fitzgerald, 2003; Valko *et al.*, 2006). Segundo Patrick (2006) o aumento da produção de radicais livres e/ou depleção do sistema antioxidante podem ser os mecanismos pelos quais o

chumbo induz o estresse oxidativo. É descrito que o chumbo tem a capacidade de se ligar ao radical sulfidril (-SH) de proteínas, alterando atividade enzimática como exemplo, da glutathione peroxidase, a qual é inibida em situações de exposição ao metal. Estudos relatam que a concentração sanguínea de glutathione encontra-se reduzida em animais experimentais e humanos expostos ao chumbo (Patrick, 2006). Corroborando estes achados, a expressão da catalase e glutathione peroxidase está reduzida na exposição ao chumbo, levando a maior formação de  $H_2O_2$ , contribuindo com a inflamação e remodelamento cardiovascular. Como o  $H_2O_2$  é substrato para a produção de  $OH^\cdot$ , este radical também está aumentado em animais expostos ao metal (Ding *et al.* 2000). Gil-Longo & Gonzáles-Vazquez (2005) demonstraram em artérias mesentéricas que o  $H_2O_2$  pode atuar tanto como fator vasoconstritor como vasodilatador.

Alterações de fatores vasodilatadores e vasoconstritores observados na hipertensão podem estar relacionados com o aumento das EROs, uma vez que os radicais livres reagem com o NO provocando oxidação ou inativação local deste fator relaxante derivado do endotélio (Ding *et al.*, 2000; Vaziri, 2008). Gonick *et al.* (1997), mostraram que o aumento de radicais livres promove acúmulo de malondialdeído (MDA), produto de peroxidação lipídica, em rins de ratos expostos ao chumbo. Os radicais livres reagem com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e, portanto um indicador de peroxidação lipídica. Esta observação sustenta a presença do estresse oxidativo em animais expostos ao chumbo. Em acordo, estudos em trabalhadores expostos ao chumbo com aumento significativo da concentração sanguínea de chumbo evidenciaram o aumento da pressão arterial e das concentrações de MDA plasmáticas (Khan 2008; Kasperczyk *et al.*, 2008).

#### **1.6.5 Relação recíproca entre espécies reativas de oxigênio e prostanoídes.**

Por outro lado, a COX pode produzir diretamente ROS, em parte devido à sua capacidade para co-oxidar substâncias como o NADPH (Tang *et al.*, 2007; Félétou *et al.*, 2011). Além disso, os produtos derivados da COX podem funcionar como estímulos autócrinos de ROS (Hernanz *et al.*, 2014). Inibidores selectivos da COX-2

e a deleção da COX-2 diminui o estresse oxidativo vascular (Stichtenoth *et al*, 2005; Wu *et al*, 2005; Wu *et al*, 2011; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). No entanto, não está claro se este efeito é mediado pela inibição de COX-2 que está associada à produção de ROS ou por inibição da síntese de prostanóides que podem regular diretamente a expressão e a atividade de várias fontes de ROS.

O nosso grupo e outros têm relatado uma relação recíproca entre COX-2 e NOX. Assim, em células de fígado humano de forbol 12-miristato 13-acetato inicia uma via na qual a ativação de NOX-1 controla a expressão e a atividade de COX-2, que por sua vez induz a expressão de NOX-4 através da ativação dos receptores EP4 (Sancho *et al.*, 2011). Ao nível vascular, tratamentos com antioxidantes diminuíram a expressão e atividade de COX-2 em modelos de hipertensão animais. Por outro lado, inibidores selectivos da COX-2 diminuíram o aumento do estresse oxidativo associado à hipertensão (Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Mais importante esta relação recíproca teve um papel na alteração da função vascular e hipertensão (Martínez-Revelles *et al.*, 2013). No entanto, o impacto dessa relação na remodelação vascular é desconhecido.

### 1.7 PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS - MAPK

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são proteína Serina/Treonina quinases que convertem estímulos extracelulares em uma ampla gama de respostas celulares (Chang *et al*, 2001; Chen *et al*, 2001). As MAPKs estão entre as mais antigas vias de transdução de sinal e são amplamente utilizadas ao longo da evolução em muitos processos fisiológicos (Widmann *et al.*, 1999), regulando a proliferação celular, diferenciação, inflamação e apoptose (Yang *et al.*, 2003). Sua regulação se dá por estímulos extracelulares como fator de crescimento, citocinas e estresse ambiental.

As MAPKs convencionais compreendem as quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), quinase JUN N-terminal 1/2/3 (JNK1/2/3), as isoformas de p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e ERK5 (Chen *et al.*, 2001; Kyriakis & Avruch, 2001; Pearson *et al.*, 2001), estando implicadas na modulação da sobrevivência ou morte celular, proliferação celular, diferenciação e adaptação. As MAPKs atípicas têm

particularidades e compreendem ERK3/4, ERK7 e quinase Nemo-like (NLK) (Coulombe & Meloche, 2007).

Os grupos mais estudados de MAPKs em mamíferos são a ERK1/2, JNKs e as isoformas da p38. A fosforilação dessas proteínas é essencial para a atividade enzimática. ERK1 e ERK2 são ativadas por mitógenos incluindo principalmente fatores de crescimento, resposta a insulina e citocinas (Raman *et al.*, 2007). Tem papel central na proliferação celular e sobrevivência celular (Ferrell, 1996), entretanto, existem crescentes evidências implicando essas quinases também na promoção da morte celular (Chu *et al.*, 2004). ERK1/2 são expressas em graus diferentes em todos os tecidos, com níveis particularmente elevados no cérebro, músculo esquelético, timo e coração (Boulton *et al.*, 1990). Sua regulação se dá através de MEK1/2, que por sua vez é ativada por Raf quinase, Raf-1 (Ferrell, 1996). Em células quiescentes, todos os componentes de ERK1/2 têm uma localização citoplasmática, mas após estimulação extracelular, uma proporção significativa de ERK1/2 acumula-se no núcleo (Chen *et al.*, 1992; Lenormand *et al.*, 1993). A atividade de ERK1/2 é rapidamente estimulada por agentes mitogênicos, e em células normais, a ativação sustentada destas quinases é necessária para a progressão eficiente da fase G1 para a fase S do ciclo celular.

Mecanismos de ativação de ERK1/2 envolve fator de crescimento ligando ao domínio do receptor tirosina quinase extracelular, resultando na dimerização do receptor e autofosforilação de resíduos de tirosina no domínio intracelular do receptor. Assim, promove ativação de Ras, proteína-G, Raf quinases, MEK1/2 e finalmente ERK1/2. MEK1/2 ativa ERK1/2 por fosforilação (Burkhard *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 1998). No núcleo, ERK1/2 são responsáveis pela fosforilação de múltiplos fatores de transcrição (Mayr and Montminy, 2001; West *et al.*, 2002) regulando a expressão gênica e a plasticidade sináptica no sistema nervoso central (Kandel 2001; Sweatt, 2004). Foi demonstrado em células astrocitomas 1321N1 humanas que o chumbo é capaz de induzir a síntese de DNA e proliferação celular por ativar MEK1/2 e ERK1/2, sendo este efeito dependente de PKC (Hailing *et al.*, 2001).

As enzimas MAPKs p38 estão envolvidas em eventos apoptóticos e pro-inflamatórios (Mielke & Herdegen, 2000). Sua ativação esta geralmente associada com estresse ambiental como temperatura, condição osmótica, estresse oxidativo, a

exposição à citocinas ou tóxicos, incluindo radiação UV, hipóxia, isquemia, interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) (Mielke & Herdegen, 2000). As isoformas da p38 estão presentes nos núcleos e citoplasmas das células quiescentes (Ben-Levy *et al.*, 1998) e foi demonstrado que se acumulam nos núcleos das células sujeitas a certas tensões (Raingeaud *et al.*, 1995). A MAPK p38 também tem mostrado desempenhar funções na proliferação e sobrevivência celular.

As isoformas JNK são fortemente ativadas em resposta a estresse celular, incluindo o choque térmico, radiação ionizante, o estresse oxidativo, agentes que danificam o DNA, citocinas, radiação UV, os inibidores de síntese de proteínas e de DNA e em menor extensão por fatores de crescimento (Bogoyevitch *et al.*, 2010). JNK1 e JNK2 são bem distribuídas pelos tecidos, enquanto JNK3 parece ser primariamente localizado em tecidos neuronais, testículo e miócitos cardíacos (Bode & Dong, 2007). Vem sendo demonstrado que JNK1 e JNK2 desempenham papel importante no controle da proliferação celular e também estão associados com a promoção da inflamação e a morte celular programada (Tibbles *et al.*, 1999;. Chen *et al.*, 2001).

Alguns estudos ligam a via dos prostanóides com a ativação das cascatas de sinalização das MAPK e a indução do estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Segundo Schieven (2009) a expressão da COX-2 é induzida por inflamação e estímulos por mitógenos (Vane *et al.* 1998; Lasa *et al.*, 2000), sendo regulado pela MAPK p38 em diferentes tipos celulares (Schieven, 2009).

Cordova *et al.* (2004), demonstraram que fatias de hipocampo expostas ao Pb agudamente *in vitro* por 3h, ou obtidas de ratos expostos *in vivo* (8-12 dias pós nascimento), mostraram ativação de ERK1/2 e p38. Outros trabalhos têm demonstrado que o Pb pode modular vias das MAPKs em uma variedade de células (Ramesh *et al.*, 1999; Leal *et al.*, 2002)., entretanto em CMLVs não tem descrito na literatura.

Diante do exposto, vimos que vários trabalhos relacionam a exposição ao chumbo com as alterações cardiovasculares (Sharifi *et al.*, 2004; Vaziri, 2008). Estas alterações foram observadas em sua maioria em estudos crônicos com alta concentração de chumbo avaliando principalmente artérias de condutância. Portanto, faz-se necessário a análise das ações do chumbo sobre artérias de resistência uma vez que estas artérias contribuem de maneira importante para o

controle da resistência vascular, influenciado diretamente a pressão arterial. Assim, nosso trabalho mostra os efeitos de baixas concentrações de chumbo sobre a reatividade de artérias de condutância e de resistência.

Além disso, e apesar da extensa documentação dos efeitos tóxicos do chumbo no sistema cardiovascular, uma elucidação mais detalhada dos alvos celulares e mecanismos através dos quais o chumbo exerce os seus efeitos precisa ser mais estudado. Neste trabalho, nosso intuito também foi verificar vias intracelulares que participam dos danos induzidos pelo chumbo, após exposição crônica a baixa concentração, em CMLVs especialmente o papel do estresse oxidativo e da ciclooxigenase-2. Os quais promoveram alterações na reatividade vascular de artérias aorta e mesentéricas induzida por 30 dias de tratamento com uma baixa concentração de chumbo. Investigando também a participação das MAPKs ERK1/2, p38 e JNK1/2 e suas implicações sobre o estresse oxidativo e via da ciclooxigenase-2 nas alterações vasculares induzidas pelo chumbo.

***OBJETIVO***

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a exposição crônica a baixa concentração de chumbo afeta a função vascular de aorta e mesentérica de resistência, e avaliar o papel do estresse oxidativo, das vias dependentes da ciclooxigenase-2 e das MAPKs, nas alterações vasculares induzidas pelo chumbo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar a concentração sanguínea de chumbo após exposição ao metal, 30 dias (1a dose: 10 ug/100 g; doses subsequentes: 0,125 ug/100 g, por via intramuscular).
2. Avaliar se a exposição ao chumbo altera a pressão arterial sistólica, a hipertrofia cardíaca e o peso corporal.
3. Investigar em artérias de condutância e de resistência se a exposição ao chumbo produz alterações nas respostas vasoconstrictoras e vasodilatadores dependentes ou independentes do endotélio.
4. Investigar se a exposição crônica ao chumbo altera a participação do óxido nítrico, do estresse oxidativo e dos prostanóides derivados da via da COX na resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina.
5. Investigar se a exposição crônica ao chumbo modifica a produção vascular de ânion superóxido e a expressão da SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, gp91phox e COX-2.
6. Avaliar, em células musculares lisas vasculares de aorta de ratos, se a exposição durante 48 horas a 20 µg/dL de chumbo modifica a produção de ânion superóxido e a atividade da NADPH oxidase.
7. Avaliar o papel de NOX1 e de prostanoídes da COX-2 sobre a atividade da NADPH oxidase em células musculares lisas expostas a chumbo.
8. Avaliar se a exposição ao chumbo altera a expressão gênica ou protéica da NADPH oxidase (NOX1 e NOX4), da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) e da superóxido dismutase (isóformas SOD-Mn, SOD-Cu/Zn e SOD-EC) em células



musculares lisas. Estudaremos também se existe uma regulação recíproca na expressão gênica de NOX e COX-2.

9. Avaliar os efeitos do chumbo sobre a via de sinalização das MAPKs e seus efeitos sobre a expressão gênica de COX-2, NOX1 e NOX4.

10. Avaliar os efeitos do chumbo sobre a migração e proliferação celular.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar e Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus albinus*), com 4 meses de idade. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 063/2011) e pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Universidade Autónoma de Madrid, Espanha (CEI-UAM 31-759). Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as diretrizes para a pesquisa biomédica como indicado pelas Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental, o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicados pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH publicação No. 85-23, revista em 1996) e com as atuais leis espanholas e europeias (RD 223/88 Ministério de Administrações Públicas, do MAPA, e 609/86).

Os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Para realização dos protocolos de reatividade vascular, os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (veículo-salina, *i.m.*) ou tratados com acetato de chumbo por 30 dias (1ª dose: 10 µg/100 g, doses subsequentes: 0,125 µg/100 g, *i.m.*, para cobrir as perdas diárias). O tratamento foi realizado com injeções intramusculares de acetato de chumbo na face interna das patas traseiras. No final do tratamento, os ratos foram anestesiados e eutanasiados. As aortas torácicas e mesentéricas de resistência foram cuidadosamente dissecadas e o tecido adiposo e conjuntivo removidos. As aortas foram divididas em segmentos cilíndricos de 4 mm de comprimento e as mesentéricas foram divididos em segmentos de 2 mm. Para realização dos protocolos em células musculares lisas vasculares (CMLVs), aortas torácicas foram isoladas e processadas para a obtenção de culturas primárias de células musculares lisas, e assim realizar experimentos em cultura de células.

##### 3.1.1 Dosagem do chumbo sanguíneo.

A concentração sanguínea do chumbo após 30 dias de tratamento foi analisada nas amostras sanguíneas de ratos por meio da técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (Nexlon 300D, PerkinElmer, USA) (ICP-MS) após

decomposição ácida das amostras de sangue como previamente descrito (Liu *et al.*, 1996). As amostras foram medidas em triplicata. Estas análises foram feitas no Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo.

### **3.1.2 Avaliação da pressão arterial sistólica.**

Para avaliar o efeito da exposição ao acetato de chumbo sobre os valores pressóricos dos animais, a pressão arterial sistólica, de animais dos grupos controle e chumbo, foi verificada semanalmente, de maneira indireta (Grizzo & Cordelline 2008), pelo método de pletismografia de cauda (IITC Life Science non-invasive blood pressure, versão 1.35). Antes de fazer a primeira medida da PAS os animais foram submetidos a um período de três dias de adaptação para que os mesmos não ficassem estressados durante o procedimento. No dia da medida da PAS os animais eram colocados em um cilindro de acrílico (holter), a cauda era conectada ao sensor de pressão do manguito (cuff) que por sua vez estava conectado ao amplificador e este ao computador para obtenção dos dados pressóricos. Os cilindros com os ratos foram colocados em uma estufa a 37 °C, por um período de 15 minutos, a fim de promover dilatação da artéria caudal, possibilitando melhor aferição da PAS. Em seguida, um manguito de pressão com um sensor de pulso era conectado à cauda desses animais. Foram realizadas dez medidas em cada animal, das quais foi obtida a média aritmética da PAS de cada animal.

### **3.1.3 Avaliação do peso corporal e hipertrofia.**

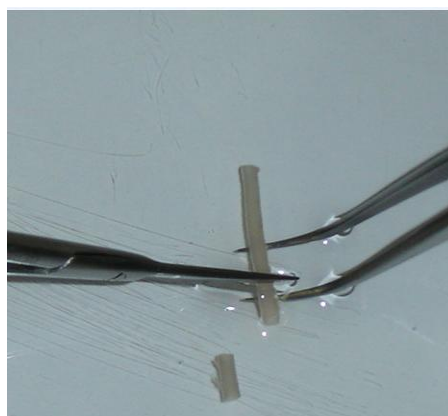
O peso dos animais foi mensurado toda semana, ao longo das 4 semanas de tratamento. Ao final de 30 dias, os animais foram anestesiados com uretana (1.2 mg/kg *i.p.*), em seguida, eutanaziados e exsanguinados. O tórax foi aberto e o coração cuidadosamente removido para obtenção do peso do órgão, com a finalidade de se estimar a hipertrofia cardíaca. O comprimento da tíbia, obtido para estimar o crescimento ósseo, foi mensurado com paquímetro, sendo utilizado para normalização do peso do coração em relação ao crescimento do animal e, assim, determinar uma possível hipertrofia cardíaca. A razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia foi calculada. A tíbia foi removida após a extração da aorta, descrita a seguir.

## 3.2 REATIVIDADE VASCULAR

### 3.2.1 Avaliação da função vascular – Aorta.

Ao final dos 30 dias de tratamento com acetato de chumbo ou solução salina isotônica, a função vascular foi investigada através de estudos de reatividade vascular *in vitro* em segmentos de aorta em preparação de banho de órgãos com a finalidade de avaliar os efeitos de baixas concentrações de chumbo sobre a reatividade vascular.

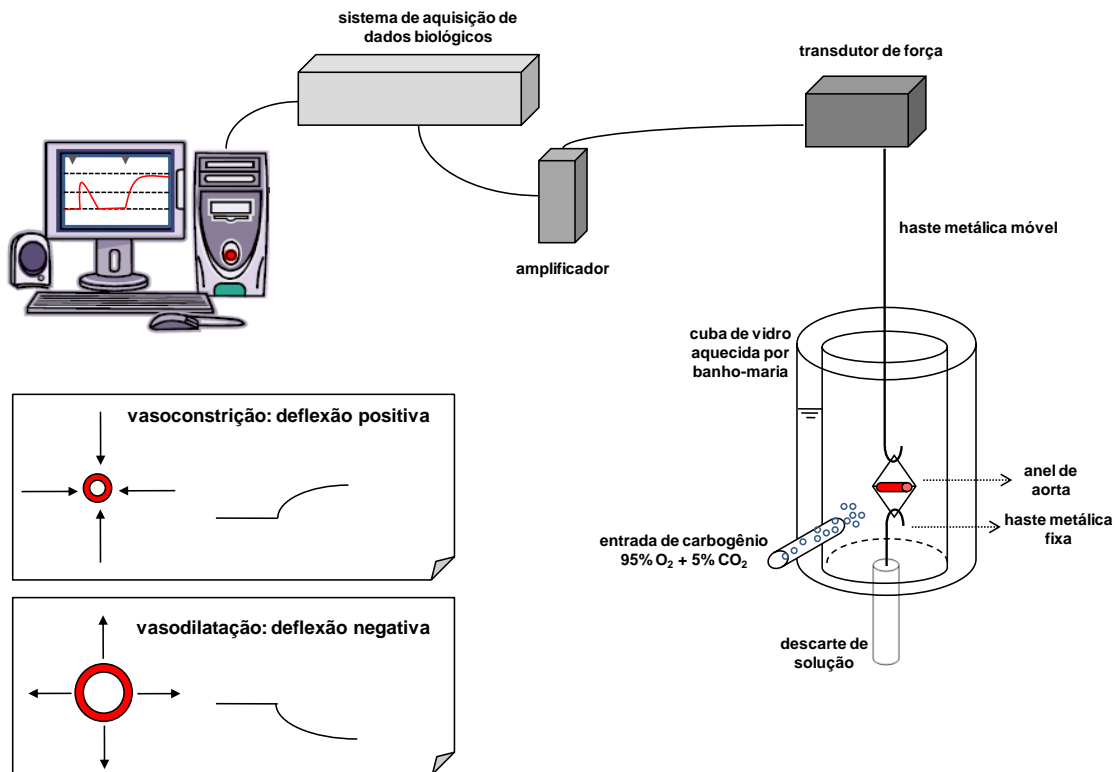
A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,17;  $\text{NaHCO}_3$  24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$ , como na Figura IV. Esta solução foi mantida com pH 7,4. Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento.



**Figura IV:** Aorta torácica, de rato Wistar, imersa em solução fria de Krebs-Henseleit, após a remoção do tecido conectivo e adiposo, sendo dividida em segmentos de 4 mm (modificado de Fiorim, 2011).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit aquecida a  $36 \pm 0,5$  °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma a ficar paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado

verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (GRASS<sup>®</sup> Force-displacement transducer FT03, Mass) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA) e este a um computador (PC Pentium) (Figura V).



**Figura V:** Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro* (adaptado de Silveira, 2010).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,9 a 1,3 gramas, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura VI A).

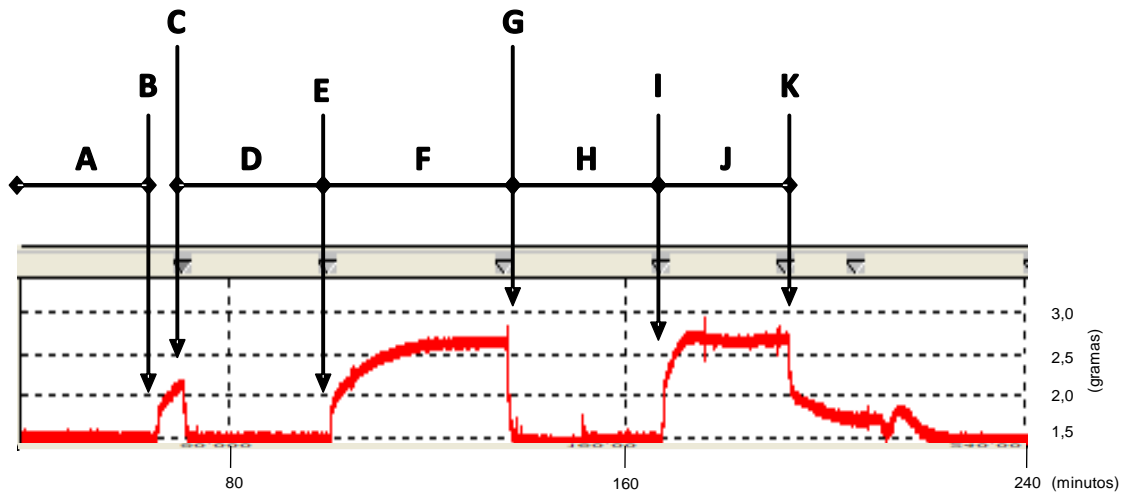
### 3.2.1.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular.

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho cloreto de potássio (KCl) 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com

solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura VI B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura VI D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de aproximadamente 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura VI E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (0.9 a 1,3 gramas) e, depois de 30 minutos (Figura VI G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

### **3.2.1.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio.**

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (1  $\mu$ M). Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (10  $\mu$ M) foi aplicada (Figura VI I, J, K). Os anéis que relaxaram menos que 80% do platô eram descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10%.



**Figura VI:** Registro com curvas representativas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. **Teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl:** A) Período de estabilização inicial (45 min com força basal de 1,5 gramas); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). **Avaliação da integridade funcional do endotélio:** I) Contração com fenilefrina 1  $\mu$ M; J) Contração induzida pela fenilefrina; K) Adição de acetilcolina 10  $\mu$ M. O tempo foi registrado em minutos, representado no eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força registrada em gramas (g), observada no eixo vertical (adaptado de Dias, 2011).

### 3.2.2 Avaliação da função vascular - Artéria mesentérica

A análise da reatividade das artérias mesentéricas de ratos foi realizada de acordo com método descrito por Mulvany & Halpern (1977). O intestino dos animais (Figura VII) era removido para retirar o mesentério. Este era mantido em solução de Krebs Henseleit (em mM: NaCl 115, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4,7, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, glicose 11,1 e Na<sub>2</sub>EDTA 0,01) aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> a 4°C e pH 7.4 durante o procedimento de dissecação. O terceiro ramo da artéria mesentérica foi isolado com o auxílio de um microscópio de dissecação e segmentos de, aproximadamente, 2 mm de longitude foram cortados e mantidos a 4° C. Após preencher as câmaras do miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) com Krebs Henseleit, dois fios de tungstênio (40  $\mu$ m de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias para medida de força isométrica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de força isométrica e o outro fio

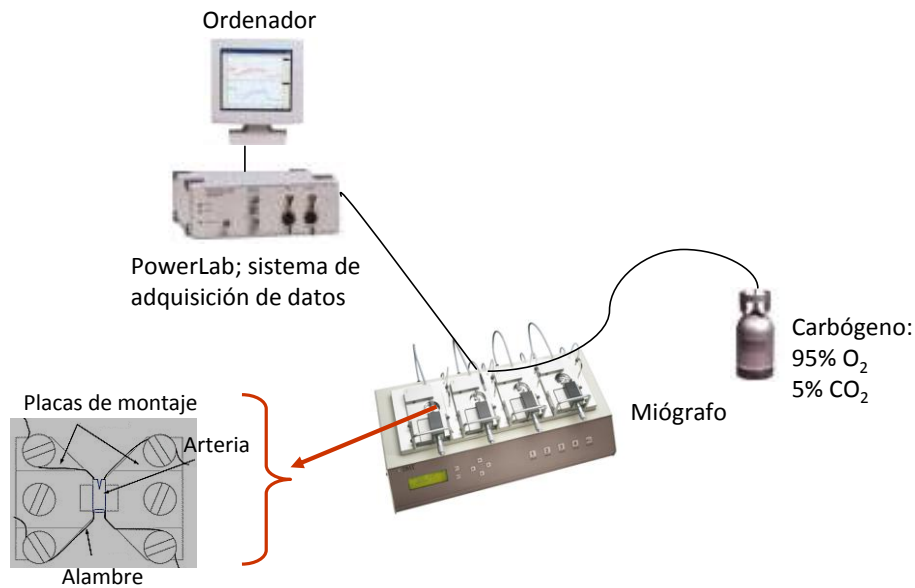


conectado a um micromanipulador que permitia o estiramento das artérias. Esse miógrafo estava conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e a um computador (PC Pentium) (Figura VIII).



**Figura VII:** Fotografia do leito mesentérico mostrando as artérias com suas ramificações.

Após período de 30 minutos de estabilização em solução de Krebs Henseleit gaseificada com mistura carbogênica (95% de  $O_2$  e 5% de  $CO_2$ , pH 7,4, 37 ° C), as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão: diâmetro interno foi calculada e então foi determinada a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado in situ (L100). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L1, calculada como  $L1 = 0,90 \times L100$ , circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo (Mulvany & Halpern, 1977).



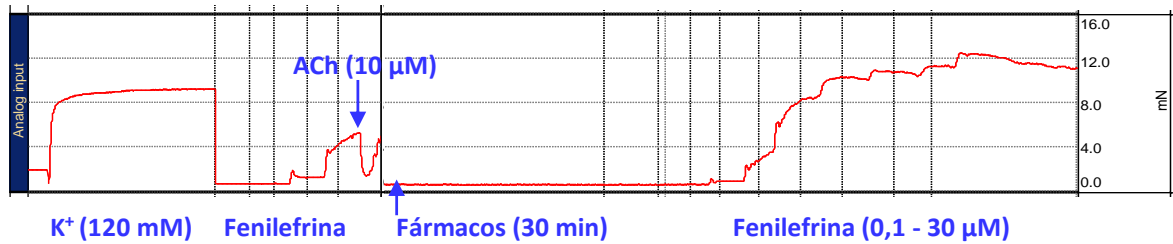
**Figura VIII:** Esquema representativo do miógrafo de arame onde foram realizados os experimentos de reatividade vascular.

### 3.2.2.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular.

Após estabilização em sua tensão de estiramento ideal, os segmentos de artérias mesentéricas foram expostos a uma solução com concentração alta de potássio (120 mM, a composição é similar ao Krebs Henseleit, no entanto o NaCl foi substituído por KCl em concentração equimolar) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos (Figura IX). A solução foi novamente trocada para solução de Krebs-Henseleit normal e após retorno à sua tensão basal, determinou-se a presença de endotélio.

### 3.2.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio.

Para comprovar a integridade endotelial, as artérias foram pré-contraídas com uma concentração de fenilefrina (FE) suficiente para produzir 50% da contração produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 120 mM, e então o relaxamento vascular foi obtido por exposição a 10  $\mu$ M de ACh, como se observa na Figura IX. Somente foram utilizadas nesse estudo as artérias com relaxamento superior a 80% da contração induzida pela FE. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10%.



**Figura IX:** Esquema geral representativo de protocolo experimental realizado para avaliar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos. *ACh*=acetilcolina (adaptado de Wiggers, 2008).

### 3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS – REATIVIDADE VASCULAR

Após a avaliação da integridade do músculo liso e endotélio, os diferentes anéis de aorta e mesentérica seguiram protocolos diferentes. Neste caso, os anéis foram lavados três vezes e passaram por um período de estabilização de 30 minutos, mantendo a tensão basal. Os protocolos descritos a seguir, foram realizados nos dois leitos vasculares, aorta e mesentérica.

#### 3.3.1 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a resposta constritora à fenilefrina, dilatadora a acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em artérias aorta e mesentérica de ratos.

Após 30 minutos de estabilização, para investigar o efeito do tratamento com o chumbo sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, agonista alfa-adrenérgico, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina, na concentração de 0,1 nM a 0,3 mM, de maneira cumulativa nos dois grupos estudados totalizando 14 distintas concentrações (Figura X, A). O efeito frente a esta concentração crescente de fenilefrina foi normalizado em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (75 mM e 120 mM), que foi considerada 100% da resposta contrátil.

Para estudar o efeito do tratamento sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (0,01 nM a 0,3 mM). Para tal, os anéis de aorta e mesentérica com endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina 1 µM. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (Figura X, B). O efeito

vasodilatador frente à acetilcolina foi calculado como percentual de relaxamento considerando o platô de contração à fenilefrina, sendo este platô considerado 100% da contração.

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio. Em segmentos de artérias controles (sem fármacos) pré-contraídas com FE 1  $\mu\text{M}$  (concentração suficiente para produzir 50% da contração ao KCl) foi realizado uma curva concentração resposta ao doador de NO, nitroprussiato de sódio (0,01 nM a 0,3 mM).

### **3.3.2 Efeito do tratamento por 30 dias com acetato de chumbo sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina.**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta e mesentérica com endotélio íntegro ( $E^+$ ) e sem endotélio ( $E^-$ ).

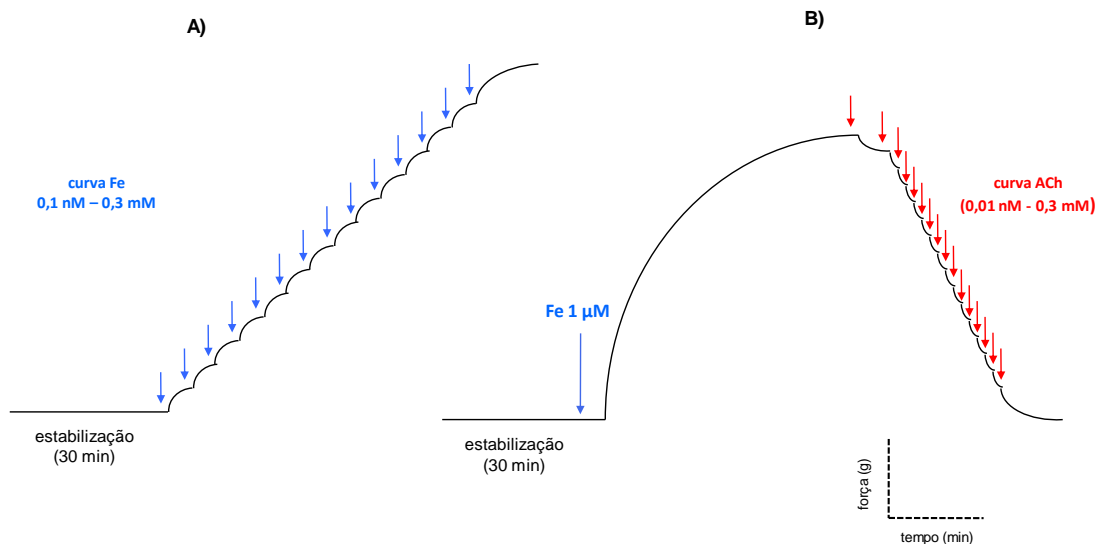
As células endoteliais de aorta foram removidas mecanicamente através do uso de fio polido e rígido de aço inoxidável, antes da adaptação dos anéis de aorta ao aparato experimental. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados suavemente na parede interna do anel, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina (10  $\mu\text{M}$ ) induzir o relaxamento, após a pré-contração com fenilefrina. Consideramos a incapacidade de relaxamento quando inferior a 10 %, calculada em relação ao máximo de contração à fenilefrina, como já descrito. A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentrações-resposta à fenilefrina (0,1 nM a 0,3 mM).

Em artérias mesentéricas o endotélio foi removido de acordo com a metodologia descrita por Osol *et al.* (1989). Para isso, um fio de cabelo de cavalo era lavado com etanol e com solução de Krebs. Após a montagem das artérias na câmara do miógrafo de arames, o fio de cabelo era inserido no lúmen das artérias e movimentos de fricção contra a parede arterial eram realizados. Depois a câmara com o anel era adaptado no equipamento e um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos era feito. 120 mM de KCl eram administrados às preparações com a finalidade de avaliar a viabilidade arterial e analisar uma possível

lesão muscular após a remoção mecânica do endotélio, o qual era confirmada pela incapacidade de contração após incubação com KCl. Após 30 min da contração ao KCl, as preparações eram pré-contraídas com fenilefrina e a ausência do endotélio comprovada pela incapacidade da acetilcolina (10  $\mu$ M) induzir relaxamento. Após a confirmação da ausência do endotélio, as preparações eram lavadas e 30 minutos após o retorno à tensão basal, curvas concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM a 0,3 mM) foram realizadas.

### 3.3.3 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos nos efeitos do tratamento por 30 dias com acetato de chumbo sobre a resposta à fenilefrina.

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da mesma forma. Com a finalidade de avaliar a via pela qual o tratamento com acetato de chumbo modifica a reatividade vascular, alguns fármacos foram utilizados. Após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos, e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM), (Figura X A). Este protocolo foi realizado nos dois leitos, aorta e mesentérica.



**Figura X:** Esquema representativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE e/ou à ACh (adaptado de Batista, 2014).

### **3.3.3.1 Influência do tratamento por 30 dias com acetato de chumbo na via do óxido nítrico.**

Para avaliar se o tratamento com acetato de chumbo altera a participação do óxido nítrico na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta e mesentérica foram incubados com um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100  $\mu$ M). Para estimar a biodisponibilidade de NO, foi calculada a diferença das áreas abaixo da curva de fenilefrina, na ausência e na presença de acetato de chumbo, associada ao L-NAME (100  $\mu$ M) em relação à situação controle.

### **3.3.3.2 Influência do tratamento por 30 dias com acetato de chumbo sobre os radicais livres na resposta contrátil à fenilefrina.**

Vários estudos mostram que o aumento da produção de EROs contribui para a disfunção endotelial na hipertensão arterial (Lassègue *et al.*, 2012; Martínez-Revelles *et al.*, 2013; Dinh *et al.*, 2014). Para verificar o envolvimento de EROs no efeito provocado pela exposição ao acetato de chumbo na resposta contrátil à fenilefrina, uma vez que a produção de espécies reativas altera a reatividade vascular, principalmente por reduzir a biodisponibilidade de NO, foram utilizados: a apocinina (Apo, 30  $\mu$ M), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, uma das principais enzimas formadoras de radicais livres; a superóxido dismutase (SOD, 150 U ml<sup>-1</sup>), um importante anti-oxidante fisiológico, os quais foram colocados no banho 30 minutos antes da realização das curvas com fenilefrina. A SOD foi utilizada apenas em artérias mesentéricas.

### **3.3.4 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico no tratamento por 30 dias com acetato de chumbo sobre a resposta contrátil à fenilefrina.**

Com a finalidade de investigar a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, os anéis isolados de aorta e mesentéricas foram incubados com indometacina (10  $\mu$ M), um inibidor inespecífico da ciclooxigenase. Em mesentéricas, incubamos ainda um antagonista do receptor EP<sub>1</sub> (de prostaglandina E<sub>2</sub>) o SC-19220 (10  $\mu$ M).

### 3.6 CULTURA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA.

A obtenção de células para cultura primária de células musculares lisas vasculares foi realizada pelo método de explante tissular, conforme descrito por Martín e colaboradores (2012), utilizando-se aortas de ratos Sprague-Doley (SD) controles. Cada cultivo celular procedeu de aortas de aproximadamente três ratos, de maneira a minimizar a variabilidade que existe entre os animais.

#### 3.6.1 Obtenção das células musculares lisas vasculares.

Culturas primárias de CMLVs foram obtidas de aortas torácicas de ratos SD de quatro meses de idade. Após eutanásia dos animais com CO<sub>2</sub>, o tórax foi exposto e a aorta torácica foi assepticamente removida e isolada, colocada em um tubo com o meio de cultura Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)/F-10 (HAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), contendo 0,1% de BSA, L-glutamina (1 g/L), 200 U/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen, Paisley, Reino Unido), a fim de reduzir a possibilidade de contaminação durante a manipulação.

A partir desse ponto, todos os procedimentos foram realizados dentro de uma capela de fluxo laminar NU 425-300 Classe 2 (Nuair, Plymouth, MN, EUA), localizada numa sala específica para cultura celular. Para permitir uma melhor manipulação das artérias, elas foram colocadas em uma placa de petri cuja superfície era recoberta com silicone (Sylgard- silicone elastomero, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA), e fixadas nas extremidades com 2 agulhas. Assim, com auxílio de pinças de dissecação, foram delicadamente eliminados os tecidos conectivos perivasculares e adiposo da aorta. Uma vez limpo, e para facilitar a remoção mecânica da adventícia vascular, as artérias foram incubadas com colagenase Tipo II (2 mg/mL) (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, EUA) dissolvida em DMEM/F-12 suplementado com BSA (0,1%) e antibióticos (Penicilina e estreptomicina - P/S), durante 30 min a 37 °C em uma incubadora NU Autoflow 4750 (NuAIRE, Plymouth, Minnesota, EUA) com 95% de ar comprimido e 5% de CO<sub>2</sub>.

Em seguida, a camada adventícia vascular foi removida com o auxílio pinças. A artéria então foi cortada em fragmentos de 2 a 3 mm de longitude, os quais foram colocados em placas de 6 poços de 2 cm<sup>2</sup> de área (6-well Tissue Culture Plate,

Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), com 2 mL de meio de cultura DMEM/F-12 HAM suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS, sigma), descomplementado, e com uma mistura de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL).

As placas, então, permaneciam na incubadora a 37 °C, em atmosfera umidificada com 95% de ar comprimido e 5% de CO<sub>2</sub>, durante toda a cultura celular. Diariamente, os fragmentos das aortas eram observados sob uma lupa Leica 6SD (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

### **3.6.2 Crescimento das culturas primárias de células de músculo liso.**

Transcorridos 7-10 dias se comprovou o aparecimento de CMLVs aderidas à placa procedentes dos explantes de tecidos. Durante esse tempo, o meio de crescimento foi adicionado todos os dias e trocado a cada 3 dias.

Uma vez que se tenha atingido 50% de confluência, os fragmentos de aorta foram retirados das placas. As células cresceram por mais 2-3 dias em meio de cultura DMEM/F-12 HAM suplementado com FBS e P/S. Quando alcançou uma confluência de 60-70%, ou seja, quando formavam uma monocamada uniforme de células, e aproximadamente por volta do 15º dia após a extração, as células foram despregadas das placas.

Para isto, as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS), sem cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e sem magnésio (Mg<sup>2+</sup>) (Invitrogen), mantendo-se a terceira lavagem de 1 min a 37 °C. O PBS sem Ca<sup>2+</sup> e sem Mg<sup>2+</sup> favorece a separação das células da placa e de uma das outras, pois esses cátions são essenciais à atividade das integrinas, proteínas que promovem a adesão celular. À continuação, foi retirado o PBS das placas e foi adicionado tripsina-EDTA a 0,05% durante 1 minuto na incubadora a 37 °C, com o objetivo de facilitar a suspensão das células do fundo das placas. A tripsina é uma protease que digere proteínas de adesão, como as que aderem as células à placa. Por sua vez, o EDTA é um quelante dos cátions, impedindo-os de agir como co-fatores da atividade das proteínas de adesão. Em seguida, a tripsina foi neutralizada adicionando DMEM/F-12 HAM com FBS a 10% e as células foram ressuspensas em meio de cultura e colocadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (*T-75 Cell Culture Flask*, Sarstedt, Nümbrecht,



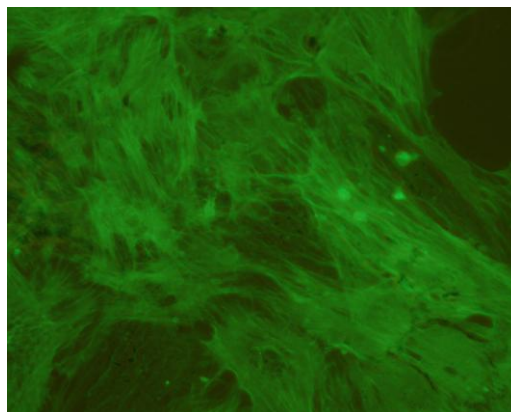
Alemanha), para estimular o crescimento celular e aumentar a quantidade de células viáveis para o trabalho.

As células recém explantadas das aortas constituíam células em passagem zero (0) e a primeira vez que eram expostas a solução de tripsina e ressuspensas tornavam-se células em passagem um (1) e assim sucessivamente. Cada tripsinização ou passagem foi realizada com uma frequência média de entre 5-7 dias. Os experimentos foram realizadas em subculturas de CMLV correspondentes as passagens compreendidas apenas entre 2 e 6, para evitar a transformação.

### **3.6.3 Caracterização das células de músculo liso vascular.**

As CMLVs em cultura foram examinadas morfológicamente por microscopia ótica de contraste de fase (Zeiss microscópio invertido, Axiovert 25, Jena, Alemanha). Durante o seu crescimento, as células formaram várias monocamadas sobrepostas, originando uma estrutura morfológica típico de músculo liso cultivado, chamada estrutura "montes e vales" (hills and valleys). As células mantiveram a morfologia do músculo liso ao longo do seu crescimento em todas as sub-culturas utilizadas para diferentes experimentos.

O fenótipo das CMLVs em cultura foi determinado por técnicas de imunocitoquímica, que determinou a presença de  $\alpha$ -actina, uma vez que é a primeira proteína que se expressa nas células do músculo liso. Para isso, as células foram incubadas com anticorpo primário anti- $\alpha$ -actina monoclonal específico, procedente de camundongo (1:200, Sigma Chemical Co.), seguido de incubação com o anticorpo secundário fluorescente anti-camundongo FITC (isotiocianato de fluoresceína) diluído 1:100 (Ex 494 nm; Em 518 nm), possibilitando a visualização das fibras de  $\alpha$ -actina, em verde. A fluorescência foi visualizada usando um microscópio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), utilizando lente objetiva de imersão de 63X<sub>azeite</sub> (zoom 2x) conforme fotografia a seguir (Figura XI).



**Figura XI:** Fotografia de CMLV em que aparece as fibras de  $\alpha$ -actina (verde).

#### **3.6.4 Protocolos experimentais em células de músculo liso vascular.**

Um dia antes do experimento com os distintos fármacos e do tratamento com chumbo, as células eram mantidas em jejum durante 24 horas em meio isento de soro (FBS), com o objetivo de manter as células em estado quiescente. Para isso, o meio DMEM/F-12 HAM com 10 % de FBS e antibióticos P/S foi removido e substituído por 2 mL de DMEM/F-12 HAM apenas com antibióticos P/S.

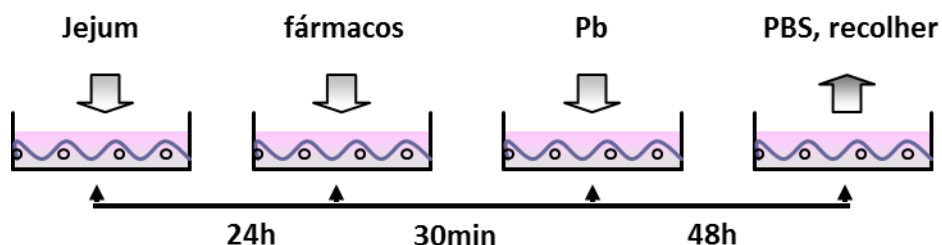
Na primeira sequência de experimentos, as CMLVs receberam apenas estímulos com diferentes concentrações de acetato de chumbo (10  $\mu\text{g/dL}$ , 20  $\mu\text{g/dL}$  e 100  $\mu\text{g/dL}$ ) durante 48h e 72h, ao final do jejum, para investigar a taxa de sobrevivência destas células na exposição ao metal e escolha da concentração de chumbo e tempo de exposição. Para isto, usamos o ensaio de redução de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio) seguindo o procedimento previamente descrito por Mosmann (1983). O ensaio de proliferação MTT é um ensaio colorimétrico para medir a atividade da redutase mitocondrial em células vivas. Ele se baseia na clivagem do sal amarelo tetrazólio (membrana permeável) para cristais de formazan azuis/púrpura por células metabolicamente ativas. Em resumo, após a incubação com acetato de chumbo em diferentes concentrações nos diferentes tempos, foi adicionado 0,5 mg/mL de MTT em cada poço e a incubação foi realizada a 37°C durante 2 h. O sal formazan formado foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), e a determinação colorimétrica foi realizada a 540 nm. Células controles sem acetato de chumbo foram consideradas como tendo 100% de viabilidade. A

viabilidade das CMLVs depois da exposição ao chumbo foi expressa como % do controle dentro de cada experimento.

A concentração de 20 µg/dL foi então definida para os experimentos em células, pois está próxima da concentração de chumbo que encontramos no sangue dos animais tratados por 30 dias com acetato de chumbo intramuscular, e não foi observado diferenças na viabilidade celular com esta concentração. O tempo de 48h foi preferido, pois já se trata de uma exposição crônica para cultura de células.

Para realização dos protocolos experimentais, após 24 horas de jejum (meio de cultura DMEM/F12 HAM livre de FBS e suplementado com BSA 0,1 % e antibióticos), as células quiescentes eram estimuladas com acetato de chumbo (20 µg/dL) ou com veículo (células controles), na presença ou ausência dos fármacos de escolha. Estes fármacos eram colocados 30 minutos antes do estímulo com chumbo e permanecia durante todo o tempo de incubação, 48h. Os fármacos usados para investigar as vias de interesse foram: o varredor de ânion superóxido tempol (10 µM), o inibidor de NOX-1 ML171 (0.5 µM), um varredor específico de ânion superóxido mitocondrial mito-TEMPO (5 µM) ou inibidores da COX-2 celecoxib (10 µM) e rofecoxib (10 µM) (Figura XII).

Em outro grupo de experimentos, células foram incubadas com chumbo em diferentes tempos de exposição (5 min-24 h) para avaliar o efeito do chumbo sobre a ativação das MAPK p38, ERK1/2, JNK e sobre a Akt. Por ultimo o efeito do inibidor de ERK1/2 U0126 (10 µM) e do inibidor da MAPK p38 SB203580 (10 µM) sobre os níveis de RNAm da COX-2, NOX-1 e NOX-4 foram avaliados em células expostas a 20 µg/dL por 48h.



**Figura XII:** esquema representativo do protocolo experimental utilizado em cultura de células de músculo liso de aorta.

Sendo assim, diversos experimentos foram realizados com a finalidade de investigar a participação do chumbo em células de músculo liso de aortas de ratos normotensos. Tais experimentos serão descritos em seguida, sendo eles: quantificação de RNAm de NOX1, NOX4 e COX-2 por qRT-PCR; produção de ânion superóxido; atividade da NADPH oxidase; quantificação de proteínas por técnica de Western Blot; migração celular e proliferação celular.

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO

Os níveis de RNAm foram determinados por RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) em tempo real (qRT-PCR) pelo método descrito por Chomczynski & Sacchi (1987) adaptado.

Para a extração de RNA de cultivos de CMLVs, uma vez finalizado os distintos estímulos/inibições, era retirado o meio de cultura contendo os fármacos e/ou inibidores das placas, sendo, em seguida, realizadas três lavagens com PBS frio com  $\text{Ca}^{2+}$  e com  $\text{Mg}^{2+}$ . As placas eram então congeladas até a realização dos experimentos. No dia da análise dos níveis de RNAm, adicionou 1 mL de *TRI-Reagent* (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) aos poços das placas, pipetando-o para cima e para baixo continuamente, para a lise e suspensão das células. O *TRI-Reagent* é solução específica para a extração e preservação do RNA total, produz a ruptura das células ao dissolver lipídios e precipitar proteínas, preservando a integridade do RNA.

Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. Esta mistura permaneceu em temperatura ambiente durante 5 minutos e então foi centrifugada a 12.000 xg, durante 15 minutos, a 4 °C. A adição do clorofórmio junto à centrifugação permite a separação das duas fases, uma orgânica e outra aquosa, na qual permanece o RNA.

Para precipitar o RNA total foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol e 10  $\mu\text{g}$  de glicogênio, cuja função é formar complexos com os ácidos nucleicos que permitam a formação de precipitados visíveis e facilmente manipuláveis. Essa mistura permaneceu 30 minutos a temperatura ambiente e foi posteriormente centrifugada a 12.000 xg, durante 30 minutos, a 4 °C. Os precipitados foram lavados com 800  $\mu\text{L}$  de etanol preparado a 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e foram

centrifugados a 4 °C a 10.000 xg para os lisados celulares, favorecendo, assim, a adesão de precipitados ao fundo do tubo evitando que se desintegram. Dando continuidade, o etanol foi retirado e os precipitados foram secados ao ar ambiente, para assegurar a completa eliminação do álcool, por se tratar de um potente inibidor das reações enzimáticas a que se submetem as amostras nos processos seguintes. Os precipitados foram ressuspensos em 10-15 µL de água DEPC filtrada e a quantificação do RNA total extraído foi calculado medindo-se a absorbância a um comprimento de onda de 260 nm em um espectrofotômetro (*Eppendorf Biophotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha*). As amostras foram armazenadas a -80 °C até realização da retrotranscrição.

Para evitar possíveis contaminações com DNA genômico, 1 µg de RNAm total foi tratado com DNase. O RNA foi, então, retrotranscrito a DNA complementar (DNAc) usando um kit comercial (*High-Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems, Califórnia, EUA*), sendo o protocolo desenvolvido de acordo com as instruções comerciais em 20 µL de volume de reação. A mistura foi processada em um termociclador (*Marterclycler Gradient, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha*), durante dez minutos a 25 °C e a duas horas a 37 °C. Ao final, foi adicionado mais um passo, a 70 °C durante 5 minutos para inativar a retrotranscriptase. Finalizada a retrotranscrição, e assumida eficácia de 100% na conversão de RNA total em DNAc, os DNAc obtidos se mantiveram a -20 °C até sua utilização posterior.

A PCR em tempo real foi desenvolvida utilizando o sistema ABI *Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Califórnia, EUA)* mediante corante fluorescente *SyBR Green Supermix with ROX*.

Foram realizadas curvas de concentração para determinar a quantidade de DNAc necessário de cada gene, a qual foi adicionado a uma mistura com a sonda descrita acima e o primer específico para amplificar o gene de interesse, sendo eles: COX-2 (FW: AAGGGAGTCTGGAACATTGTGAAC; RV: CAAATGTGATCTGGACGTCAACA), NOX-1 (FW: CGGCAGAAGGTCGTGATTA; RV: TGGAGCAGAGGTCAGAGT), NOX-4 (FW: GCCTCCATCAAGCCAAGA; RV: CCAGTCATCCAGTAGAGTGTT) and β2-microglobulin (FW: ACCCTGGTCTTTCTGGTGCTT; RV: TAGCAGTTCAGTATGTTCCGGCTT), sendo todos *SyBR Green (Bio-Rad Laboratories, California, EUA)*.

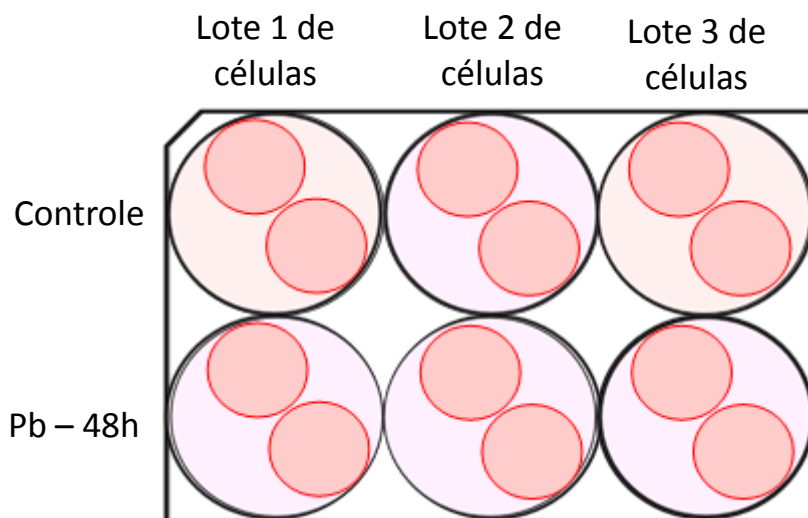
Os resultados da amplificação foram normalizados em relação aos dados obtidos da amplificação de genes cuja expressão é constante, independente da situação experimental dos tratamentos. Como controle endógeno foi utilizado o gene da  $\beta_2$ -microglobulina.

O programa de amplificação usado foi: 1<sup>o</sup>) desnaturalização inicial a 95 °C, por 30 segundos; e 2<sup>o</sup>) 40 ciclos a 95 °C por 5 segundos e a 60 °C por 30 segundos. No final da PCR, uma análise de curva de *melting* foi realizada para mostrar a especificidade do produto detectado. Para calcular o índice relativo da expressão gênica, foi empregado o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando amostras não tratadas para calibração (Livak & Schmittgen, 2001).

### 3.8 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO

Para verificar a influência da exposição ao acetato de chumbo sobre a produção de  $O_2^{\cdot-}$  foi utilizado a técnica de medida de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE). O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com  $O_2^{\cdot-}$ , oxida-se, transformando-se em brometo de etídio e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha.

A produção de ânion superóxido em CMLVs de ratos foi avaliada segundo Martín *et al.* (2012). As CMLVs utilizadas foram cultivadas conforme descrição anterior, entretanto, quando foram para a última passagem antes dos experimentos, após tripsinizadas, as células foram semeadas sobre lamínulas, as quais foram colocadas em pares dentro dos seis poços das placas (Figura XIII).



**Figura XIII:** Protocolo para mensuração da produção de ânion superóxido pela técnica de dihidroetídeo (DHE) (Adaptado de Batista, 2014).

Foi dada continuidade à cultura das CMLVs sobre as lamínulas, e ao alcançar 60 a 80% de confluência, as células foram estimuladas com tempol ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) e mito-TEMPO ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) durante 30 min, antes da exposição ao chumbo  $20 \mu\text{g/dL}$  por 48h. Em seguida, as células foram lavadas e, então, incubadas com  $10 \mu\text{M}$  de DHE diluído em meio de cultura celular (DMEM/F12 HAM, sem soro) durante 30 minutos, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , na incubadora úmida. O brometo de etídio foi excitado a  $546 \text{ nm}$  e tem comprimento de onda de emissão de  $610 \text{ nm}$ .

As imagens foram adquiridas com um microscópio Leica TCS SP2 sistema confocal (x40) e foram capturadas através de uma câmera *spot* digital (*Diagnostic, Spectra Services*, Nova Iorque, EUA). A intensidade da fluorescência foi quantificada de 10 a 15 núcleos/experimento e imagem, utilizando um software de análise de imagem denominado *Metamorph* (*Molecular Devices Corp.*, Pensilvânia, EUA).

Como situação controle, foram utilizadas CMLVs sem estímulos ou tratamentos prévios, as quais tiveram suas imagens obtidas ao longo do estudo, em paralelo. Os efeitos das diferentes situações (Chumbo, Chumbo+mito-TEMPO e Chumbo+tempol) foram expressados como incremento sobre a situação controle,

sem estímulo ou tratamento, para a qual foi atribuído o valor de 1 (um) para a intensidade da fluorescência obtida.

Em aorta, os segmentos foram retirados dos animais, em seguida, limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, estes segmentos foram congelados em meio adequado (meio de congelamento). Assim, as amostras foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia do experimento. A produção de ânion superóxido em aorta foi avaliada segundo Wiggers *et al.* (2008).

Os segmentos de aorta foram cortados no criostato em anéis com 10  $\mu\text{m}$  de espessura. Posteriormente estes anéis foram recolhidos em lâminas gelatinizadas e secos em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs-HEPES (Para 100 mL de Krebs: 29,4mg de  $\text{CaCl}_2$ , 759mg de  $\text{NaCl}$ , 41,7mg de  $\text{KCl}$ , 4,9 mg de  $\text{MgCl}_2$ , 197,8mg de HEPES e 198,2 de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida à  $37^{\circ}\text{C}$ . Decorridos os 30 minutos, o Krebs foi escorrido e o excesso de água seco. Em seguida, foi realizada incubação com dihidroetídio (DHE) 2  $\mu\text{M}$  por duas horas na estufa com câmara fechada a  $37^{\circ}\text{C}$ . A luminescência emitida foi visualizada com microscópio fluorescência invertido (NIKON Eclipse Ti-S, x20 objective) e câmara fotográfica (NIKON digital sighth DS-U<sub>2</sub>) com filtro de fluorescência para DHE (verde). O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com  $\lambda_{\text{exc}} = 546 \text{ nm}$  e detectado com  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ . As imagens foram quantificadas pelo programa ImageJ.

### 3.9 ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE

A atividade da NADPH oxidase foi determinada por um ensaio de quimioluminescência emitida pela reação entre lucigenina e ânion superóxido, de acordo com o protocolo descrito por San José e colaboradores (2009), modificado. A lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridina) é um composto aromático que pode ser reduzido pelo ânion superóxido, produzindo emissão de luz, a qual pode ser detectada através de um luminômetro.

Células musculares lisas vasculares foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços e estimuladas com acetato de chumbo (20  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ). Após as lavagens, as células foram suspensas e homogeneizadas em um solução para lise celular



contendo 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM ácido etileno glicol tetraacético (EGTA), 150 nM sacarose, em pH = 7,4.

A reação foi iniciada através da adição de uma mistura de 5  $\mu\text{M}$  de lucigenina e 100  $\mu\text{M}$  de NADPH à amostra de proteína obtida das CMLVs, totalizando um volume final de 300  $\mu\text{L}$ . A quimioluminescência foi determinada em um luminômetro de placa (*Auto-Lumat LB 953, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Alemanha*) programado para registrar a quimioluminescência em unidades relativas de luz (URL) emitidas em intervalos de 2,4 segundos durante cinco minutos. A emissão específica de luz foi calculada após subtrair a leitura da atividade de fundo (branco), que foi determinada em tubos contendo todos os componentes, exceto o homogenato protéico, que foi substituído pela solução de lise celular em que estavam tratadas as amostras.

Os dados obtidos (URL/mg proteína) foram expressados como incremento sobre a situação controle, assumida para o valor de 1 URL/mg proteína.

### 3.10 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da exposição ao acetato de chumbo sobre a expressão proteica das isoformas COX-1 e COX-2; da isoforma da NADPH oxidase, a gp91phox; das isoformas da superóxido dismutase SOD-Mn, SOD-CU/Zn e SOD-EC. Para isto, foram usadas amostras de artéria aorta torácica, artérias mesentéricas e CMLVS de ratos dos grupos controle e chumbo.

Para realização destas análises, as células eram incubadas ou não com acetato de chumbo durante 48 horas. Após estímulo com chumbo, as células foram então lavadas com PBS frio sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e, depois de removido todo o PBS, foram retiradas das placas com um pequeno rodo, juntamente a 100-150  $\mu\text{L}$  de uma solução denominada *Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)*, composta por: 150 mM NaCl, 1 % de octilfenoxipolietoxietanol (um detergente não desnaturante, o IGEPAL<sup>®</sup> CA-630), 0,5 % de deoxicolato de sódio, 0,1 % de dodecilsulfato de sódio (SDS), e 50 mM de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), em pH=8,0. A solução RIPA é eficiente para a lise celular e para a solubilização da proteína, evitando que esta se degrade. À solução RIPA foi adicionado um coquetel inibidor de proteases e uma

mistura de inibidores de fosfatases, contendo 1 mM de ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), 20 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato (BGP) e 10 mM de fluoreto de sódio (NaF).

A concentração de proteína dos lisados celulares foi quantificada por colorimetria, utilizando o método de *Micro BCA Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology, Ilinóis, EUA). O volume da amostra necessário foi calculado em função da quantidade de proteína que se desejava colocar para análise, o qual foi misturado a um volume igual de solução de tampão de carga, o tampão Laemmli 5X [300mM Tris-HCl em pH = 6,8; 10 % dodecil sulfato sódico (SDS); 25 %  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,5 % azul de bromofenol; 50 % glicerol]. Esta mistura foi incubada a 95 °C durante um minuto para desnaturalizar as proteínas.

Os segmentos de aorta torácica e todo o mesentério a partir do primeiro ramo da mesentérica superior foram utilizados como amostra para esta análise. Estes eram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até o momento em que foram utilizados. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização das amostras, em temperatura de 4°C, com tampão de homogeneização contendo: Tris - HCl (10 mM, pH 7,4);  $\text{NaVO}_3$  (1 mM); SDS, 1%; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM , pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Inibidor de protease.

Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheir-Hinz, GmbH22331, Alemanha) a 4°C com 6.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, foi feita a quantificação das proteínas pelo método Lowry (Peterson, 1977). Determinou-se a densidade óptica medindo a absorbância num espectrofotômetro multi-canal a  $\lambda = 750$  nm (Cary, Varian). Para a quantificação, foi realizada uma diluição da amostra (1:25). Em seguida foram aliqotados os volumes para uma carga de 50  $\mu\text{g}$  de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39  $\mu\text{M}$ ; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e Azul de bromofenol 0,5 %) e após centrifugação foram mantidas à temperatura de 95 °C durante 4 minutos.

Para analisar a expressão proteica da COX-2, COX-1, gp91phox, SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, SOD-EC,  $\beta$ -actina e  $\alpha$ -actina, 25  $\mu\text{L}$  das amostras foram aplicadas (carregadas) em gel SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida 40%, Tris HCl 1,5 M (pH = 8,8), SDS 10%, persulfato amônico (APS) 10% e Temed), juntamente com um

marcador de peso molecular de amplo espectro (6 a 180 kDa), previamente imersos em uma cuba contendo solução tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %), que é um eletrólito com alta capacidade de tamponamento, sendo submetidas à eletroforese aplicando corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) durante aproximadamente 2 horas, fazendo com que as amostras (proteínas) passassem pelo gel.

Uma vez separadas, as proteínas foram transferidas para uma membranas de difluoreto de polivinilo ou de nitrocelulose (*Immun-Blot PVDF Membrane for Western Blotting 0,2 μm, BioRad Laboratories, EUA/ Amersham, GE Healthcare, UK, respectivamente*) previamente ativadas com metanol/água. Para isso, o gel, a membrana e papel Whatman (*GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia*) foram colocados em um sistema “sanduíche”. O método realizado foi o de transferência líquida na qual o sanduíche era montado em suporte Holder Cassete e acoplado à uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% e Metanol 20%) à 8° C com uma corrente de 60 V por 2 horas.

Uma vez transferidas às proteínas, as membranas foram deixadas durante uma hora a temperatura ambiente em agitação contínua com uma solução de bloqueio para evitar uniões inespecíficas do anticorpo. Esta solução de bloqueio continha 5 % de leite desnatado em pó ou 5 % de BSA, dissolvida em solução de lavagem das membranas: 10 mM de Tris-HCl a pH = 7,5; 100 mM de NaCl; e 0,1 % Tween-20 (TBS-T).

Em seguida, também sob agitação constante, as membranas foram incubadas por toda a noite a 4 °C com os anticorpos primários para a COX-2 (1:200; anticorpo monoclonal de coelho; Cayman Chemical, Ann Arbor, Mi, USA), COX-1 (1:500, anticorpo monoclonal de coelho; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), gp91phox (1:1000, anticorpo monoclonal; BD transduction laboratories, San Jose, CA, USA), SOD-Mn (células: 0.025μg/mL; StressGen Bioreagent Corp., Victoria, Canada / vaso: 1:400; anticorpo policlonal; Millipore, Temecula, CA, USA), SOD-Cu/Zn (células: 1:500; anticorpo policlonal; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA / vaso: 1:10000; Nventa Biopharmaceuticals, Victoria, BC, Canada); EC-SOD (1:4000; anticorpo policlonal; Enzo life Science), phospho-ERK1/2 e ERK1/2, phospho-p38 e p38 MAPK, phospho JNK e JNK (1:1000; anticorpo policlonal; Cell Signaling, Boston,

MA) e anticorpo monoclonal de camundongo anti- $\beta$ -actina (1:10000; Transduction Laboratories, Lexington, UK); e  $\alpha$ -actina (1:5000; anticorpo monoclonal; Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA) diluídos em solução à 5% de leite desnatado em pó ou 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5).

Uma vez finalizada a incubação com os anticorpos primários, foram feitas três lavagens sucessivas de dez minutos cada, com uma solução TBS-T, para eliminar os restos do anticorpo primário que não se uniram.

À continuidade, as membranas foram incubadas durante uma hora, a temperatura ambiente e agitação contínua, com o correspondente anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete: anticorpo IgG anti-coelho (1:2000; Bio-Rad, USA and 1:5000; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) ou anti-camundongo (1:5000; StressGen Bioreagent Corp., Victoria, Canada).

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a solução TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) (as soluções foram trocadas a cada 5 minutos no TBS-T e a cada 10 minutos no TBS).

Os imunocomplexos foram detectados por reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 min a um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare, UK). As membranas, então, foram expostas a autorradiografia (*Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, EUA / Hyperfilm, Amersham<sup>TM</sup>, UK*), sendo as bandas impregnadas posteriormente reveladas. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isso, os filmes com as bandas proteicas impregnadas foram escaneadas. O programa ImageJ foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

Os dados de expressão proteica das proteínas (COX-2, COX-1, gp91phox, SOD-Mn, SOD-Cu/Zn e SOD-EC) foram expressos como razão da expressão proteica da  $\beta$ -actina (células) e da  $\alpha$ -actina (vaso), usadas como controle de carga. Para comparar os resultados de expressão de proteínas a partir de células, é atribuído um valor de

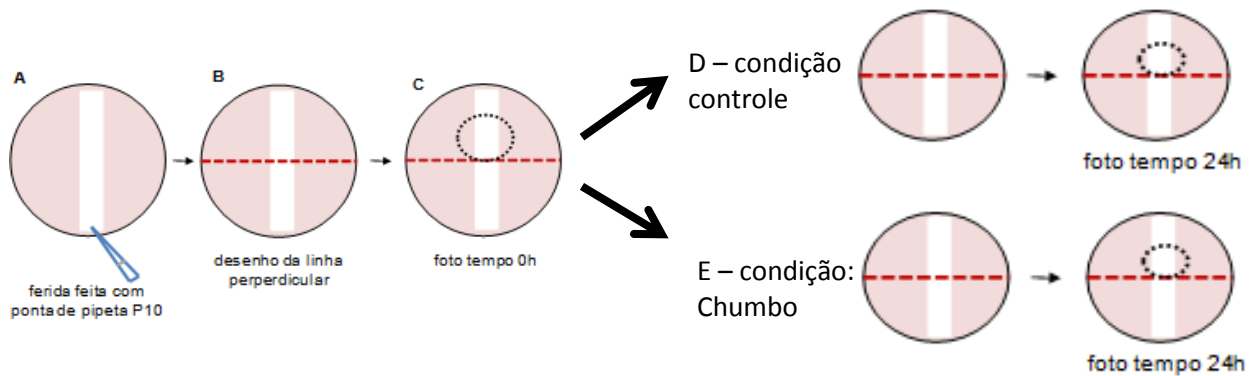
1 para a expressão em células não tratadas e, em seguida, utilizada para calcular o valor da densidade relativa de outras bandas a partir do mesmo gel.

### 3.11 MIGRAÇÃO CELULAR

Para verificar se o chumbo induz a migração celular foi realizado, *in vitro*, o ensaio *Wound Healing* (cicatrização de ferida), adaptado de Van Der Meer e colaboradores (2010). Para isto as CMLVs foram semeadas e cultivadas em uma placa de 24 poços (*24-well Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*) após tripsinização. Quando atingida a confluência aproximada de 90-100 %, o meio de cultura foi trocado pelo meio de jejum (DMEM livre de FBS, com antibióticos P/S), o qual permaneceu por 24h.

Uma fina ferida vertical foi feita em cada poço da placa de *24-well* com uma ponta de pipeta P10 (estéril, com filtro) (Figura XIV A). O meio de cultura foi trocado duas vezes (5 mL/poço) para lavar todos os restos de células remanescentes da área da ferida. Uma linha foi desenhada no centro de cada poço, perpendicular ao sentido da ferida (sentido horizontal), por fora da placa, sobre o maior diâmetro de cada poço (Figura XIV B). Essas linhas foram desenhadas para que o mesmo ponto da placa fosse visualizado ao microscópio na captura das imagens. Uma imagem foi captada no tempo zero (Figura XIV C) no local exatamente acima de intersecção da linha desenhada e da ferida. Na sequência, as células foram tratadas com acetato de chumbo (20 µg/dL) durante 24 h. Ao final deste tempo, outra imagem foi captada na mesma região de cada poço. Na situação controle as células não recebiam tratamento com acetato de chumbo assumido o valor 1 (µm) para esta condição.

Para as análises foi utilizado um microscópio invertido (*Zeiss, Axiovert 25, Jena, Alemanha*) acoplado a uma câmera *spot* digital (*Diagnostic, Spectra Services, Nova Iorque, EUA*). O software Adobe Photoshop CS2 foi usado para determinar a área de fechamento da ferida comparado ao tempo zero de cada tratamento e em relação à situação controle, assumida como 1 (µm).



**Figura XIV:** Esquema do protocolo de migração celular (método *Wound Healing*): A) ferida feita com ponta de pipeta P10; B) desenho, por fora da placa, da linha perpendicular à ferida; C) local da foto no tempo zero, antes dos estímulos; D) condição controle; E) condição estimulada com acetato de chumbo (Adaptado de Batista, 2014).

### 3.12 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi avaliada usando o kit *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA), baseado na descrição de Aguado e colaboradores (2013). Este protocolo teve por objetivo de investigar se o acetato de chumbo estimula a proliferação de CMLVs.

Para isso, após a tripsinização, as CMLVs foram semeadas em placas de 96 poços (*96-well Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*) em meio de cultura DMEM. Diferentemente dos demais protocolos experimentais, os pequenos poços da placa de 96-well recebiam uma quantidade pré-determinada de 4.000 células/poço. Para isso, após passagem e tripsinização, as células foram contadas utilizando-se uma câmera de Neubauer sob uma lupa Leica 6SD (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*). Após calcular e realizar a devida diluição, as células eram distribuídas nos poços, onde cresciam por 3 a 4 dias, quando alcançavam a confluência ideal (80%).

Após confluência, o meio de cultura das células foi trocado por meio de jejum (DMEM livre de FBS, suplementado com antibióticos P/S), por 24 horas. As células foram então tratadas com acetato de chumbo (20 µg/dL) ou veículo por 48h.

A resposta proliferativa foi quantificada pela adição de 20  $\mu$ L/poço de uma solução formada de: composto de tetrazolio MTS, reagente de acoplamento de elétrons e etosulfato de fenazina (PES) (*CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*), que após 2 horas de incubação a 37 °C, a absorbância foi medida a 490 nm utilizando um leitor de microplacas (*ASYS Hitech GmbH*, Eugendorf, Áustria). Os ensaios foram desenvolvidos em triplicado e ao controle, foi assumido o valor de 1 (um).

### 3.13 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Para análise dos dados e aplicação dos testes estatísticos foram utilizados os programas *Microsoft Office Excel* (Redmond, Washington, EUA) e *GraphPad Prism Software 5.0* (San Diego, Califórnia, EUA).

Os resultados encontram-se expressados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do número de animais ou do número de cultivos celulares diferentes usados em cada experimento (n).

Em relação aos experimentos de reatividade vascular, foram calculados os valores de resposta máxima ( $R_{max}$ ) e de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina e à acetilcolina através da análise de regressão não-linear de cada curva individualmente.

Para comparar o efeito da remoção do endotélio ou o efeito de alguns fármacos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, os resultados foram expressos através da diferença da área abaixo da curva (dAAC) de concentração-resposta nas situações controle (sem fármaco) e nas situações experimentais (remoção do endotélio ou na presença de fármacos). As diferenças das AACs entre os grupos foram expressas como porcentagem.

Para variáveis de distribuição normal, as diferenças foram analisadas usando o Teste *t* de *Student* pareado ou não pareado para comparação de duas médias. Para comparar três médias ou mais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma ou duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizadas. Quando o teste ANOVA detectava significância estatística, foi realizado o pós-teste (*pos-hoc*) de Bonferroni.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .



### 3.14 FÁRMACOS, REAGENTES e ANTICORPOS

- Acetato de chumbo (Sigma)
- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)
- Acrilamida (N, N`-Metilenbisacrilamida 40 % Solução 37, 5:1): BioRad
- Ácido acético glacial (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido bórico (Sigma)
- Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma)
- Acido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Ácido orto-fosforico (Merck)
- Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma)
- Anticorpo monoclonal produzido em coelho para anti-COX-2 (Cayman Chemical)
- Anticorpo monoclonal produzido em coelho para anti-COX-1 (Cayman Chemical)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para anti- $\beta$ -actina (Transduction laboratories)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para  $\alpha$ -actina (Sigma)
- Anticorpo policlonal produzido em coelho para SOD-Mn (Millipore)
- Anticorpo policlonal produzido em coelho para SOD-Cu/Zn (Sigma)
- Anticorpo policlonal produzido em coelho para SOD-EC (Enzo life Science)
- Anticorpo policlonal produzido em coelho para SOD-Mn (StressGen)
- Anticorpo policlonal produzido em coelho para SOD-Cu/Zn (Nventa)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para gp91phox (Sigma)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para phospho-ERK1/2 e ERK1/2 (Cell Signaling)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para phospho-p38 e p38 MAPK (Cell Signaling)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para phospho JNK e JNK (Cell Signaling)
- Anticorpo secundário monoclonal conjugado com peroxidase de rabanete IgG anti-camundongo (Stressgen Bioreagents)
- Anticorpo secundário policlonal conjugado com peroxidase de rabanete IgG anti-coelho (Stressgen Bioreagents)
- Anticorpo secundário fluorescente anti-camundongo / FITC (Sigma)

- Apocinina ((4'-Hidroxi-3'-metoxiacetofenona)) (Sigma)
- Azul brilhante de Coomassie G (Sigma)
- Azul de bromofenol - 3', 3'', 5', 5'''-tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Sigma)
- Bicarbonato de Sódio (Merck)
- Carbogênio (95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>) (White Martins)
- Celecoxib (Pfizer)
- *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega)
- Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)
- Cloreto de magnésio (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Colagenase tipo II (Invitrogen-Gibco)
- Dihidroetidio (Sigma)
- Diidrogenofotato de amonio (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (VETEC)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)
- DMEM/F12 HAM (Dulbecco's modified Eagle's médium) (Sigma)
- DMEM/F10 HAM (Dulbecco's modified Eagle's médium) (Sigma)
- DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma)
- DNase I recombinante, RNase free (Roche)
- Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF, Inibidor de Protease) (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Fosfato diácido de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (VETEC)
- Glicerol (Sigma)
- Glicina (Sigma)
- Glicose (VETEC)
- Heparina (Roche)
- Hidóxido de sódio (Sigma)
- Hidrogenofosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma)
- Indometacina (ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1-H-indol-3-acético)
- Inibidores de fosfatases (Sigma)
- Inibidor de protease (Cocktail for General Use) (Sigma)
- Leite desnatado em pó (Nestlé)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- Lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridina) (Sigma)

- Metanol (Sigma)
- Mito-TEMPO (Sigma)
- ML171 (Sigma)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de magnésio heptahidratado) (Merck)
- N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- NADPH ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido, sal tetrasódica)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- N $\square$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- OCT tissue-tek (Sakura)
- Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen-Gibco)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham Life Science)
- *RIPA (radioimmunoprecipitation assay)*: Sigma-Aldrich Co.
- Rofecoxib (LKT Laboratories)
- Sacarose: Merck
- SB203580 (Calbiochem)
- SC 19220 (ácido 2-acetilhidrazida 10(11H)-carboxílico) (Sigma Chemical Co)
- Soro bovino fetal (FBS) (Reactiva)
- streptomycin (Invitrogen)
- SDS (dodecil sulfato sódico) (Sigma-Aldrich)
- Solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) com  $\text{Ca}^{2+}$  e com  $\text{Mg}^{2+}$  (Invitrogen-Gibco)
- Solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) sem  $\text{Ca}^{2+}$  e sem  $\text{Mg}^{2+}$  (Invitrogen-Gibco)
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado (Merck)
- Superóxido Dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)
- SYLGARD (Silicone elastómero) (Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA)
- *SyBR Green (iTaQ FAST SyBR Green Supermix with ROX)* (Bio-Rad Laboratories)
- Temed (tetrametiletlenodiamina) (Sigma)
- Tempol (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl) (Sigma)
- Tripsina-EDTA (Invitrogen-Gibco)
- *TRI-Reagent* (Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminomenato (Tris) (Sigma)

- Tris-HCl (Sigma)
- Tween 20 (polioxietileno sorbitano 20) (Sigma)
- U0126 (Calbiochem)
- Uréia (Sigma)
- Uretana (Sigma)
- $\beta$ -mercaptoetanol (2-Hidroxietilmercaptano) (Sigma)

Todas as soluções e fármacos foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a  $-20^{\circ}$  C, com exceção do celecoxib, rofecoxib, SC 19220, U0126 e SB203580 que foram diluídos em DMSO. A indometacina foi diluída em tampão Tris 0,1M. 10  $\mu$ l de DMSO não teve nenhum efeito sobre CMLs. Foi realizados testes para comprovar que estes solventes não modificavam as respostas vasomotoras nem a expressão de proteínas e RNAm em nossos experimentos.

## ***RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO

Os animais expostos ao chumbo apresentaram concentração sanguínea de 21,7  $\mu\text{g/dL} \pm 2,38$  (n = 6). Os ratos controles (n = 5) apresentaram concentração abaixo do limite de detecção (0,5  $\mu\text{g/dL}$ ).

### 4.2 PESO CORPORAL

Os animais dos grupos controle e chumbo apresentaram peso semelhante no início e ao término do tratamento demonstrando que a exposição por 30 dias ao acetato de chumbo não influencia no ganho de peso corpóreo, como representado na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores do peso corporal (g) dos animais dos grupos Controle (Ct) e chumbo (Pb).

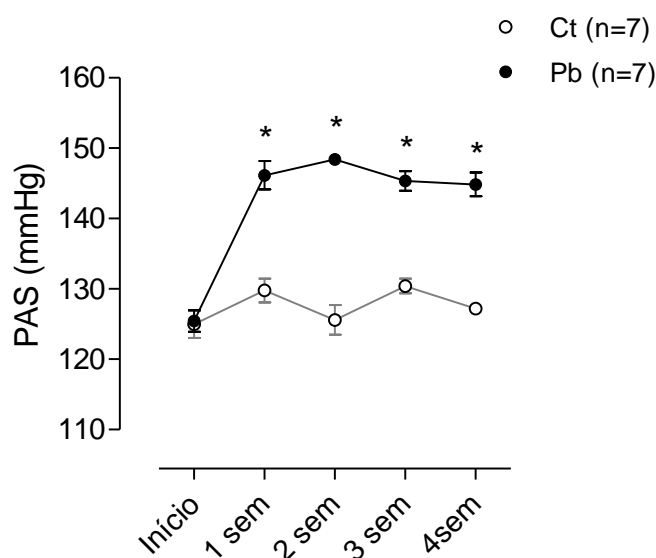
<b>Peso corporal</b>			
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Início tratamento</b>	<b>Final tratamento</b>
Ct	9	218 g $\pm$ 3,0	325 g $\pm$ 5,8
Pb	9	217 g $\pm$ 2,5	328 g $\pm$ 7,3

### 4.3 PESO DO CORAÇÃO E O CRESCIMENTO ÓSSEO DE RATOS.

O peso do coração ou o comprimento da tíbia não foram diferentes entre os grupos estudados (Peso coração - controle: 0,676  $\pm$  0,003 g (n = 6); chumbo: 0,703  $\pm$  0,011 g (n = 9)  $P > 0,05$ ), (Comprimento da tíbia - controle: 3,8  $\pm$  0,1 cm (n = 6); chumbo: 3,4  $\pm$  0,1 cm (n = 9)  $P > 0,05$ ). A razão peso coração/comprimento da tíbia, obtida para se estimar a hipertrofia cardíaca, também não foi diferente entre os grupos (controle: 0,178  $\pm$  0,006 g/cm; chumbo: 0,173  $\pm$  0,003 g/cm).

### 4.4 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.

O efeito da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a pressão arterial foi avaliada semanalmente em ambos os grupos. Antes de iniciar o tratamento os dois grupos apresentaram valores pressóricos semelhantes (controle,  $124 \pm 1,9$  mmHg vs chumbo,  $125 \pm 1,5$  mmHg,  $n=7$ . ANOVA duas vias). Durante o tratamento, a PAS dos animais controle não foi alterada, o mesmo não foi observado nos animais chumbo que apresentaram aumento significativo na PAS após a 1ª semana de tratamento mantendo-se elevada até a 4ª semana de tratamento (Figura 1), (Controle,  $127 \pm 0,57$  mmHg vs chumbo,  $144 \pm 1,67$  mmHg, ANOVA duas vias,  $P < 0,05$ ).



**Figura 1:** Valores da pressão arterial sistólica (PAS) obtidos por meio da pletismografia de cauda em ratos dos grupos controle (Ct) e chumbo (Pb) durante quatro semanas de tratamento. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA (duas vias) seguido por pós-teste de Bonferroni,  $P < 0,05$ .

#### 4.5 EXPERIMENTOS COM AORTA E ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA

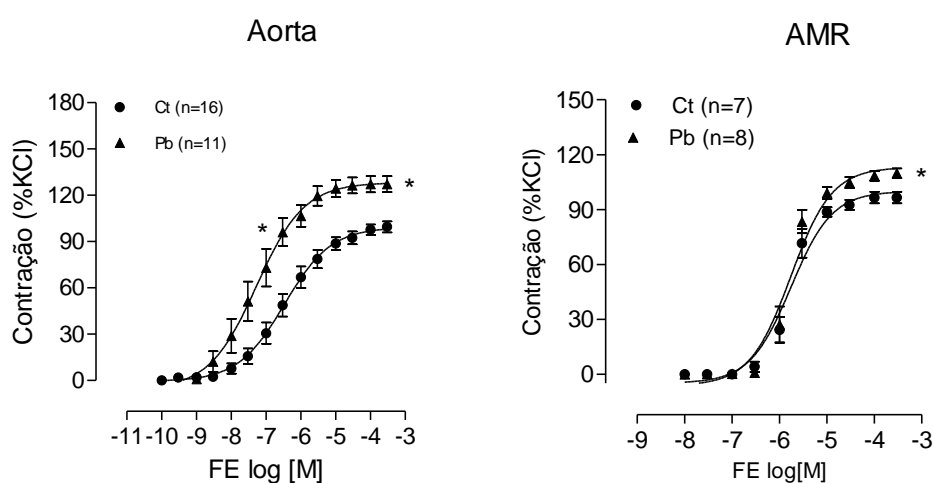
##### 4.5.1 Efeitos da exposição crônica ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil ao cloreto de potássio em artérias aorta e mesentéricas de ratos.

Com a finalidade de verificar a capacidade contrátil das artérias utilizadas, todos os segmentos arteriais, após procedimento de normalização, eram expostos a solução rica em KCl (Aorta – 75 mM e mesentérica - 120 mM). A contração máxima arterial, estimulada por alta concentração de KCl de cada artéria é um importante dado, já

que todas as contrações aos fármacos são expressos como porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl. Adicionalmente, diferenças na contração ao KCl nos grupos experimentais podem ser um indicativo de lesão/alteração do músculo liso vascular. No entanto, a exposição à baixa concentração acetato de chumbo durante 30 dias não alterou a resposta ao KCl, tanto em anéis de aorta (controle:  $3,75 \pm 0,13$  g vs chumbo:  $3,52 \pm 0,19$  g, (n=9). Teste  $t - P > 0,05$ ) quanto em anéis de mesentérica (controle:  $2,12 \pm 0,09$  mN/mm vs chumbo:  $2,39 \pm 0,13$  mN/mm, (n=11). Teste  $t - P > 0,05$ ). Estes resultados indicam que o tratamento não prejudicou a capacidade contrátil do músculo liso vascular.

#### 4.5.2 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a resposta contrátil a fenilefrina.

A administração de fenilefrina aumentou de maneira concentração dependente o tônus basal tanto dos anéis de aorta quanto dos anéis de mesentéricas isolados de animais expostos ou não ao acetato de chumbo. No entanto, a resposta contrátil produzida pela fenilefrina foi diferente entre os grupos. As artérias (aorta e mesentéricas) de ratos expostos ao chumbo contraem mais do que aquelas retiradas de ratos controles expostos somente a salina. O efeito do chumbo alterou tanto a resposta máxima como a  $pD_2$  em aorta e só alterou a resposta máxima em artérias mesentéricas (AMR) (Figura 2, Tabela 2 e 3).



**Figura 2:** Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em segmentos de artéria aorta torácica e artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos dos grupos controle (Ct) e tratado com chumbo (Pb). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 (mesentérica) mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses.



Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e da sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste  $t$  não pareado:  $*P < 0,05$ , Ct vs Pb.

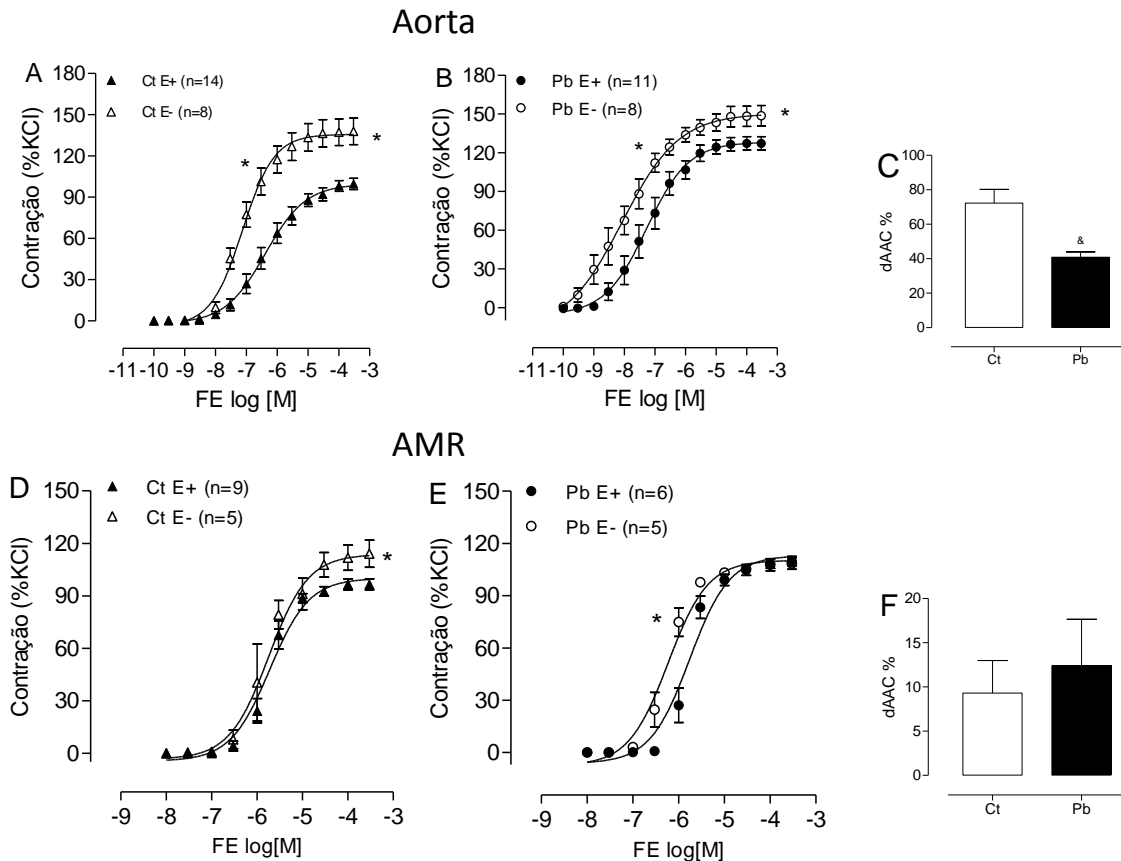
#### **4.5.3 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina.**

A fim de avaliar a modulação endotelial na resposta vascular à fenilefrina, o endotélio foi mecanicamente removido e, a ausência desta estrutura foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina ( $10 \mu M$ ) induzir relaxamento menor que 10%.

A ausência do endotélio promoveu aumento significativo da sensibilidade ( $pD_2$ ) e da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) à fenilefrina em segmentos da aorta torácica em ambos os grupos, controle e chumbo (Figura 3A-B, Tabela 2).

Em artérias mesentéricas de ratos controle a ausência do endotélio também induziu um significativo aumento da resposta máxima à fenilefrina, sem alterar a  $pD_2$ . No entanto, a retirada do endotélio promoveu alteração na sensibilidade dos animais do grupo chumbo, sem alterar a  $R_{m\acute{a}x}$  (Figura 3D-E, Tabela 3).

A magnitude deste efeito, entre os grupos experimentais foi comparada utilizando-se a dAAC e, foi observado efeito de menor magnitude nos animais do grupo chumbo em aorta e não houve diferença na dAAC em artéria mesentérica (Figura 3C-F). Estes resultados sugerem que a exposição crônica a baixas doses de chumbo reduz a modulação endotelial na resposta vascular a fenilefrina como evidenciado pelos valores de dAAC em aorta de ratos tratados.



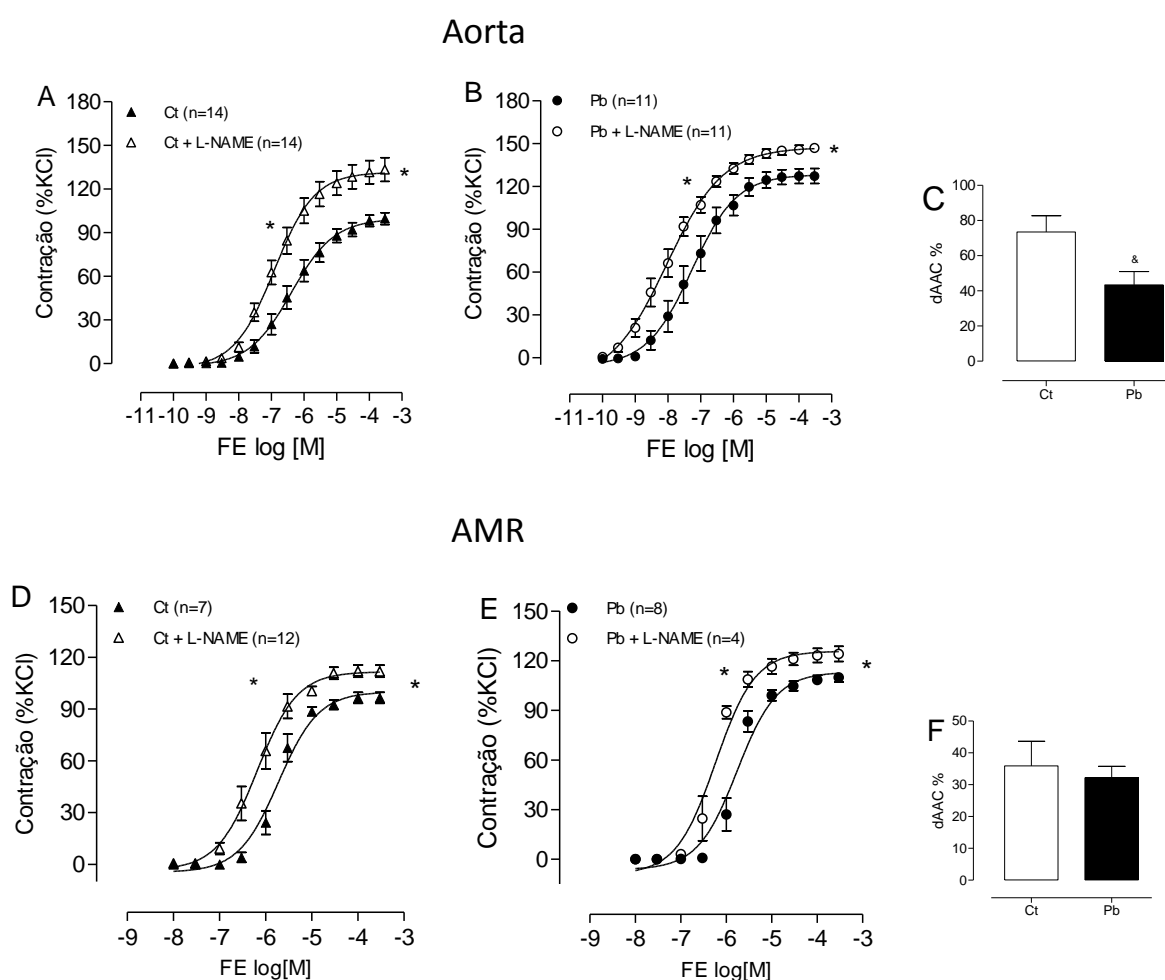
**Figura 3:** Efeito da remoção do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina, em segmentos de artéria aorta torácica (A-B) e artérias mesentéricas de resistência (AMR) (D-E) de ratos controle (Ct) (A-D) e tratados com chumbo (Pb) (B-E). Em C e F, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em aorta e artéria mesentérica, respectivamente, de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ), sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAAC foi utilizado o Teste  $t$  não pareado. \* $P < 0,05$  E+ vs E-; & $P < 0,05$  Ct vs Pb.

#### 4.5.4 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina.

Para analisar o papel do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina, segmentos arteriais com endotélio intacto foram pré-incubados com um inibidor da sintase de óxido nítrico, o L-NAME (100  $\mu$ M).

O L-NAME provocou aumento da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina nos anéis aórticos de ambos os grupos experimentais (Figura 4A-B, Tabela 2). Entretanto, ao comparar a magnitude deste efeito por meio da dAAC, observou-se

que nos animais expostos ao acetato de chumbo, a modulação dependente do NO na resposta contrátil à fenilefrina está reduzida (Figura 4C). Já nas artérias mesentéricas o L-NAME induziu aumento da sensibilidade e resposta máxima à fenilefrina em ambos os grupos (Figura 4D-E, Tabela 3). Porém, como evidenciado pelos valores de dAAC (Figura 4F) o efeito da inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME foi de igual magnitude em ambos os grupos, sugerindo que o tratamento com chumbo não altera a via do NO sobre a resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas.



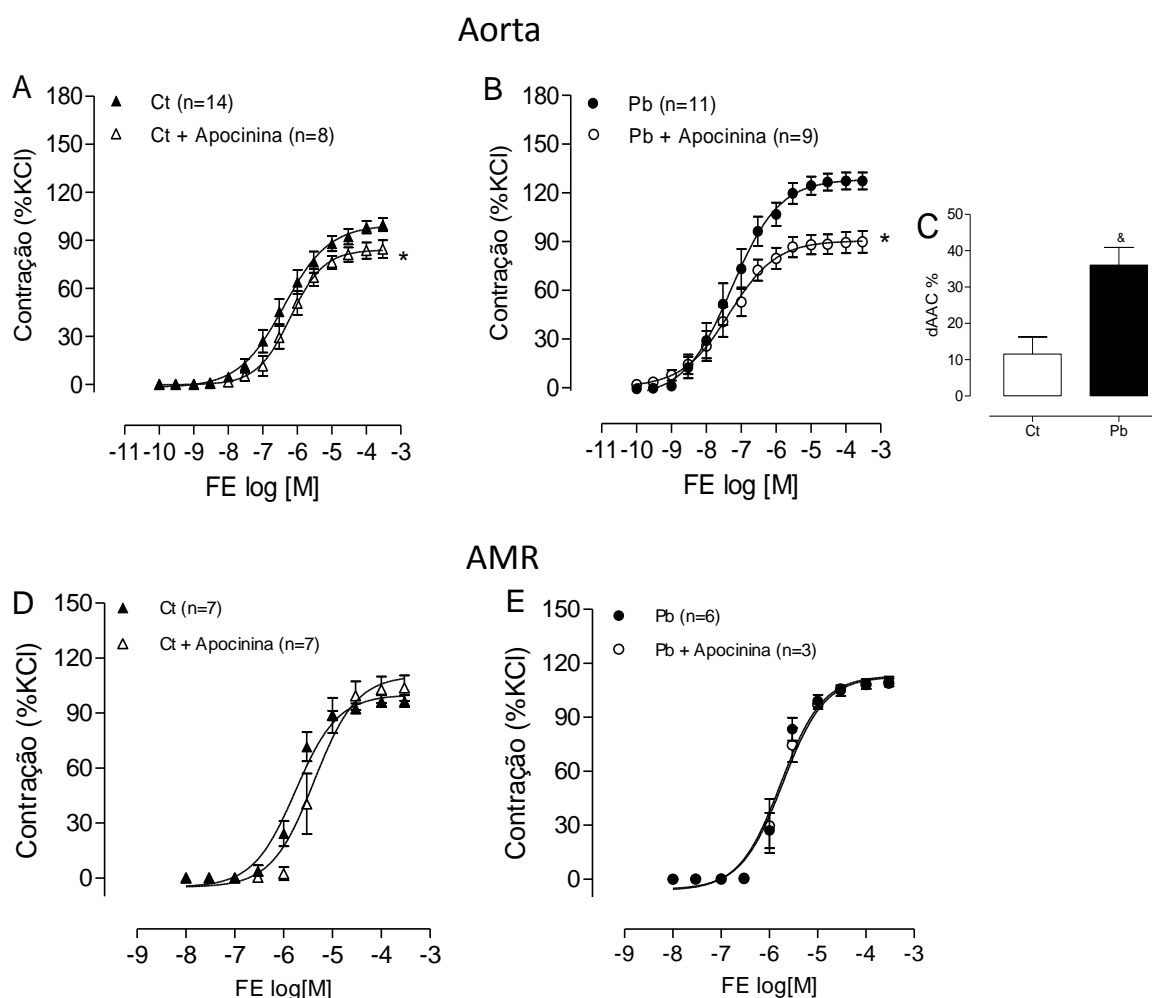
**Figura 4:** Efeito do L-NAME (100  $\mu$ M), inibidor da síntese do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta e artérias mesentérica de resistência de ratos dos grupos controle (Ct) (A-D) e tratados com chumbo (Pb) (B-E). Em C e F, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em aorta e artéria mesentérica, respectivamente, de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta

máxima ( $R_{\text{máx}}$ ), sensibilidade (pD2) e dAAC foi utilizado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  Ct/Pb vs L-NAME. &  $P < 0,05$  Ct vs Pb.

#### **4.5.5 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina.**

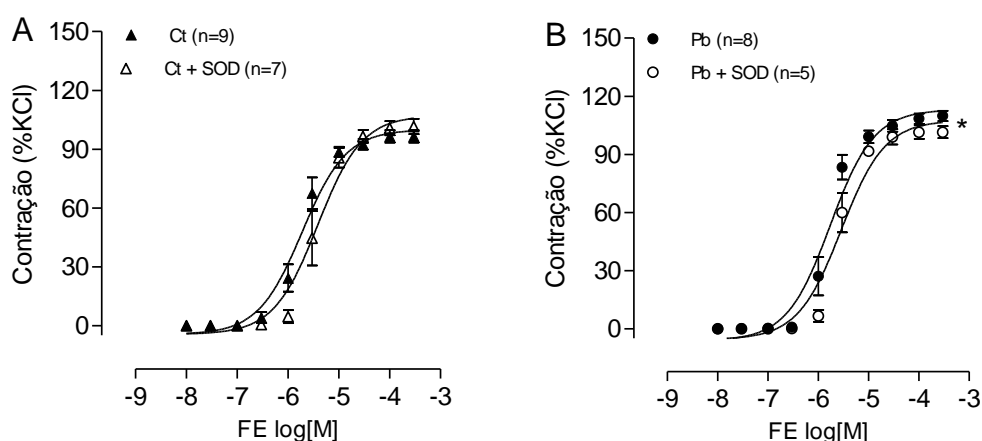
Sabemos que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio leva à redução da biodisponibilidade do NO e, assim, aumento da contração vascular. Dados da literatura evidenciam a participação das espécies reativas do oxigênio na disfunção endotelial e alterações cardiovasculares em modelos de exposição ao chumbo (Khalil-Manesh *et al.*, 1993; Vaziri & Sica, 2004). Assim nosso próximo passo foi avaliar os efeitos das espécies reativas de oxigênio na reatividade vascular à fenilefrina em artérias de ambos os grupos experimentais. Os anéis de aorta e mesentéricas foram incubados com apocinina (30  $\mu\text{M}$ ), inibidor específico da NADPH oxidase (enzima que sintetiza do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Em mesentéricas além da apocinina, os anéis foram também incubados com um “varredor” do ânion superóxido, a superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL), para investigar se existiria a produção de anion superóxido por outra via que não a NADPH oxidase.

A apocinina promoveu redução na resposta máxima à fenilefrina nos anéis de aorta dos animais dos grupos controle e chumbo (Figura 5A-B, Tabela 2). Entretanto, o efeito da apocinina, quando comparado pela dAAC, teve maior magnitude no grupo chumbo (Figura 5C). Em artérias mesentéricas, não houve alteração de pD2 e  $R_{\text{máx}}$  quando a NADPH oxidase foi inibida (Figura 5D-E, Tabela 3).



**Figura 5:** Efeito do inibidor da NADPH oxidase, Apocinina, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artéria aorta torácica e artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos dos grupos controle (Ct) (A-D) e tratados com chumbo (Pb) (B-E). Em C, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em aorta de ambos os grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) e dAAC foi utilizado o Teste- $t$  não pareado. \* $P < 0,05$  Ct/Pb vs Apocinina. & $P < 0,05$  Ct vs Pb.

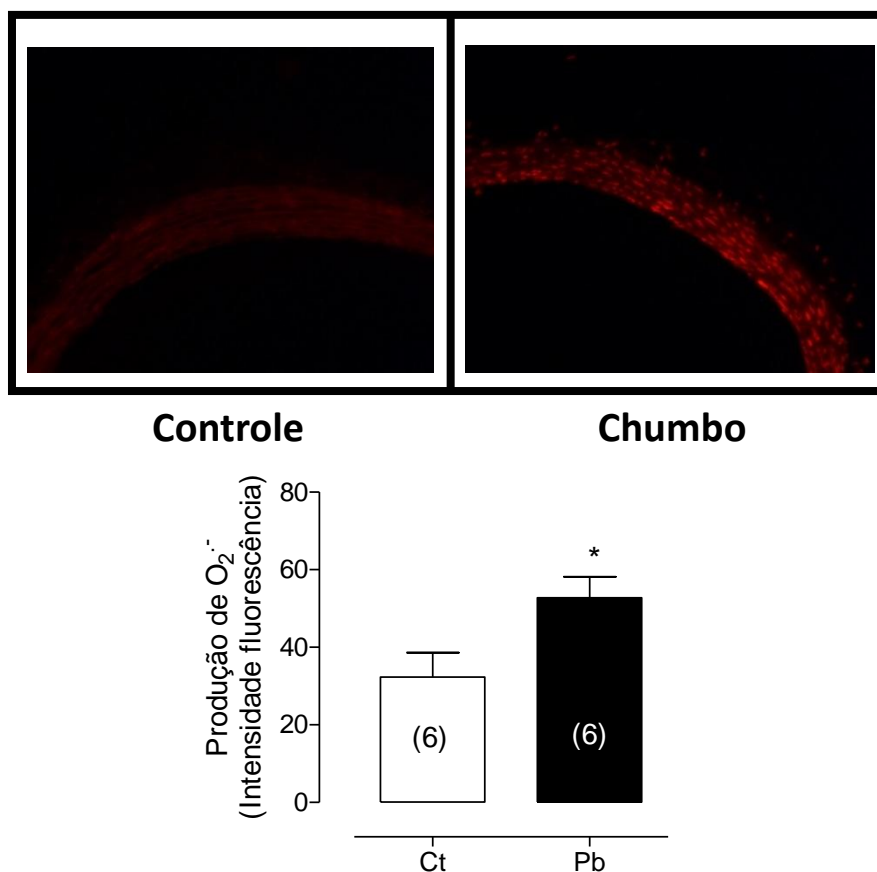
Por outro lado, nos experimentos com anéis de mesentéricas realizados na presença da SOD, foi observada uma pequena redução da resposta máxima à fenilefrina apenas em anéis de artérias mesentéricas dos animais do grupo chumbo (Figura 6A-B, Tabela 3).



**Figura 6:** Efeito da superóxido dismutase - SOD (150 U/mL) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos dos grupos controle (Ct) (A) e tratados com chumbo (Pb) (B). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste-*t* não pareado. \*  $P < 0,05$  Pb vs SOD.

#### 4.5.5.1 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a produção vascular de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

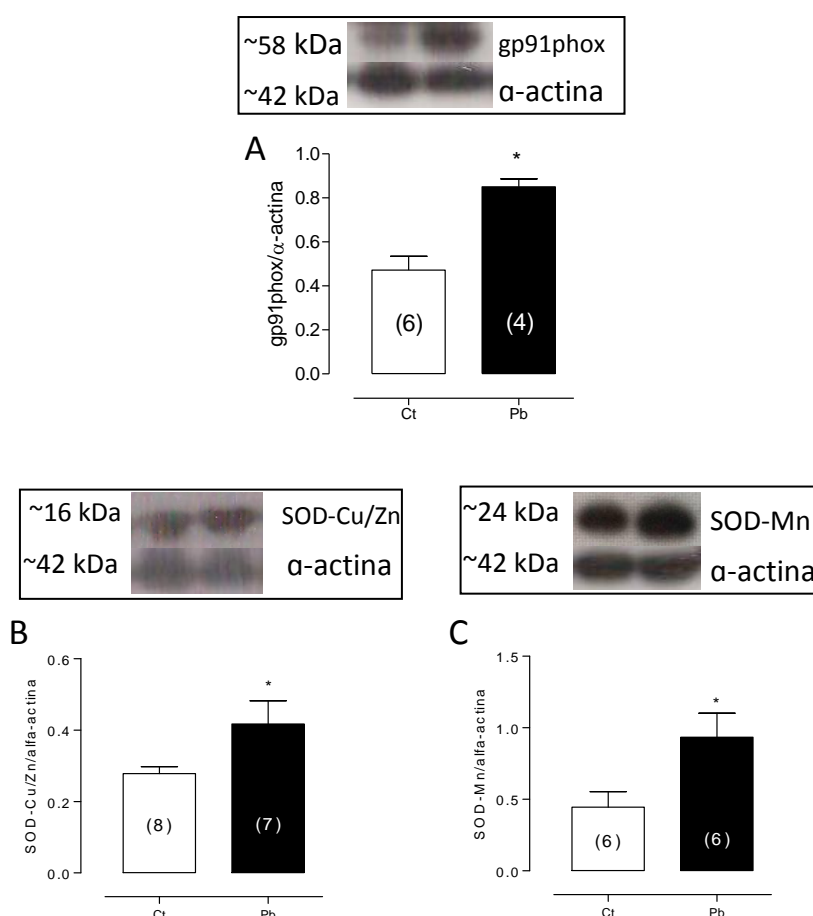
Para verificar a influência do tratamento com acetato de chumbo por 30 dias sobre a produção vascular de  $O_2^{\cdot-}$  foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do DHE. Corroborando com os resultados funcionais encontrados, a produção de  $O_2^{\cdot-}$  foi significativamente maior nos anéis de aorta dos animais tratados com chumbo quando comparado aos animais controle (Figura 7).



**Figura 7:** Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em cortes transversais de anéis de aorta de ratos controle (painel à esquerda) e tratados com chumbo (painel à direita). O gráfico representa a Intensidade de Fluorescência em unidade arbitrária (UA) emitida por DHE nos dois grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  EPM). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$ . Aumento de 40x para fotografar.

#### 4.5.5.2 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a expressão protéica da gp91phox, Cu/ZnSOD e MnSOD.

A isoforma da gp91phox se expressou em aorta dos animais dos dois grupos. Contudo, o tratamento com chumbo provocou aumento da expressão desta isoforma como pode ser observado na Figura 8 A. Avaliando o estado antioxidante local estudamos também a expressão gênica da SOD-Cu/Zn e SOD-Mn, que são importantes enzimas capazes de converter o ânion superóxido e água em oxigênio molecular e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como observado na Figura 8 B-C, o tratamento com chumbo incrementou na expressão protéica tanto da SOD-Cu/Zn como da SOD-Mn.



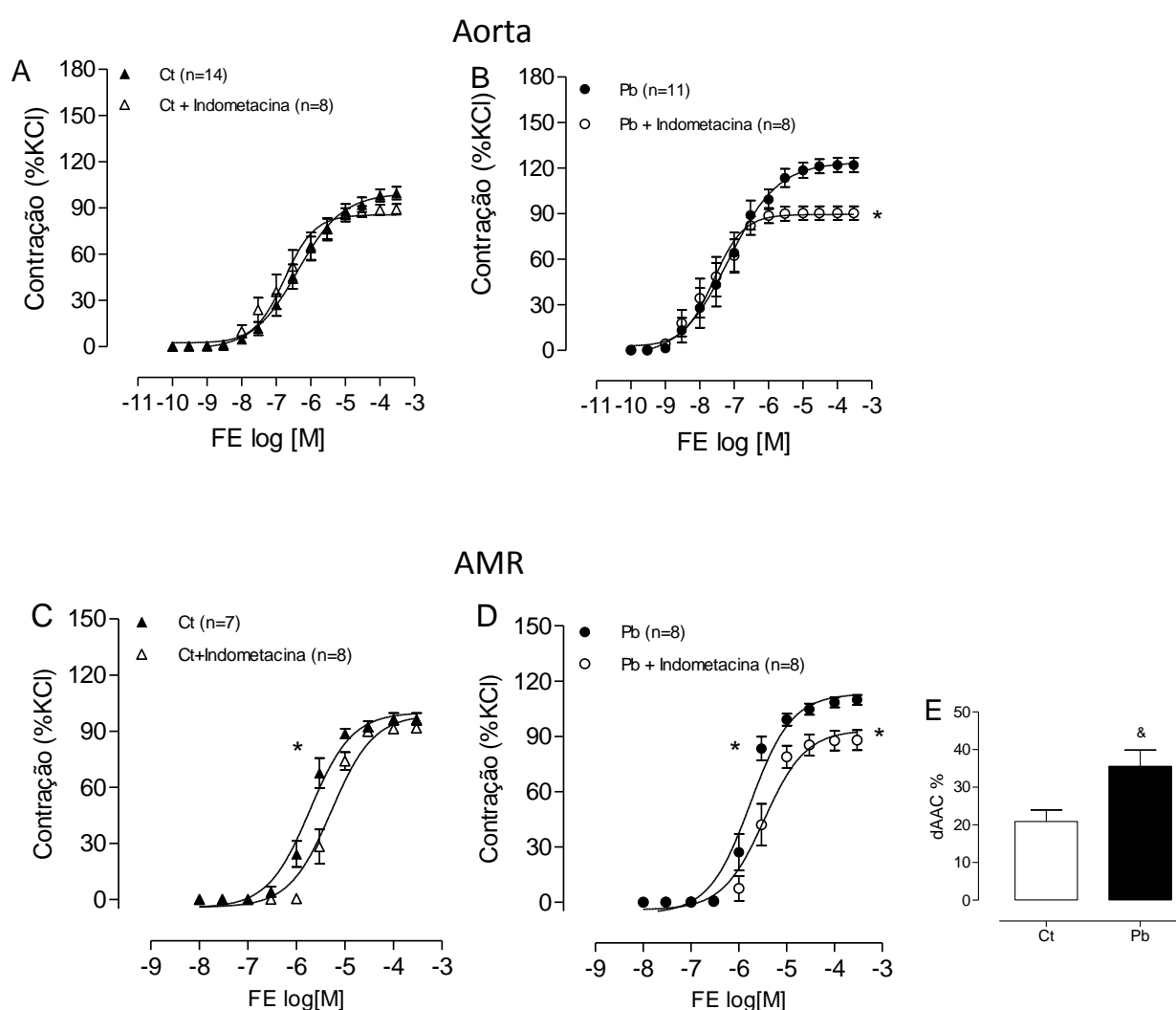
**Figura 8:** Análise densitométrica da expressão protéica da gp91phox e de duas isoformas da superóxido dismutase (SOD) de aorta de ratos controle (Ct) e chumbo (Pb). (A) gp91phox, (B) SOD-CuZn e (C) SOD-Mn. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão de gp91phox, SOD-CuZn, SOD-Mn e da  $\alpha$ -actina. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão mostrados como expressão proteica da gp91phox, SOD-CuZn e SOD-Mn em relação à  $\alpha$ -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \**P*<0,05 vs Ct.

#### 4.5.6 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina.

Para investigar se a exposição crônica ao acetato de chumbo altera a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de aorta e artérias mesentéricas de resistência, incubamos essas artérias com o inibidor da COX, a indometacina (10  $\mu$ M). Em aorta e artérias mesentéricas do grupo chumbo a indometacina promoveu redução da



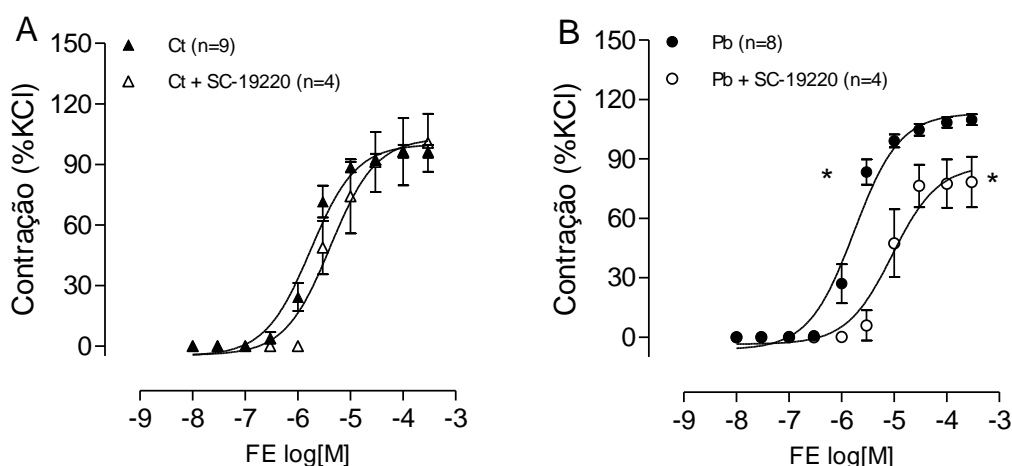
resposta contrátil à fenilefrina (Figura 9B-D, Tabela 2-3), sem promover alterações em aortas do grupo controle (Figura 9A, Tabela 2). No entanto, houve redução da sensibilidade ( $pD_2$ ) em artérias mesentéricas do grupo controle (Figura 9C, Tabela 3). Nas mesentéricas, podemos observar no gráfico da área abaixo da curva, que a magnitude do efeito promovido pela indometacina foi maior nas artérias do grupo chumbo quando comparado ao grupo controle (Figura 9E). Estes resultados sugerem que nos animais do grupo chumbo existe maior participação dos prostanoídes vasoconstritores derivados da ciclooxigenase na resposta a fenilefrina.



**Figura 9:** Efeitos da indometacina (10  $\mu$ M), inibidor da ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de aorta e artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos dos grupos controle (Ct) (A-C) e tratados com chumbo (Pb) (B-D). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM (aorta) e 120 mM (mesentérica) de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise

comparativa da resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) foi utilizado o Teste-t não pareado. \*  $P < 0,05$  Ct/Pb vs Indometacina. &  $P < 0,05$  Ct vs Pb.

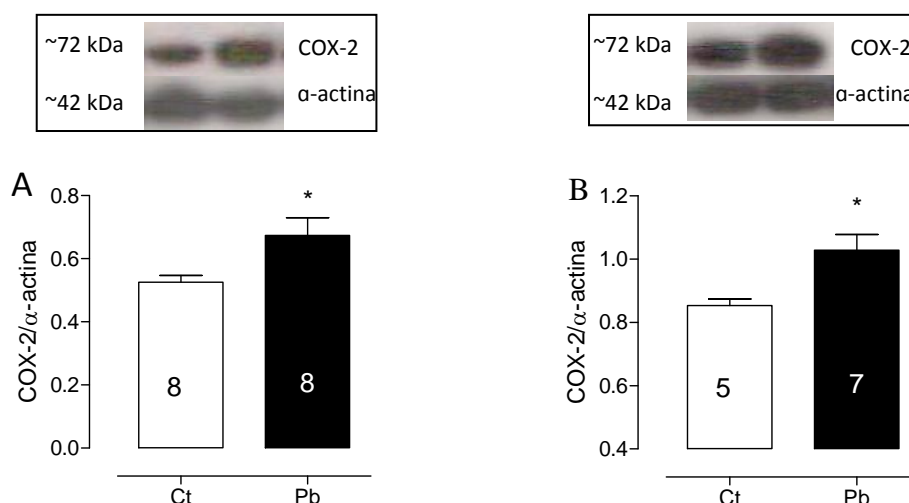
Diante desse resultado, fomos investigar se esta resposta poderia ser associada à participação do PGE2, por meio da incubação dos anéis de mesentéricas com SC-19220 (10  $\mu\text{M}$ ), inibidor de receptor de prostaglandina (EP1). A presença deste fármaco reduziu a resposta contrátil à fenilefrina nos segmentos de artéria mesentérica dos ratos do grupo chumbo (Figura 10B, Tabela 3) sem promover alteração nos anéis do grupo controle (Figura 10A, Tabela 3).



**Figura 10:** Efeitos do antagonista de receptor de prostaglandina (EP1) (10  $\mu\text{M}$ ), sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos dos grupos controle (Ct) (A) e tratados com chumbo (Pb) (B). Os resultados (Média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste- $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  Ct vs SC-19220.

#### 4.5.6.1 Expressão proteica da isoforma constitutiva da ciclooxigenase (COX-2).

Os resultados funcionais evidenciam envolvimento de prostanóides vasoconstritores nos efeitos do chumbo sobre a reatividade vascular à fenilefrina em aorta e mesentéricas. Baseando neste resultado, foi avaliada a expressão protéica da isoforma da COX-2 através da técnica de Western Blot nos dois leitos vasculares. Como vemos na Figura 11 a expressão proteica desta isoforma encontra-se elevada nos segmentos aórticos e mesentéricos de ratos do grupo chumbo.



**Figura 11:** Análise densitométrica da expressão protéica da isoforma induzível da ciclooxigenase (COX-2) em aorta torácica e artéria mesentérica de ratos dos grupos controle (Ct) e tratados com chumbo (Pb). (A) COX-2-aorta, (B) COX-2-mesentérica. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da COX-2 e da  $\alpha$ -actina de ambos os grupos. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da COX-2 e da  $\alpha$ -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct.

**Tabela 2:** Valores de  $pD_2$  e de resposta máxima ( $R_{max}$ , % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artéria aorta de ratos controle e chumbo nas condições: controle, sem endotélio (E-) e após incubação com L-NAME, apocinina ou indometacina.

	Controle		Chumbo	
	$R_{max}$	$pD_2$	$R_{max}$	$pD_2$
<b>Control</b>	99 $\pm$ 3,5	6,37 $\pm$ 0,20	127 $\pm$ 5,2*	7,26 $\pm$ 0,22*
<b>E-</b>	137 $\pm$ 9,6*	7,11 $\pm$ 0,07*	148 $\pm$ 7,9†	7,87 $\pm$ 0,30†
<b>L-NAME</b>	133 $\pm$ 8,2*	6,95 $\pm$ 0,12	146 $\pm$ 2,9†	7,91 $\pm$ 0,16†
<b>Apocynin</b>	84 $\pm$ 5,54*	6,22 $\pm$ 0,18	89 $\pm$ 6,7†	7,39 $\pm$ 0,25
<b>Indometacina</b>	89 $\pm$ 3,4	6,73 $\pm$ 0,28	90 $\pm$ 4,5†	7,65 $\pm$ 0,25

Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *t* não-pareado para comparação de médias. \* $p < 0,05$  vs Controle; † $p < 0,05$  vs Chumbo.

**Tabela 3:** Valores de pD<sub>2</sub> e resposta máxima (R<sub>máx</sub>, % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e chumbo nas condições: controle, sem endotélio (E-) e após incubação com L-NAME, apocinina, SOD, Indometacina ou SC-19220.

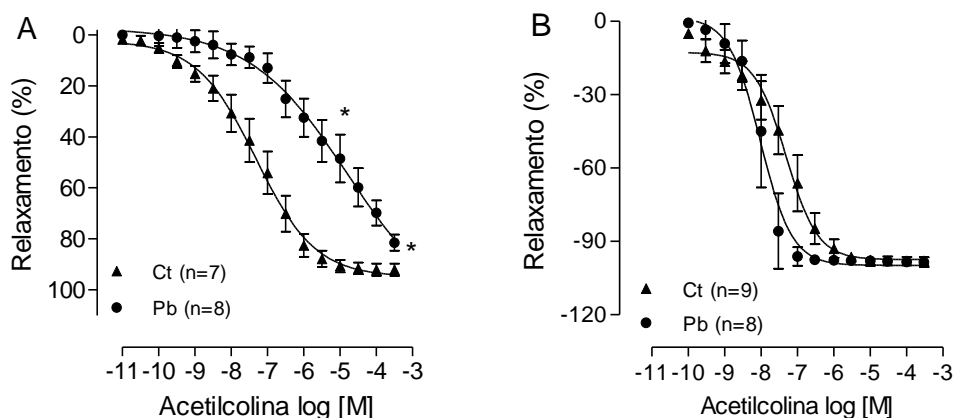
	Controle		Chumbo	
	R <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	R <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>
<b>Control</b>	96±3,2	5,79±0,08	110±2,7*	5,79±0,08*
<b>E-</b>	114±7,79*	5,66±0,23	108±3,3	6,26±0,10†
<b>L-NAME</b>	112±3,5*	6,39±0,13*	124±4,6†	6,26±0,09†
<b>Apocinina</b>	102±0,86	5,48±0,02	102±4,50	5,68±0,08
<b>SOD</b>	101±3,87	5,51±0,10	101±3,06	5,55±0,09
<b>Indometacina</b>	92±2,08	5,25±0,07*	88±5,40†	5,45±0,09†
<b>SC-19220</b>	100±7,19	-5,43±0,03	78±6,37†	-5,01±0,05†

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado para comparação de médias. \*p<0,05 vs controle; †p<0,05 vs chumbo.

#### 4.5.7 Efeitos da exposição por 30 dias ao acetato de chumbo sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) em aorta e artéria mesentérica.

Para avaliar se a exposição durante 30 dias ao chumbo seria capaz de alterar o relaxamento dependente ou independente do endotélio, foram realizadas, respectivamente, curvas concentração-resposta a acetilcolina (0.01 nM - 0.3 mM) e ao NPS (0.01 nM–0.3 mM) em anéis de aorta e mesentérica.

A acetilcolina promoveu relaxamento da artéria aorta de maneira concentração dependente nos dois grupos. Porém, o tratamento com chumbo mostrou um prejuízo da função endotelial. Assim, a resposta máxima a acetilcolina e a sensibilidade foram menores no grupo exposto ao chumbo (Figura 12A e Tabela 4). Entretanto, em artérias mesentéricas nenhuma observação estatisticamente significativa foi observada nos valores de R<sub>máx</sub> e pD<sub>2</sub> entre os grupos estudados (Figura 12B; Tabela 4).



**Figura 12:** Resposta dilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artéria aorta (A) e artéria mesentérica (B) de ratos dos grupos controle e chumbo. Os resultados (Média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração à FE. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e da sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste- $t$  não pareado. \*  $P < 0,05$  vs Ct.

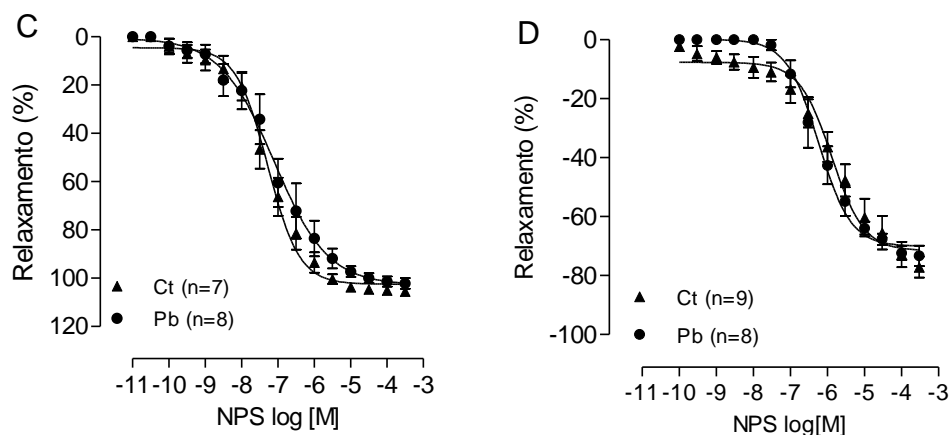
**Tabela 4:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta e mesentérica intactos de animais controle (ACh Ct) e tratados por 30 dias com chumbo (ACh Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com a fenilefrina.

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	$pD_2$
ACh CT (Aorta)	93,61 $\pm$ 2,75	7,25 $\pm$ 0,25
ACh Pb (Aorta)	81,48 $\pm$ 3,20*	5,71 $\pm$ 0,33*
ACh Ct (Mesentérica)	97,94 $\pm$ 1,05	7,63 $\pm$ 0,22
ACh Pb (Mesentérica)	98,50 $\pm$ 0,61	7,99 $\pm$ 0,05

Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste  $t$  não-pareado para comparação de médias. \* $p < 0,05$  vs controle.

Ao avaliar a resposta relaxante independente do endotélio, utilizando o NPS, observamos que a resposta de relaxamento do músculo liso promovida pelo fármaco foi igual nos grupos estudados, tanto nos anéis de aorta quanto nos anéis de mesentéricas (Figura 13A-B, Tabela 5). Desta forma, podemos sugerir que as alterações sobre o relaxamento vascular encontradas no grupo exposto ao chumbo são dependentes de disfunção do endotélio vascular, corroborando nossos achados

em aorta. Porém, ao avaliar a participação do endotélio nas mesentéricas, observamos pouca interferência nas alterações deste leito vascular.



**Figura 13:** Resposta dilatadora induzida pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em segmentos de artéria aorta (A) e artéria mesentérica (B) de ratos dos grupos controle e chumbo. Os resultados (Média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à FE. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e da sensibilidade ( $pD_2$ ) foi utilizado o Teste- $t$  não pareado.

**Tabela 5:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) induzidas pelo nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta e mesentérica intactos de animais controle (NPS Ct) e tratados por 30 dias com chumbo (NPS Pb). A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com a fenilefrina.

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	$pD_2$
NPS CT (Aorta)	105,62 $\pm$ 1,14	7,24 $\pm$ 0,19
NPS Pb (Aorta)	102,23 $\pm$ 2,21	7,06 $\pm$ 0,28
NPS Ct (Mesentérica)	77,13 $\pm$ 3,57	5,85 $\pm$ 0,27
NPS Pb (Mesentérica)	73,31 $\pm$ 3,47	6,22 $\pm$ 0,21

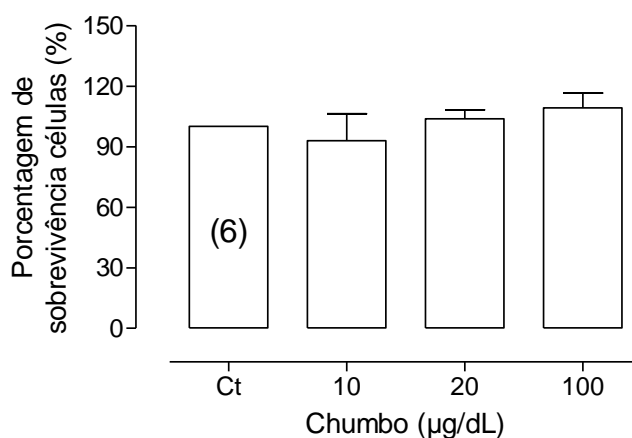
Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste  $t$  não-pareado para comparação de médias. \* $p < 0,05$  vs controle.

## 4.6 RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE CULTURA DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

### 4.6.1 Efeitos da exposição ao acetato de chumbo sobre a viabilidade celular de células musculares lisas vasculares.

Na tentativa de investigar os mecanismos subjacentes dos efeitos do chumbo nas alterações da reatividade vascular, utilizamos cultura de CMLVs. Primeiro, avaliamos a viabilidade celular, com as seguintes concentrações de acetato de chumbo 10, 20 e 100  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , expondo as células durante 48 h, utilizando ensaio de viabilidade celular MTT. Este experimento foi realizado para definir a concentração de chumbo a ser usada em cultura de células.

Após análise, não foram observadas alterações na viabilidade celular nestas concentrações (Figura 14). Diante deste resultado, escolhemos a concentração de 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , por ser praticamente a mesma concentração de chumbo que encontramos no sangue dos ratos tratados durante 30 dias com acetato de chumbo *i.m.*, modelo experimental aqui usado para avaliar a reatividade vascular.



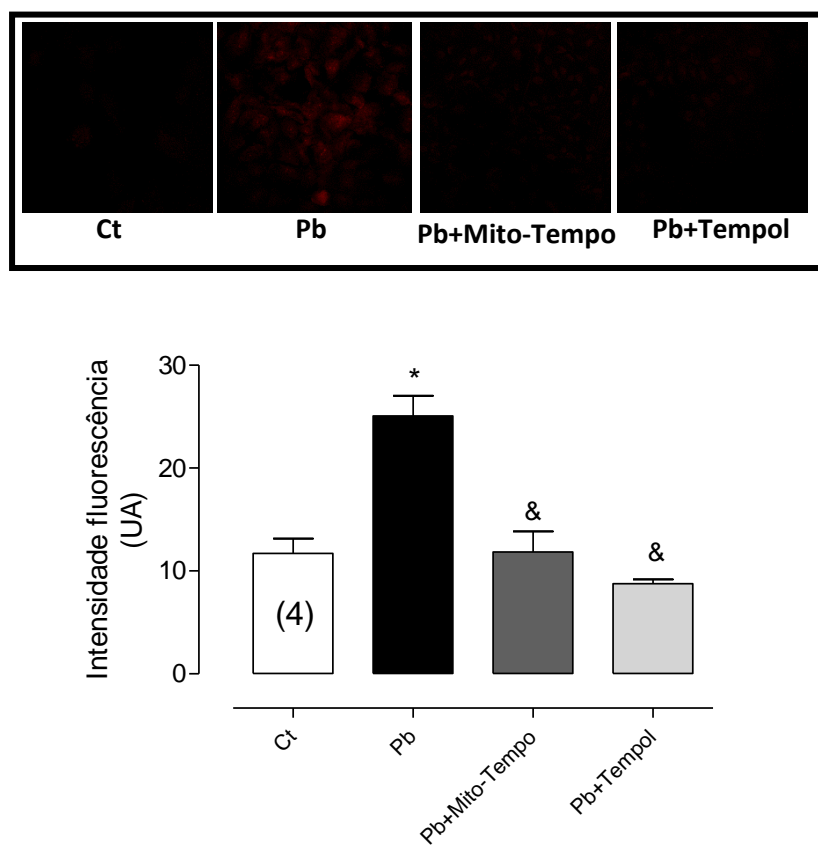
**Figura 14:** Efeito do acetato de chumbo na viabilidade das células do músculo liso de aorta de rato. As CMLVs foram cultivadas em meio de crescimento celular e depois foram tratadas com diferentes concentrações de chumbo (10, 20 e 100  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) durante 48 h. A porcentagem de sobrevivência das células foi avaliada pelo método de MTT. Resultados (média  $\pm$  EPM) apresentados como valores relativos comparados ao controle (100%). Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.

#### **4.6.2 Efeitos da exposição ao acetato de chumbo na produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em células musculares lisas.**

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio vem sendo demonstrado por vários autores, que está associam o efeito tóxico do chumbo sobre o sistema cardiovascular (Vaziri & Sica, 2004; Simões *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2014).

Baseados nestes estudos e nos resultados obtidos na reatividade vascular, esta sequência de experimentos em células musculares lisas, busca avaliar a produção de radicais livres, principalmente ânion superóxido, utilizando a técnica do DHE. A quantidade de espécies reativas é diretamente proporcional à intensidade de fluorescência induzida pelo DHE. As células incubadas com 20  $\mu\text{g/dL}$  de acetato de chumbo durante 48 h mostraram uma emissão de fluorescência maior do que as células não expostas ao chumbo (controle) (Figura 15). Para verificar se a produção de ânion superóxido era modificada por antioxidantes, as células foram incubadas com o mimético da SOD o tempol (10  $\mu\text{mol/L}$ ) e um antioxidante mitocondrial específico o mito-TEMPO (5  $\mu\text{M/L}$ ) 30 minutos antes de serem expostas ao chumbo. Estes antioxidantes reduziram a emissão de fluorescência (Figura 15), o que está de acordo com a capacidade destes antioxidantes para reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio. O efeito observado com mito-TEMPO nos permite sugerir também um aumento do estresse oxidativo mitocondrial promovido pelo chumbo.

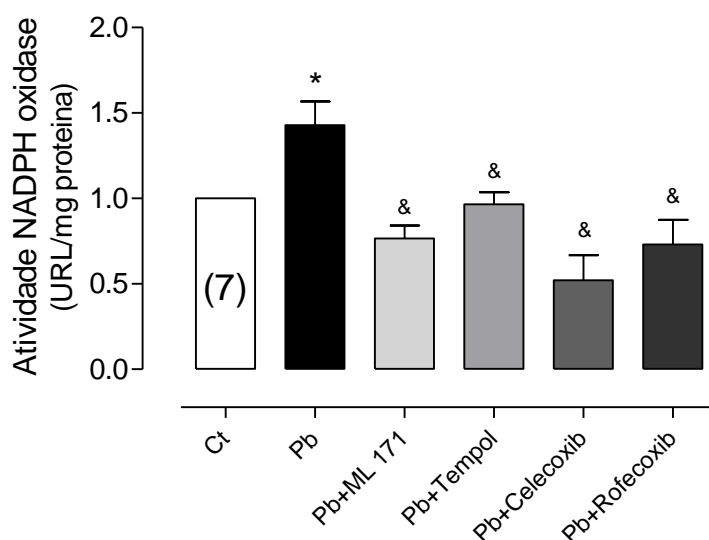




**Figura 15:** Efeitos do chumbo (20 µg/dL) por 48 horas sobre a produção de ânions superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ) em CMLVs, na presença ou ausência de mito-TEMPO (5 µmol/L) e Tempol (10 µmol/L). Na parte superior, encontram-se microfotografias representativas da fluorescência emitida pelo dihidroetídeo (DHE) em CMLVs em situação controle, exposta ao chumbo e expostas ao chumbo na presença de mito-TEMPO e Tempol. O gráfico representa a intensidade de fluorescência em unidade arbitrária (UA) emitida por DHE. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  vs Ct, & $P < 0,05$  vs Pb. ANOVA uma-va e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.

Uma vez demonstrado o incremento na produção de EROs pela exposição ao chumbo, e sabendo que as isoformas da NADPH oxidase tem sido descritas como as maiores produtoras de EROs no tecido vascular (Griendling *et al.*, 2000), foi mensurada a atividade da NADPH oxidase em CMLVs, com a finalidade de investigar se o aumento da produção de ânions superóxidos era via aumento da atividade da NADPH oxidase. A Figura 16 mostra que a atividade desta enzima se apresentara aumentada frente ao estímulo com chumbo (20 µg/dL, por 48h) e este aumento da atividade foi reduzido na presença do inibidor da NOX-1 (ML 171 – 0,5 µmol/L) e com um antioxidante (Tempol - 10 µmol/L). Por outro lado, os inibidores da

COX-2 celecoxib e rofecoxib (10  $\mu\text{mol/L}$ ) também reduziram o aumento da atividade da NADPH oxidase induzido por chumbo (Figura 16). Sugerindo a participação dos prostanoídes sintetizados pela COX-2 no mecanismo implicado neste efeito do chumbo.

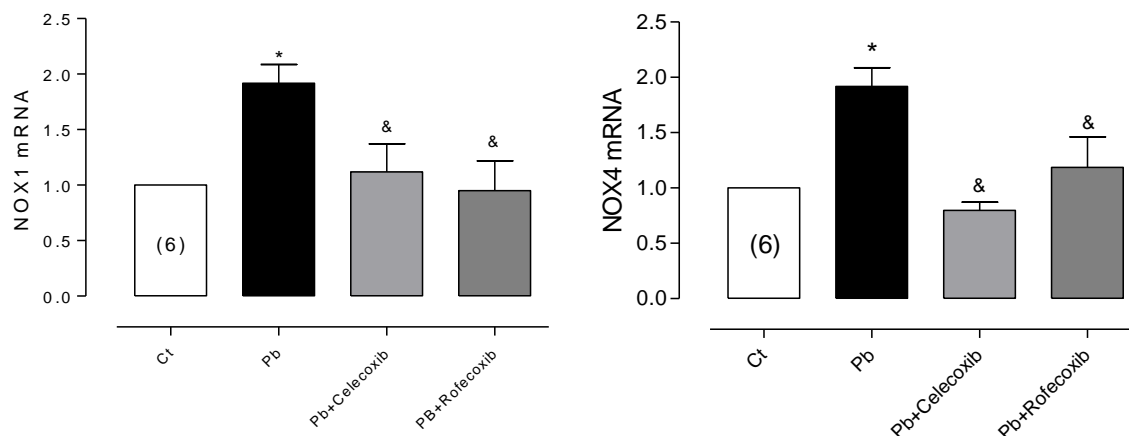


**Figura 16:** Efeito do chumbo (20  $\mu\text{g/dL}$ , 48h) sobre a atividade da NADPH oxidase em CMLVs, na presença ou ausência de ML 171 (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ), Tempol (10  $\mu\text{mol/L}$ ), Celecoxib (10  $\mu\text{mol/L}$ ) ou Rofecoxib (10  $\mu\text{mol/L}$ ). Resultados (média  $\pm$  EPM) expressados como Unidades Relativas de Luz (URL) comparada ao controle (1). \* $P < 0,05$  vs Ct, & $P < 0,05$  vs Pb. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.

#### 4.6.3 Efeitos do chumbo sobre a expressão gênica de NOX1 e NOX4 em células musculares lisas.

Uma vez observado que a exposição ao chumbo aumenta a produção de EROs e a atividade da NADPH oxidase o seguinte passo foi estudar o efeito do chumbo sobre os níveis de RNAm das duas principais isoformas da NADPH oxidase a nível vascular, NOX1 e NOX4. Após incubação com chumbo durante 48 h encontramos que tanto a expressão do RNAm da NOX1 como da NOX4 estão aumentadas em CMLVs (Figura 17 A-B). Este resultado sugere que em CMLVs NOX1 e NOX4 podem ser a principal fonte de produção de espécies reativas após exposição ao chumbo. Adicionalmente, observamos que existe uma relação entre o aumento da expressão de NOX1 e NOX4 e prostanoídes sintetizados por COX-2. Assim quando pré-incubarmos as CMLVs com os inibidores de COX-2 celecoxib (10  $\text{mM/L}$ ) e

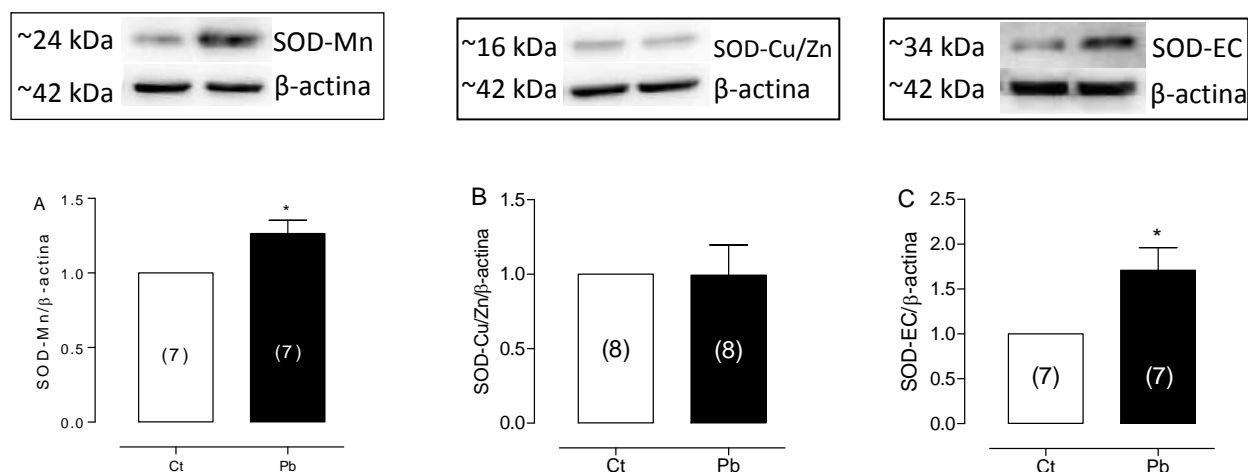
rofecoxib (10 mM/L), o aumento da expressão do RNAm de NOX1 e NOX4 induzido pelo chumbo foi prevenido (Figura 17 A-B).



**Figura 17:** Efeito do chumbo (20 µg/dL, 48h) sobre os níveis de RNAm de NOX1 e NOX4 em CMLVs, na presença e na ausência de celecoxib e rofecoxib. Resultados (média ± EPM) expressados como Unidades Relativas de Luz (URL) comparada ao controle (1). \*p < 0,05 vs Ct, &p < 0,05 vs Pb. ANOVA uma-va e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.

#### 4.6.4 Efeitos do chumbo sobre a expressão proteica das isoformas da SOD em células musculares lisas.

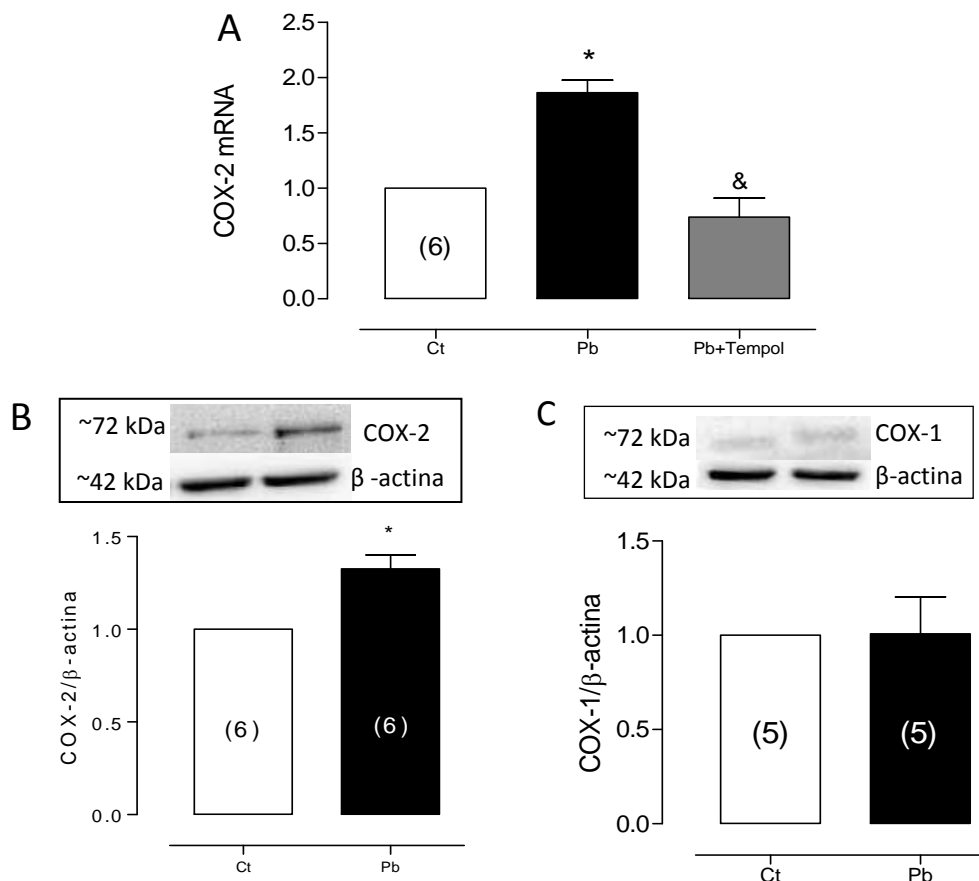
Estudamos também se o tratamento com o chumbo poderia alterar a expressão das enzimas antioxidantes SOD-Cu/Zn, SOD-Mn e SOD-EC. Similar ao que encontramos em artéria aorta, a expressão da proteína SOD-Mn foi aumentada em CMLVs tratadas com chumbo (Figura 18A), assim como a expressão da SOD-EC (Figura 18C). No entanto, a expressão proteica da Cu/Zn-SOD não foi afetada (Figura 18B).



**Figura 18:** Efeito do chumbo (20  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , 48h) sobre expressão protéica das isoformas da superóxido dismutase (SOD) em CMLVs. Análise densitométrica para (A) SOD-Mn, (B) SOD-CuZn e (C) SOD-EC. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão de SOD-Mn, SOD-CuZn, SOD-EC e da  $\beta$ -actina em células com e sem estímulo. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão mostrados como expressão proteica da SOD-Mn, SOD-Cu/Zn e SOD-EC em relação à  $\beta$ -actina. . Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste- $t$  não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct.

#### 4.6.5 Efeitos do chumbo sobre a expressão gênica e proteica de COX-2 e COX-1 em células musculares lisas.

CMLVs tratadas com chumbo, durante 48 h, também apresentaram aumento dos níveis de RNAm de COX-2 (Figura 19A). Este aumento foi acompanhado por um aumento da expressão proteica da COX-2, sem causar alteração na expressão proteica da COX-1 (Figura 19B-C). Além disso, observamos uma relação entre EROs e produtos da COX-2. Assim quando pré-incubarmos as CMLVs com o antioxidante Tempol, o aumento da expressão gênica de COX-2 induzida pelo chumbo foi prevenido (Figura 19 A).

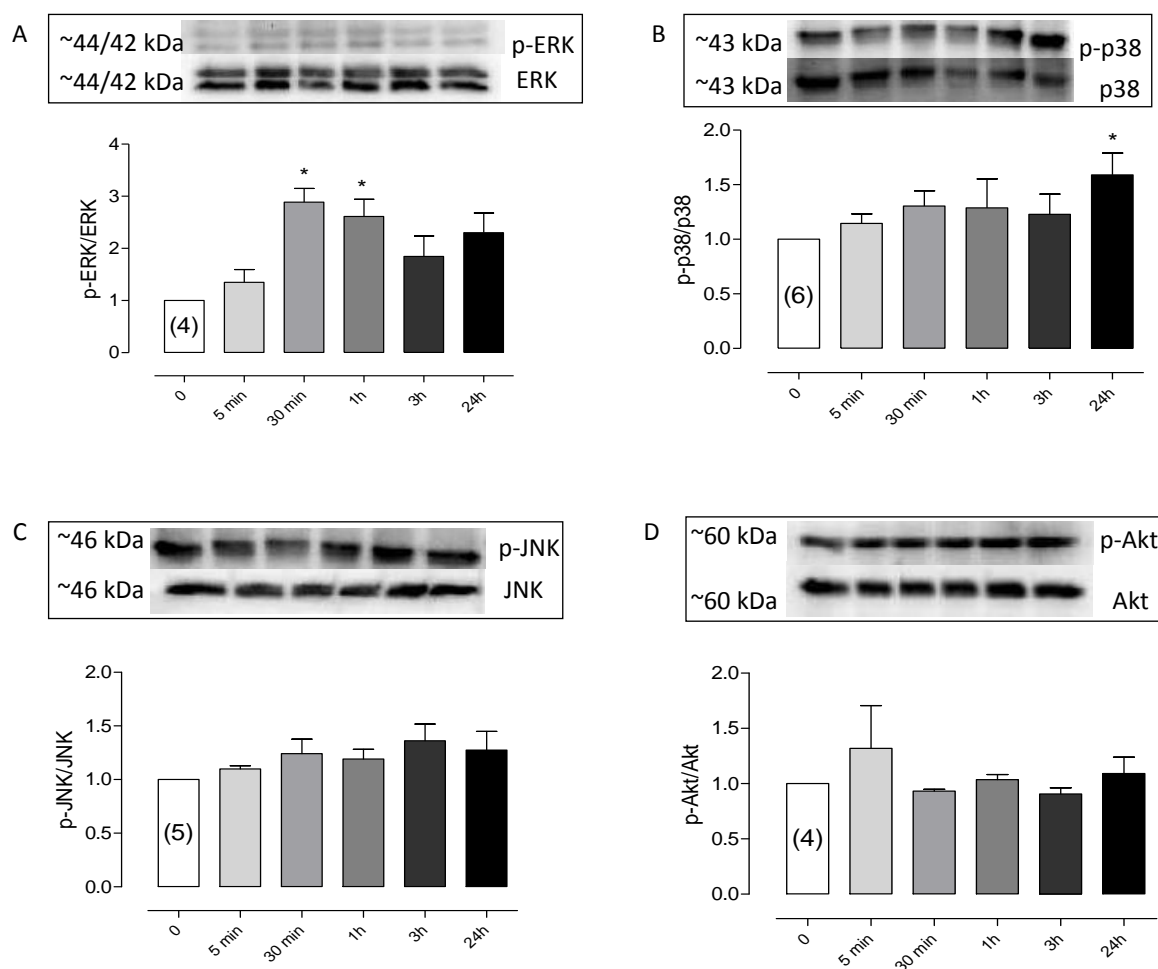


**Figura 19:** A: Efeito do chumbo (20  $\mu\text{g/dL}$ ) sobre os níveis de RNAm de COX-2 em CMLVs, na presença e na ausência de Tempol (10  $\mu\text{mol/L}$ ). B, C: Análise densitométrica de Western blot para expressão protéica das isoformas indusível (COX-2) e constitutiva (COX-1) da ciclooxigenase em CVLMs. Resultados (média  $\pm$  EPM) expressados como Unidades Relativas de Luz (URL) comparada ao controle (1) e mostrados como expressão proteica da COX-2 e COX-1 em relação à  $\beta$ -actina. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses. Para análise comparativa foi usado ANOVA uma-via e pós-teste de *Tukey* e Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct. & $P < 0,05$  vs Pb.

#### 4.6.6 Via de sinalização das MAPK está envolvida no aumento dos níveis de RNAm de NOX e COX-2 induzido pelo chumbo.

Para verificar os efeitos do chumbo (20  $\mu\text{g/dL}$ ) sobre a ativação das MAPKs e Akt, estudamos o efeito de diferentes tempos de exposição ao metal (0,15, 30 min e 1, 3, 24h). Observamos que a estimulação de ERK1/2 pelo chumbo é tempo dependente, onde sua expressão aumenta nos tempos 30-60 min, mas não em tempos longos de exposição (Figura 20A). Em contraste, a MAPK p38 foi ativada pelo chumbo somente após longo tempo de exposição ao metal (24 h) (Figura 20B). Porém, a

exposição ao chumbo nesta concentração e neste tempo, não foi capaz de alterar a expressão da MAPK JNK nem da Akt (Figura 20C-D).

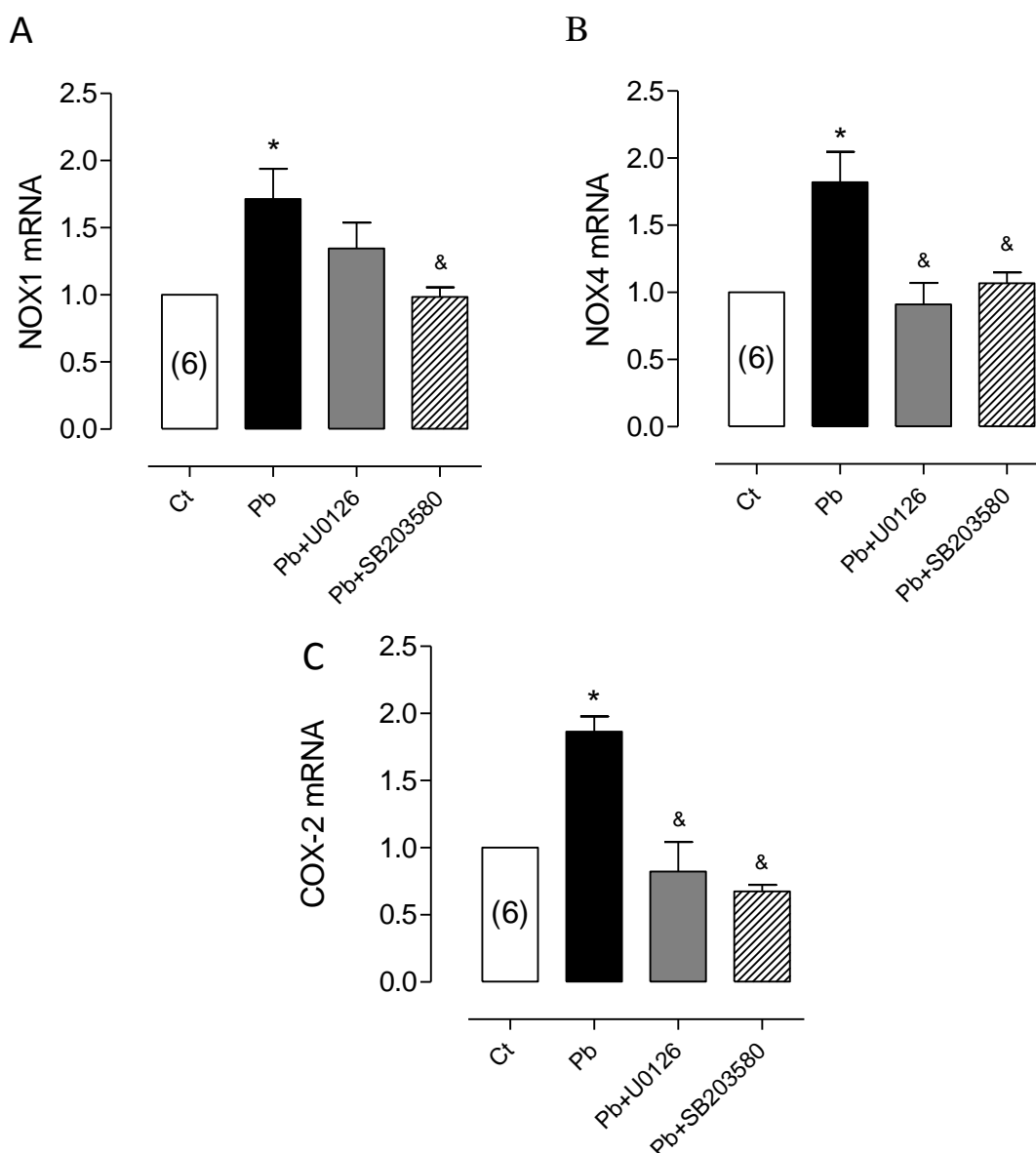


**Figura 20:** Chumbo induz a fosforilação das MAPKs ERK1/2 e p38. Efeitos do chumbo sobre a ativação de (A) ERK1/2, (B) p-38 MAPK, (C) JNK e (D) Akt em CMLVs. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão das MAPKs ERK1/2, p-38, JNK e da Akt nos tempos de exposição ao chumbo. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como a razão entre MAPK fosforilada e o total da MAPK e normalizados para os valores obtidos em células controles não estimuladas. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses. Para análise comparativa foi usado ANOVA uma-va seguida por teste *Tukey*. \* $P < 0.05$  vs Ct (0).

Estudos recentes mostram que a via das MAPKs tem papel na modulação de COX-2 e na produção de ROS (Ohnaka *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013). Diante disso e sabendo que a exposição ao chumbo ativa a via das MAPKs, nosso próximo passo foi investigar se a via de sinalização das MAPKs estava envolvida nos efeitos do chumbo sobre o aumento dos níveis de RNAm de NOX e COX-2. Para isso usamos

os inibidores de p38 e de ERK1/2, SB203580 (10  $\mu$ mol/L) e U0126 (10  $\mu$ mol/L), respectivamente.

A expressão gênica de NOX1 foi normalizada na presença do inibidor de p38 (Figura 21A), assim como a expressão gênica de NOX-4 e COX-2 foram normalizadas pelos dois inibidores (Figura 21B-C). Estes resultados sugerem que a ativação destas quinases pelo chumbo, estão envolvidas em eventos que ativam a NADPH oxidase e a ciclooxygenase-2.



**Figura 21:** Participação da MAPKs na modulação de COX-2 e NOX. Efeitos de U0126 (10  $\mu$ mol/L) e SB203580 (10  $\mu$ mol/L) sobre a expressão de RNAm de (A) NOX-1, (B) NOX-4 e (C) COX-2 induzida por chumbo em CMLVs. Resultados (média  $\pm$  EPM) expressados como Unidades Relativas de Luz

(URL) comparada ao controle (1). \*P<0.05 vs Ct, &P<0.05 vs Pb. ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.

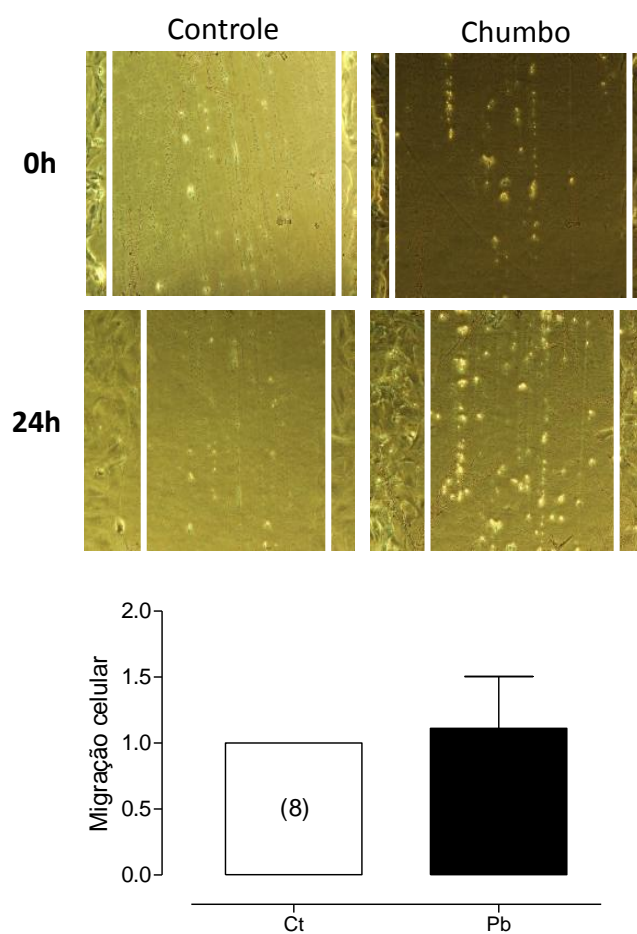
#### **4.6.7 Efeitos do chumbo sobre a migração e proliferação de células musculares lisas.**

Evidências mostram que a cascata de ativação das MAPKs é a principal via de sinalização que regula a proliferação, migração, diferenciação, inflamação e apoptose celular (Yang *et al.*, 2003). Baseados nestes estudos e nos nossos resultados de ativação das MAPKs pelo chumbo aqui apresentados, investigamos a participação do chumbo na migração e proliferação de células musculares lisas.

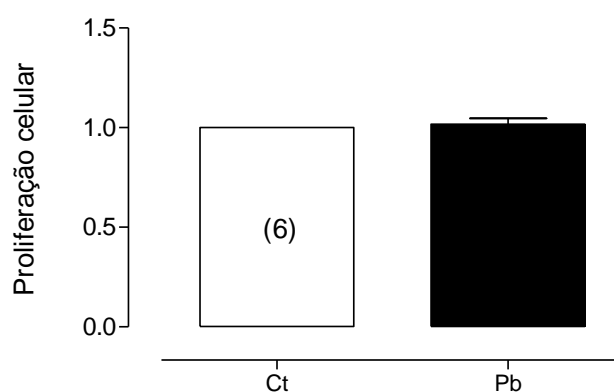
Para quantificar a migração celular, fotos da área de ferida, como descrita anteriormente, foram capturadas no tempo zero (0) e, depois, foram comparadas com fotos obtidas 24 horas após o estímulo com chumbo. Os dados representam a área de fechamento da ferida comparado ao tempo zero da situação com estímulo (chumbo) em relação à situação controle (sem o estímulo do chumbo), assumida como 1 (um), como pode ser visto nas imagens da Figura 22. A quantificação da migração celular após 24 horas de exposição ao chumbo foi de  $1,33 \pm 0,38$ , mostrando que nesta concentração o chumbo não promove alteração na migração de células musculares lisas.

Em relação à proliferação celular de CML Vs após incubação com chumbo (20 µg/dL, durante 48 horas), não foi observada diferença com relação ao grupo controle, assumido como 1 (um) (chumbo:  $1,01 \pm 0,03$ ), como podemos observar na Figura 23.





**Figura 22:** Efeitos do acetato de chumbo (20 µg/dL, 24 h) na migração celular de CMLVs. Fotos capturadas com auxílio de microscópio invertido, no tempo zero e após 24 horas de estímulo com o chumbo. Resultados (média ± EPM) apresentados como valores relativos comparados ao controle (1). Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.



**Figura 23:** Efeito do acetato de chumbo (20 µg/dL, 48 h) sobre a proliferação celular de CMLVs. Resultados (média ± EPM) apresentados como valores relativos comparados ao controle (1). Número de unidades experimentais utilizadas entre parênteses.

***DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos que baixa concentração sanguínea de chumbo após 30 dias de exposição, foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica, a contração induzida por fenilefrina e diminuir a resposta vasodilatadora em aorta e artérias mesentéricas de ratos. Os dados sugerem que esses efeitos observados se devem ao aumento da produção de radicais livres derivados do oxigênio, principalmente o ânion superóxido, ocasionando redução da biodisponibilidade de NO. E ainda, por aumento da participação de prostanoídes vasoconstrictores derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase. Os nossos resultados também sugerem que as MAPKs p38 e ERK1/2 estão envolvidas no aumento dos níveis vasculares de COX-2 e na produção de EROs após exposição ao chumbo, e estas atuam em conjunto para produzir as alterações vasculares que podem contribuir para a ocorrência de hipertensão arterial.

### 5.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CHUMBO

A “Agency for Toxic Substances and Disease Registry” (ATSDR) estabelece como referência, níveis de chumbo no sangue na concentração de 60 µg/dL para pessoas ocupacionalmente expostas. No Brasil, de acordo com a norma regulamentadora nº 7 (NR7) do Ministério do Trabalho (1988), os valores de referência, o qual apresenta valor próximo de ser encontrado em uma população não-exposta ocupacionalmente e o Índice Biológico Máximo Permitido são respectivamente 40 µg/dL e 60 µg/dL.

Estudos populacionais têm demonstrado um aumento da concentração sanguínea de chumbo variando de 30 à 60 µg/dL em pessoas ocupacionalmente expostas (Ehrlich *et al.*, 1998; Bene *et al.*, 2001). Corroborando esses achados, Barbosa Jr. *et al.* (2005) demonstraram concentrações médias de chumbo no sangue de  $11,6 \pm 9,6$  µg/dL em 40 voluntários de 18 a 60 anos de idade da cidade de Bauru (SP) residentes próximo a uma antiga fábrica de baterias.

Neste trabalho, 30 dias de exposição controlada ao chumbo levou a uma concentração sanguínea de 21,7 µg/dL, valor muito menor do que é considerado seguro para pessoas expostas. Assim, este estudo se reveste de relevância para avaliar e elucidar os efeitos da exposição por 30 dias a baixas concentrações de chumbo (21,7 µg/dL) sobre o sistema cardiovascular.

## 5.2 EFEITO DO CHUMBO NO COMPORTAMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E SOBRE PARÂMETROS PONDERAIS.

A Hipertensão Arterial é uma doença crônica, de etiologia multifatorial, considerada como um importante problema de saúde pública por ser um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (Yazbeck *et al*, 2009). Vem sendo demonstrado, que a exposição a substâncias químicas ambientais, incluindo o chumbo, está emergindo como um potencial fator de risco para a hipertensão (Weinhold, 2004; Mamtani *et al* 2011; Simões *et al* 2011). Todavia, os mecanismos que o chumbo pode afetar a pressão arterial e causar hipertensão são complexos (Heydari *et al* 2006), e sua causa nem sempre é conhecida.

Diversos estudos associam os níveis sanguíneos de chumbo com a hipertensão (Harlan, 1988; Glenn *et al.*, 2003; Navas-Acien *et al.*, 2007). Estudos prévios demonstram associação entre exposição ao chumbo e desenvolvimento de hipertensão arterial em humanos (Glenn, *et al.*, 2003, 2006; Kosnett *et al.*, 2007; Navas-Acien *et al.*, 2008) e em animais (Carmignani, *et al.*, 1999, 2000; Bravo *et al.*, 2007; Grizzo & Cordelline, 2008). Diante destas informações, investigamos o efeito da exposição a baixas concentrações de chumbo sobre a pressão arterial sistólica (PAS) nesse modelo experimental e observamos que a pressão aumentou significativamente no grupo tratado com chumbo ao final de trinta dias de exposição.

É bem estabelecido que ratos tratados cronicamente com altas concentrações de chumbo apresentam aumento de PA. Estudos realizados por Carmignani *et al.* (1999) mostraram que a exposição a 60 ppm de chumbo em água de beber por 10 meses aumenta a PAS e PAD. Outros trabalhos demonstram aumento da PA em ratos expostos a 100 ppm de chumbo em água de beber no período de 2 a 8 semanas (Sharifi *et al.*, 2004). Malvezzi *et al.* (2001) mostraram que ratos Wistar expostos ao chumbo em concentrações maiores (750 ppm em água de beber) por 10 semanas, apresentaram uma concentração sanguínea de chumbo de 67,8 µg/dL e significativo aumento da PAS a partir da 5ª semana quando comparados ao grupo controle.

Corroborando estes estudos, Roncal *et al.* (2007) demonstraram que ratos submetidos ao tratamento crônico com 150 ppm de acetato de chumbo na água de beber, por 04 semanas, apresentavam uma concentração sanguínea de chumbo de 26 µg/dL e obtiveram aumento na pressão arterial sistólica. Estudos em

trabalhadores expostos ao chumbo são condizentes com os estudos em animais acima citados, pois mostraram que trabalhadores expostos ao chumbo também apresentaram aumento significativo da PA (Kasperczyk *et al.*, 2009; Ahamed *et al.*, 2008). É interessante ressaltar que baixos valores e não altos valores de exposição ao chumbo também têm sido fortemente associados com o desenvolvimento de hipertensão, como demonstrado por nós neste estudo.

A hipertensão arterial impõe ao miocárdio sobrecarga mediante o aumento da pós-carga decorrente da elevação da resistência vascular periférica (RVP) (Kaito *et al.*, 1996). Autores relatam a correlação entre hipertrofia cardíaca e disfunção ventricular decorrentes dos elevados níveis pressóricos da hipertensão arterial (Bing *et al.*, 1995). Em nosso estudo, apesar do aumento da PA, os animais tratados com chumbo não apresentam alterações no peso do coração (normalizado pelo comprimento da tíbia), estimando-se, assim, a hipertrofia cardíaca que se manteve inalterada entre os grupos.

Nosso grupo vem demonstrando com sucesso em modelos experimentais com animais, que a exposição aguda e/ou crônica ao chumbo exerce efeitos prejudiciais sobre a função cardíaca e vascular (Simões *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2014; Fiorim *et al.*, 2011; Fioresi *et al.*, 2014). Porém, apesar da existência de trabalhos que estudam os efeitos tóxicos deste metal, ainda não está claro os efeitos resultantes da exposição a baixas doses de chumbo sobre o sistema cardiovascular e seu comportamento na pressão arterial e função vascular.

Avaliando o peso corporal dos animais tratados com chumbo, este não foi diferente entre os grupos analisados. Esse dado confirma outros estudos que também avaliaram o peso corporal dos ratos expostos cronicamente ao chumbo e não observaram alteração nesse parâmetro (Carmignani *et al.*, 1999; Grizzo & Cordelline, 2008). Estudo do nosso laboratório (Silveira *et al.* 2011), com mesmo modelo experimental, diferindo na dose de chumbo administrada, mostrou que o peso corporal dos animais se manteve igual entre os grupos ao final do tratamento.

### 5.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR 30 DIAS A BAIXA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO EM ARTÉRIAS AORTA E MESENTÉRICA.

### 5.3.1 Efeitos do chumbo sobre a resposta vascular a fenilefrina e o papel do endotélio.

Neste trabalho, avaliamos se o tratamento crônico com baixas concentrações de chumbo altera a função da aorta e das artérias mesentéricas de resistência. Observamos que a resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos do grupo chumbo revelou aumento da contração vascular, confirmada pelo aumento da sensibilidade ( $pD_2$ ) e da resposta máxima ( $R_{máx}$ ) desenvolvida.

Semelhante aos nossos achados, Heydari *et al.* (2006), também documentaram que o tratamento com 100 ppm de chumbo em água de beber, foi capaz de aumentar a resposta máxima e a sensibilidade na presença de fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos tratados com chumbo por um período de 8 a 12 semanas, sendo esses valores mais expressivos no grupo tratado por oito semanas. Recentemente, estudo desenvolvido em nosso laboratório por Silveira e colaboradores (2014), utilizando o mesmo modelo experimental aqui apresentado, porém com concentração sanguínea de chumbo inferior, mostraram aumento da reatividade vascular, com menor magnitude, em segmentos de aorta de animais expostos ao chumbo. Por outro lado, Shelkovnikov *et al.* (2001), ao estudar os efeitos do acetato de chumbo (concentrações de  $10^{-8}$  até  $10^{-4}$  mol/L) sobre anéis de aorta torácica de ratos com e sem endotélio, não registraram nenhuma mudança na contração pela norepinefrina. Karimi *et al.* (2002), também não encontraram diferença na sensibilidade e na resposta máxima à fenilefrina de anéis de ratos expostos a 100 ppm de acetato de chumbo por 28 dias quando comparados ao grupo controle. No entanto, Fiorim *et al.* (2011), mostraram que a exposição por 7 dias ao acetato de chumbo (9,98  $\mu\text{g/dL}$ ) promove redução da reatividade vascular em aorta de ratos. Assim, os resultados conflitantes provavelmente devem-se as prováveis diferenças nas concentrações de chumbo as quais os animais foram expostos e também ao tempo de exposição aos quais os animais foram submetidos.

As artérias com diâmetro menor 500  $\mu\text{m}$ , chamadas de artérias de resistência, tem um papel fundamental na resistência vascular total e, portanto na manutenção da homeostase pressórica (Mulvany & Aalkjaer, 1990). A resistência vascular periférica é inversamente proporcional ao raio do vaso à quarta potência e, portanto, diminuições no tamanho destas artérias, podem produzir importantes aumentos na resistência periférica e, por conseguinte na pressão arterial (Mulvany & Aalkjaer,

1990). Na literatura há poucos relatos de que o tratamento crônico com acetato de chumbo esta associado a alterações na função vascular de artérias mesentéricas de resistência. Por isso, neste estudo avaliamos a função vascular destas artérias de resistência de terceira ordem de ratos controle e tratados com chumbo. Observamos que a exposição ao chumbo induziu aumento da resposta contrátil máxima à fenilefrina sem alterar a sensibilidade. Corroborando nossos achados, Skoczynska e colaboradores (1986), mostraram resposta pressora a norepinefrina potencializada em artérias mesentéricas isoladas de ratos, em animais expostos ao chumbo por 5 semanas (50,0 mg/kg/dia, gavagem).

Este aumento de reatividade vascular observado em aorta e mesentérica, não foi devido a um aumento na capacidade contrátil geral dos vasos, uma vez que as respostas ao cloreto de potássio não foram afetadas pelo tratamento com chumbo nem na aorta nem nas artérias mesentéricas.

Diante dos resultados de reatividade, fomos então investigar se o endotélio vascular estaria envolvido nas alterações observadas, uma vez que este é o principal responsável por modular o fluxo sanguíneo vascular, através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras. Em algumas doenças ou na presença de fatores de risco como a hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão, insuficiência cardíaca ocorre uma alteração na capacidade do endotélio vascular em controlar adequadamente a resistência vascular. Essa situação é conhecida como disfunção endotelial (Cai & Harrison, 2010). Recentes estudos mostraram que além dos fatores de risco citados acima, a exposição a metais pesados também é um importante deflagrador de doenças cardiovasculares por causar alterações no endotélio vascular (Silveira *et al.*, 2010; Fiorim *et al.*, 2011).

Para avaliar a modulação endotelial na resposta contrátil a fenilefrina, estudamos o efeito provocado pela retirada do endotélio vascular. Assim, foi observado um aumento da resposta contrátil a FE tanto em aorta do grupo controle como do grupo de animais tratados com chumbo. No entanto, a magnitude dessa resposta foi menor nos ratos tratados com chumbo. Esse dado sugere que o tratamento por 30 dias com acetato de chumbo provavelmente esteja reduzindo a liberação de fatores vasodilatadores e/ou aumentando a liberação de fatores vasoconstrictores dependente do endotélio. Este efeito poderia contribuir para o aumento da resposta vasoconstrictora à FE observada em aortas de ratos tratados com chumbo.

Resultados similares foram encontrados por Silveira e colaboradores (2014). Em contrapartida, Karimi *et al.* (2002) não demonstraram diferenças na sensibilidade e na resposta máxima em anéis de aorta intactos e sem endotélio de ratos tratados por 28 dias com 100 ppm de chumbo.

Em artérias mesentéricas, a eliminação do endotélio produziu um pequeno aumento, de igual magnitude, na resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artérias de ratos controle e chumbo, não sendo estatisticamente diferente entre os grupos. Assim, podemos sugerir que a eliminação do endotélio não modificou a resposta contrátil a fenilefrina nas artérias mesentéricas de ratos expostos ao chumbo, sugerindo uma menor participação endotelial nas alterações vasculares observadas neste leito vascular.

### **5.3.2. Efeito da exposição por 30 dias ao chumbo sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio.**

Para comprovar se o tratamento com chumbo alterava as respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio realizamos curvas concentração resposta a ACh em anéis de aorta e mesentérica. O tratamento com o chumbo induziu um prejuízo nas respostas vasodilatadoras à acetilcolina em aorta, todavia não houve alteração em artérias mesentéricas. Do que se sabe e está descrito na literatura, não há estudos que demonstrem o efeito do chumbo sobre as respostas vasodilatadoras à ACh em mesentéricas. Estes resultados preliminares mostram que nesta concentração e tempo de exposição, o chumbo não promove prejuízo no relaxamento dependente do endotélio no leito mesentérico. A vasodilatação dependente do endotélio se mostra prejudicada em aorta, ou seja, alterou a produção de NO estimulada pela acetilcolina, corroborando os dados de contração a FE.

De forma similar aos nossos achados em aorta, foi observado prejuízo na resposta vasodilatadora à ACh, em artéria caudal de ratos, após a perfusão do leito caudal com 100  $\mu$ M de acetato de chumbo (Silveira *et al.*, 2010). Silveira *et al.* (2014) também mostraram que a exposição crônica a doses baixas de chumbo (12  $\mu$ g/dL) diminui o relaxamento induzido por ACh em aorta de ratos. Em adição, Marques *et al.* (2001) observaram prejuízo na resposta vasodilatadora a ACh, nos anéis de aorta de ratos expostos ao chumbo por 30 dias.



Em contrapartida, Fiorim *et al.* (2011) demonstraram em ratos expostos por 7 dias ao chumbo (9,98 µg/dL) que nenhuma alteração significativa foi observada no relaxamento promovido pela ACh em anéis de aorta controle e chumbo, sugerindo que a vasodilatação dependente do endotélio estava preservada nestes animais. Resultados semelhantes foram encontrados por Grizzo *et al.* (2008), após exposição perinatal ao chumbo, em aortas de ratos Wistar jovens.

Podemos inferir que as diferenças encontradas se devam as doses de chumbo administradas e ao tempo de exposição aos quais os animais foram submetidos.

Sabe-se que a resposta dilatadora a ACh na aorta é parcialmente dependente de NO (Tschudi *et al.*, 1996). Por tanto, uma alteração nos mecanismos de relaxamento do NO poderia estar envolvido na diminuição das respostas vasodilatadoras a ACh, o que corroboraria também nossos achados de reatividade à fenilefrina. O incremento na síntese de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2 está associado à hipertensão arterial podendo, também, ser responsável pelo prejuízo no relaxamento dependente do endotélio (Vanhoutte & Boulanger, 1995, Taddei *et al.*, 1997).

Para avaliar se o tratamento por 30 dias com acetato de chumbo causa prejuízo no relaxamento do músculo liso vascular, foram realizados experimentos com o nitroprussiato de sódio (NPS). O NPS promoveu resposta vasodilatadora concentração dependente, semelhante em ambos os grupos experimentais tanto em aorta como em mesentéricas, sugerindo que neste modelo de exposição não modificou a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhang *et al.* (2007) que mostraram não haver diferença no relaxamento induzido pelo NPS em anéis de aorta incubados por 0,5, 6, 12 e 24 horas com 1ppm de chumbo. Em adição, Karimi *et al.* (2002) não observaram diferença estatisticamente significativa no relaxamento induzido pelo NPS em ratos tratados com 100 ppm de chumbo por 28 dias. Já Marques *et al.* (2001) observaram prejuízo na resposta vasodilatadora ao NPS, nos anéis de aorta de ratos expostos ao chumbo por 30 dias.

### **5.3.3 Efeitos da exposição por 30 dias ao chumbo sobre a biodisponibilidade do óxido nítrico em anéis de aorta torácica e de artérias mesentéricas de ratos.**

Entre os fatores vasodilatadores derivados do endotélio mais importantes, está o óxido nítrico. É bem descrito que o NO endotelial participa no controle do tônus

vascular e estudos de exposição crônica ao chumbo mostram indução da disfunção endotelial e redução da biodisponibilidade de NO (Ding *et al.*, 1998; Vaziri *et al.*, 1999; 2001; Silveira *et al.*, 2014). Assim, para investigar em nosso modelo experimental de exposição ao chumbo se a modulação pelo NO nas respostas contráteis a fenilefrina estavam alteradas, utilizamos o inibidor de sintase do óxido nítrico, L-NAME. De forma similar com o que ocorreu na retirada do endotélio, observou-se que a incubação da artéria aorta com o L-NAME produziu um aumento da resposta contrátil a fenilefrina em ambos os grupos experimentais; no entanto, a magnitude do efeito em artérias aorta com L-NAME foi menor nos ratos tratados com chumbo. Estes resultados sugerem diminuição da biodisponibilidade de NO pelo chumbo, contribuindo com o aumento da reatividade a fenilefrina em anéis da aorta.

Diferentemente ao que encontramos em aorta, incubação das artérias mesentéricas com L-NAME levou a um aumento da resposta contrátil à FE de igual magnitude nos dois grupos estudados. Estes resultados são condizentes com os dados de reatividade em anéis de mesentéricas sem endotélio. Diante disto, sugere-se menor participação do NO nas alterações promovidas pelo chumbo em artérias mesentéricas. Este resultado pode ser explicado por trabalhos que demonstram que o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) parece ser o principal componente da vasodilatação dependente do endotélio nestas artérias, incluindo as artérias coronárias, hepáticas, cerebrais e renais (Parkington *et al.*, 1995; Brandes *et al.*, 2000; McNeish *et al.*, 2002).

Alterações na via do NO, têm sido descritas em outros estudos experimentais de exposição ao chumbo (Vaziri *et al.*, 1999; Fiorim *et al.*, 2011). Resultados similares aos nossos, foram encontrados em aorta de animais expostos ao chumbo com concentrações inferiores a do presente estudo, onde mostraram que o aumento da reatividade vascular é dependente do endotélio e deve-se a menor biodisponibilidade de NO (Silveira *et al.*, 2014). Estudo de Karimi *et al.* (2002) mostrou que o tratamento com acetato de chumbo 100 ppm por 28 dias reduz a biodisponibilidade de NO em aorta de ratos. Contudo, nosso grupo recentemente relatou que baixas concentrações de chumbo aumenta a biodisponibilidade de NO nos estágios iniciais de exposição ao chumbo (Fiorim *et al.* 2011).

A redução da biodisponibilidade de NO pode ser devida as alterações em sua síntese. Marques *et al.* (2001) comprovaram prejuízo na resposta vasodilatadora

dependente do endotélio em ratos tratados com acetato de chumbo (5 ppm na água de beber durante 30 dias) e revelaram, contudo, aumento na expressão proteica da eNOS na artéria aorta dos animais expostos ao chumbo. Este aumento da atividade da NOS poderia ser uma resposta compensatória à degradação de NO mediada por EROs (Vaziri *et al.*, 1997). Outro relato mostrou que a expressão proteica da eNOS e iNOS estava elevada em animais tratados com chumbo (Silveira *et al.*, 2014). No entanto, Fiorim *et al.* (2011), demonstraram que a exposição ao chumbo durante 7 dias, não alterou a expressão proteica da eNOS em aorta, embora tenha aumentado a fosforilação da eNOS na Ser1177.

No presente estudo, não foram realizadas medidas da atividade da NOS em aorta nem em mesentéricas, portanto não podemos descartar alterações destas isoformas como responsáveis por estes efeitos observados. Adicionalmente, a literatura não traz estudos que avaliam a expressão da NOS em artérias mesentéricas em outros modelos experimentais, assim, não se sabe como essas proteínas se expressam na exposição ao chumbo neste leito vascular.

Contudo, sabe-se que o NO está envolvido nos efeitos vasculares do chumbo, embora os resultados obtidos ainda sejam controversos. Estudos prévios demonstram que exposição crônica ao chumbo está relacionada com a diminuição na concentração urinária de NO (Vaziri *et al.*, 1997,1999, 2003; Ding *et al.*, 1998; Heydari *et al.*, 2006). Vaziri *et al.* (1999), estudaram os efeitos do chumbo em ratos que receberam 100 ppm de acetato de chumbo na água de beber durante 3 meses. Nessa pesquisa, a partir da 8ª semana de exposição ao metal, foi demonstrada diminuição significativa na excreção urinária dos metabólitos do NO (nitrito e nitrato) e aumento na concentração plasmática do malondialdeído (produto da peroxidação lipídica - indicador indireto da ação dos radicais livres). É relevante destacar que esses achados foram correlacionados positivamente com o aumento da PAS observado nos animais tratados com acetato de chumbo.

Os achados até aqui encontrados demonstram que além do óxido nítrico, outras vias podem estar envolvidas nos efeitos do chumbo no nosso modelo experimental. Diante disso, decidimos investigar com maiores detalhes a via dos radicais livres que poderiam elucidar e/ou ratificar os dados encontrados até o momento, uma vez que o NO pode ser drasticamente reduzido pela sua reação com espécies reativas de oxigênio.

#### **5.3.4 O papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos efeitos do chumbo sobre a reatividade vascular em artérias aortas e mesentéricas de ratos.**

Várias evidências mostram que o estresse oxidativo é um importante participante de desordens como hipercolesterolemia, hipertensão, arteriosclerose, diabetes, insuficiência cardíaca, alteração da estrutura e função vascular (Gao & Mann, 2009; Kim *et al.*, 2006; Vaziri *et al.*, 2004). Alguns autores relacionam o aumento da pressão arterial com o aumento do estresse oxidativo na exposição ao chumbo (Gonick *et al.*, 1997; Silveira *et al.*, 2014). O aumento da geração de radicais livres, principalmente aqueles derivados do oxigênio, leva a redução da biodisponibilidade de NO e esta é a principal causa de disfunção endotelial (Cai & Harrison, 2010). A inativação de óxido nítrico por EROs pode resultar em diminuição da vasodilatação, aumento da vasoconstrição, aumento da adesão de plaquetas/leucócitos, proliferação/migração de células musculares lisas vasculares e acúmulo de matriz levando ao remodelamento vascular (Touyz *et al.*, 2011; Drummond *et al.*, 2011).

O ânion superóxido é produzido por uma variedade de enzimas, incluindo xantina oxidase, ciclooxigenase e a NADPH oxidase. Esta última desempenha maior função nas células vasculares, sendo a principal fonte vascular de  $O_2^{\cdot-}$  (Harrison & Gongora, 2009; Griendling *et al.*, 2000; McIntyre *et al.*, 1999). Hamilton *et al.* (2002) estudaram inibidores da NADPH oxidase, e demonstraram que a apocinina foi o composto com maior potencial para reduzir a produção de  $O_2^{\cdot-}$ . Estes pesquisadores demonstraram que o tratamento com apocinina em artérias isoladas de ratos diminuiu a produção de radicais livres estimulados pela NADPH oxidase e aumentou a biodisponibilidade de NO, resultados semelhantes foram encontrados em artérias e veias de humanos. Entretanto, atualmente alguns autores têm relatado diferentes ações da apocinina que são independentes da sua capacidade de inibir a NADPH oxidase (Heumüller *et al.*, 2008; Riganti *et al.*, 2008), ou seja, reduz a disponibilidade de EROs através de suas propriedades antioxidantes (Heumüller *et al.*, 2008).

Deste modo, avaliamos o papel das EROs nos efeitos do chumbo sobre a reatividade vascular. Nossos resultados demonstram que o tratamento por 30 dias com acetato de chumbo aumentou a produção de ânion superóxido em aorta de ratos. Ademais, a apocinina, usada em uma concentração que inibe a NADPH oxidase, reduziu a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina apenas nas

aortas de ratos tratados com chumbo, sugerindo que a enzima NADPH oxidase estaria estimulada na presença do chumbo, produzindo assim mais ânion superóxido. Nas artérias mesentéricas a apocinina não alterou a reatividade vascular, o que sugere pouca participação da NADPH oxidase na produção de ânion superóxido neste leito vascular. Contudo, a SOD foi usada em artérias mesentéricas e reduziu a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de ratos tratados com chumbo. Pode-se especular, através deste resultado, que apesar da NADPH oxidase participar pouco da produção de espécies reativas de oxigênio em mesentéricas, outra via produtora de  $O_2^{\cdot-}$  parece está estimulada na exposição ao chumbo, mesmo que em menor magnitude.

Em acordo, Silveira *et al.* (2010) demonstraram a participação de radicais livres na reatividade vascular do leito caudal de ratos, perfundido com 100  $\mu$ M de acetato de chumbo. Em um estudo mais recente Silveira *et al.* (2014) demonstraram aumento nas EROs em modelo de tratamento crônico com chumbo em baixas doses (12  $\mu$ g/dL) na reatividade vascular de aorta e este aumento foi relacionado com o aumento da atividade da NADPH oxidase. Nossos achados também corroboram, mesmo que em parte, os dados encontrados por Vaziri *et al.* (2004) os quais demonstraram aumento na geração de  $O_2^{\cdot-}$  e também de  $H_2O_2$  em culturas de células endoteliais e musculares lisas de artérias coronárias de humanos, tratadas com acetato de chumbo durante um período que variou de 1 minuto até 60 horas de incubação.

Para confirmar a maior participação da NADPH oxidase no aumento da produção de EROs em artéria aorta, a expressão proteica da gp91phox, isoforma da NADPH oxidase, foi quantificada pela técnica de Western Blot. Esta se apresentou aumentada em artéria aorta de ratos tratados quando comparado aos animais controles, corroborando os resultados funcionais aqui apresentados. Outro possível mecanismo que justificaria as alterações vasculares seria a redução das defesas antioxidantes, pois iria contribuir para aumentar a produção de superóxido. No entanto, a expressão proteica de SOD-Mn e SOD-Cu/Zn aumentou em artérias tratadas com chumbo. Este mecanismo antioxidante pode estar ativado na exposição ao chumbo para proteger contra o aumento do estresse oxidativo observado.

Os resultados funcionais e bioquímicos do presente estudo, anteriormente discutidos, comprovam que a exposição a baixas doses de chumbo cursam com alterações na reatividade vascular. Este fenômeno foi associado à menor biodisponibilidade de NO e, maior produção e liberação de espécies reativas de oxigênio em artéria aorta, especialmente ânion superóxido, e destaca que os efeitos do chumbo sobre a reatividade vascular neste leito, foram dependentes do endotélio. Já nas mesentéricas, vimos que o endotélio pouco participa das alterações promovidas pelo chumbo, e que as EROs produzidas neste leito se deve a outra via de produção que não a NADPH oxidase.

Nosso próximo passo foi investigar a via dos prostanóides derivados da ciclooxigenase, pois o envolvimento dessa via também poderia explicar os efeitos do chumbo em aumentar a resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta e mesentérica dos animais do grupo chumbo.

### **5.3.5 O papel dos prostanóides derivados da ciclooxigenase (COX) no efeito do chumbo sobre a reatividade vascular em artérias aortas e mesentéricas de ratos.**

Em determinados modelos de hipertensão se tem observado um aumento na síntese de fatores endoteliais contráteis derivados de COX (Vanhoutte, 1995; Taddei *et al.*, 1997; Davidge, 2001), os quais poderiam ser responsáveis pelo prejuízo no relaxamento (Dohi *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999), assim como o incremento da vasoconstrição induzida por agonistas (Taddei & Vanhoutte, 1993). Alguns estudos sugerem o efeito do chumbo no metabolismo do ácido araquidônico e suas alterações vasculares (Karimi *et al.*, 2002; Courtois *et al.*, 2003; Grizzo *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2010).

Portanto, analisamos o envolvimento de prostanóides nas respostas vasoconstritoras induzidas por chumbo, e vimos uma redução significativa na resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina resultante do bloqueio da COX com indometacina em segmentos de aorta de ratos tratados com chumbo, sugerindo a participação desta via nas alterações vasculares observadas. O mesmo resultado foi observado nas artérias mesentéricas, sugerindo que neste leito vascular as

alterações de reatividade podem ser causadas principalmente pela ativação da via da ciclooxigenase e seus derivados.

Em acordo com nossos dados, Grizzo & Cordelline (2008) demonstraram que a incubação com indometacina em anéis expostos ao chumbo causou significativa diminuição na pD<sub>2</sub>, mas não alterou a resposta máxima. Karimi *et al.* (2002) também mostraram diminuição da reatividade vascular à FE em anéis incubados com indometacina em ambos grupos experimentais. Entretanto, este decréscimo foi maior no grupo tratado com chumbo. Estes autores sugerem a participação da via da ciclooxigenase em ratos expostos ao chumbo por 28 dias. Ademais, estudo prévio em nosso laboratório mostrou o envolvimento de prostanóides vasoconstrictores derivados da COX no leito arterial caudal de ratos perfundidos com chumbo (100 µM) (Silveira *et al.*, 2010). Outro trabalho realizado em nosso laboratório mostrou ativação de COX-2 na exposição ao chumbo, e esta ativação contribuiu com as alterações cardiovasculares (Silveira *et al.*, 2014).

A expressão vascular de COX-2 está normalmente associada com processos inflamatórios em muitas condições, tais como aterosclerose e hipertensão (Antman *et al.*, 2005; Álvarez Y *et al.*, 2005; Adeagbo *et al.*, 2005). Nossos resultados demonstram um aumento da expressão de COX-2 em artérias de ratos tratados com chumbo, corroborando os dados funcionais. Em acordo, Courtois *et al.* (2003) registraram aumento da expressão da COX-2 em anéis de aorta perfundidos com chumbo.

Então, até o momento demonstramos que os efeitos desse metal sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta envolvem aumento na produção de espécies reativas do oxigênio que por sua vez podem reagir com o NO diminuindo sua biodisponibilidade. Além disso, vimos que a ciclooxigenase está ativada na exposição ao chumbo. Em artérias mesentéricas, demonstramos que há pequena produção de EROs, porém esta produção parece não ser dependente da NADPH oxidase. O aumento de EROs pode ser justificado pela ativação da COX na exposição ao chumbo neste leito vascular, o que corrobora os achados de Martínez-Revelles *et al.* (2013), que mostram uma correlação entre COX-2 e EROs, onde uma estimula a produção e/ou atividade da outra. Outros estudos confirmam o papel das EROs em aumentar a expressão da COX-2 (Nakamura *et al.*, 2001; Martínez-Revelins *et al.*, 2013). Da Cunha *et al.* (2000), evidenciaram em leito arterial caudal a

participação dos prostanóides vasoconstritores na resposta contrátil à fenilefrina mediados pelo aumento de EROs.

Os resultados acima discutidos confirmam o envolvimento de mais uma importante via de controle do tônus vascular que justifica os efeitos deletérios do chumbo sobre as artérias aorta e mesentérica de ratos após 30 dias de exposição a esse metal.



#### 5.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ACETATO DE CHUMBO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS EXPLANTADAS DE AORTA DE RATOS.

Um dos mecanismos propostos para explicar os efeitos do chumbo sobre a gênese da hipertensão arterial justifica-se no fato de que esse metal promove alteração nas células endoteliais (Khalil-Manesh *et al.*, 1993; Gonick *et al.*, 1997) e nas células do músculo liso vascular (Webb *et al.*, 1981; Chai & Webb, 1988; Kopp *et al.*, 1988; Watts *et al.*, 1995).

Acima discutimos os dados de reatividade vascular de artérias aorta e mesentérica de ratos expostos à baixa concentração de chumbo. Observamos que há um aumento da reatividade vascular, causado por uma disfunção vascular por aumento da geração de EROs e prostanóides vasoconstrictores. Por isso, na tentativa de investigar os mecanismos subjacentes dos efeitos do chumbo sobre o estresse oxidativo e a expressão de COX-2 observados na reatividade vascular, utilizamos CMLVs explantadas de aorta de ratos cultivadas e expostas durante 48 horas a 20 µg/dL de chumbo.

Após 48h de exposição ao chumbo vimos que ocorreu aumento na geração de ânion superóxido, quando avaliamos as células musculares lisas vasculares em microscopia confocal, mensurado através do corante oxidativo DHE. O uso de antioxidantes, mito-TEMPO e tempol, reduziram a emissão de fluorescência, sugerindo redução da geração desta espécie reativa de oxigênio. Assim, podemos concluir que a exposição ao chumbo induz ao estresse oxidativo, que é reduzido por agentes antioxidantes em CMLVs.

Como evidenciamos aumento na produção de  $O_2^{\cdot-}$  e os dados funcionais em artéria aorta mostram disfunção vascular caracterizada principalmente pela redução da biodisponibilidade de NO e aumento da produção de EROs, mensuramos também, em células musculares lisas, a atividade da NADPH oxidase uma vez que esta têm sido descritas como a principal fonte de EROs no tecido vascular (Griendling *et al.*, 2000). Diante disso, vimos que o chumbo promove o aumento da atividade desta enzima e o uso do inibidor de NOX-1 ML171 ou do antioxidante tempol foram capazes de reduzir a atividade da NADPH oxidase a níveis semelhantes aos encontrados em células não expostas ao chumbo. Vaziri & Ding (2001) também

mostraram que a exposição ao chumbo em cultura de células endoteliais de coronárias humanas, aumenta a geração e/ou reduz a dismutação do superóxido, que por sua vez promove estresse oxidativo, aumenta a inativação de NO e provoca um aumento da expressão da eNOS cuja expressão é regulada negativamente pelo NO.

Além da atividade da NADPH oxidase, observamos um significativo aumento da expressão do RNAm das subunidades NOX1 e NOX4 desta enzima nas CMLVs. Condizentes com nosso trabalho, estudos demonstram que a exposição ao chumbo promove a geração de superóxido nos componentes celulares da parede vascular (Ni, 2004; Aguado *et al.*, 2013). Assim, o aumento da geração de EROs pelas células vasculares talvez seja um elo importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em populações expostas ao chumbo.

A redução das defesas antioxidantes pode também contribuir para o aumento do estresse oxidativo. Um grande sistema de defesa antioxidante contra  $O_2^{\cdot-}$  são as superóxido dismutases, que desempenham um papel importante na regulação da pressão arterial e da função endotelial por reduzir os níveis extracelulares de  $O_2^{\cdot-}$ , assim prevenindo a inativação oxidativa do NO liberado do endotélio (Oury *et al.*, 1994; Oury *et al.*, 1996, Stralin *et al.*, 1995). No entanto, a expressão proteica de SOD-Mn e SOD-EC esta aumentada em CMLVs expostas ao chumbo, sugerindo que mecanismos antioxidantes estão ativados em células musculares lisas provavelmente para proteger contra o estresse oxidativo que está aumentado na exposição ao metal. Estes resultados corroboram nossos dados de aorta, tanto os dados funcionais quanto os de biologia molecular.

Em acordo com nossos achados, Ni *et al.* (2004) demonstraram aumento de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio em células endoteliais e CMLVs de artérias coronárias humanas depois do 60 h de exposição a acetato de chumbo (1 ppm), sendo acompanhada por um aumento da expressão proteica da SOD-Cu/Zn. No mesmo estudo, os autores demonstraram um aumento significativo da gp91phox de NADPH oxidase nas células endoteliais expostas ao chumbo.

A COX-2, fonte das prostaglandinas que medeiam à inflamação, é rapidamente induzida em resposta a diferentes estímulos, incluindo fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (Feng *et al.*, 1995;. Martínez-Revelles *et al.*, 2013;. Wang *et al.*, 2013). Estudos anteriores demonstram a localização de

COX-2 em CMLVs de aorta de ratos (Bishop-Bailey *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2007). Esta presença de COX-2 na camada muscular das artérias contribui principalmente para a alteração do tônus vascular (Bishop-Bailey *et al.*, 1999), e o aumento da expressão vascular de COX-2 está geralmente associada à hipertensão (Álvarez *et al.*, 2005; 2007). Prostanóides derivados da COX-2 foram também implicados nos efeitos vasculares do chumbo (Silveira *et al.*, 2014) e de outros metais pesados, como mercúrio (Peçanha *et al.*, 2010).

Com o objetivo de avaliar a participação da COX-2 na ativação da NADPH oxidase e produção de ânion superóxido, no mesmo grupo de experimento, incubamos as células com inibidores de COX-2, celecoxib e rofecoxib. Os resultados mostraram redução da expressão dos níveis de RNAm de NOX1 e NOX4 e da atividade da NADPH oxidase sugerindo a participação dos prostanóides da COX-2 na ativação desta enzima. Nossos resultados corroboram o trabalho de Martínez-Revelles *et al.* (2013) que mostraram em aorta de ratos tratados com angiotensina II, a existência de relação recíproca entre as EROs e os produtos derivados da COX-2, sendo estes responsáveis pela disfunção vascular observada neste modelo de hipertensão.

De forma similar ao observado em artérias de ratos tratados com chumbo, a exposição das CMLVs ao chumbo aumentou os níveis da proteína e RNAm da COX-2. Entretanto, a COX-1 em CMLVs expostas se apresenta inalterada. Estes achados poderiam estar relacionados com o aumento da participação dos prostanóides que observamos nas respostas vasoconstritoras induzidas pelo tratamento com chumbo. Em continuação, usamos um varredor de ânion superóxido, o tempol, e vimos uma redução na expressão gênica da COX-2, sugerindo a ativação desta por EROs. Corroborando estes achados, alguns estudos na literatura mostram que o estresse oxidativo tem sido relacionado com o aumento da expressão de COX-2 (Feng *et al.*, 1995; Garcia-Cohen *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2007) e tratamentos com antioxidantes mostram redução desta expressão (Wong *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 1995; Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Segundo Garcia-Cohen e colaboradores (2000) e Álvarez e colaboradores (2007), o excesso de EROs é visto como um possível mecanismo para o aumento da atividade vasomotora da COX-2 no desenvolvimento da hipertensão.

Como alguns dos estímulos e das vias de sinalização intracelular que provocam a liberação de COX-2 e EROs são comuns em diversos casos, autores descrevem

uma relação recíproca entre ambos os mediadores (Martínez-Revelles *et al.*, 2013). Neste sentido, a própria atividade da COX-2 constitui uma fonte de ânion superóxido devido à sua capacidade de oxidar substâncias, como a NADPH oxidase (Félétoú *et al.*, 2011) e alguns prostanóides podem aumentar a produção de ânion superóxido em artérias de animais hipertensos (García-Redondo *et al.*, 2009). Essa interação recíproca entre as duas vias aumentaria os efeitos nocivos do chumbo ao nível vascular. Sancho *et al.* (2011) também mostraram uma regulação recíproca da NADPH oxidase e a via da COX-2 em células hepáticas sob condições inflamatórias. Outros estudos demonstraram recentemente que a administração crônica de chumbo induz a disfunção endotelial em aorta de rato, devido ao aumento da expressão de COX-2 e um aumento da produção de  $O_2^{\cdot-}$  derivada da NADPH oxidase (Silveira *et al.*, 2010, 2014).

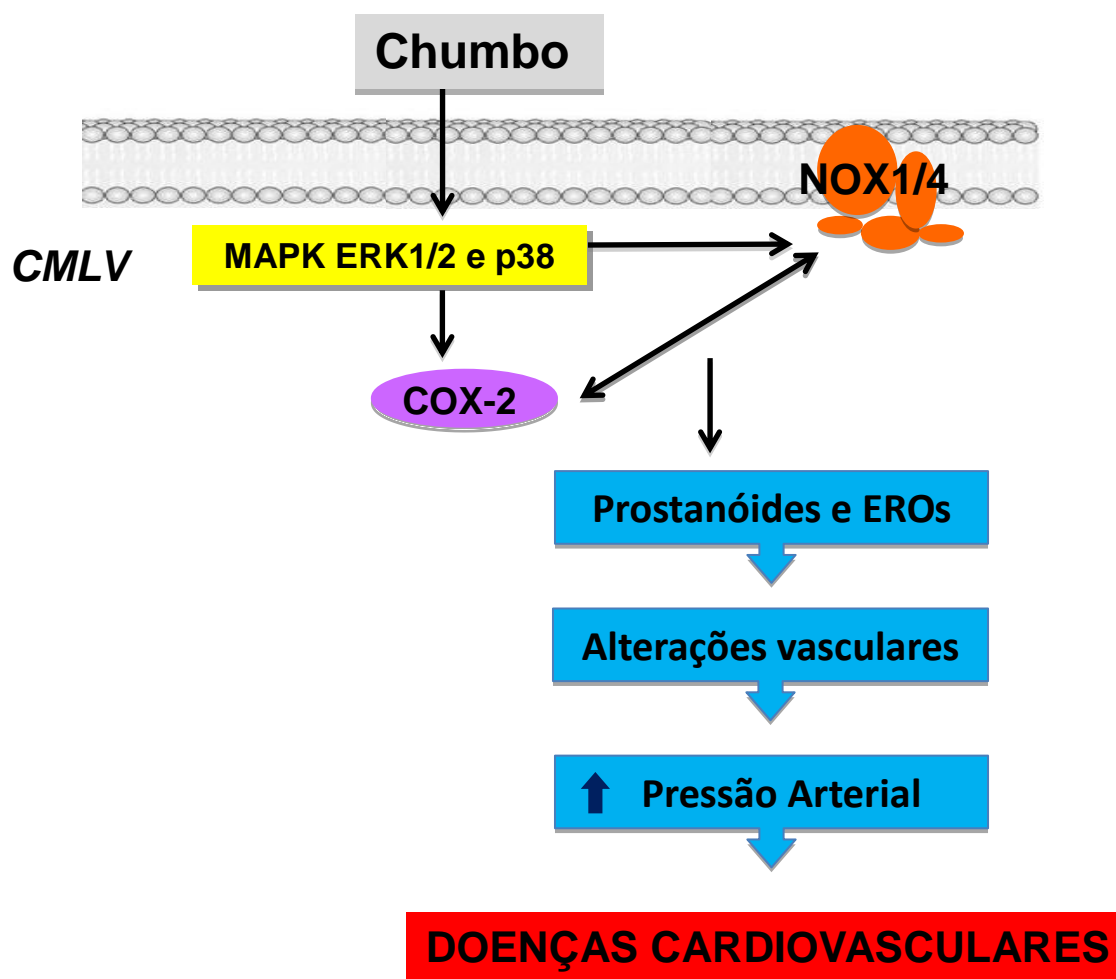
Ademais, estudos anteriores indicam que as vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) desempenha um papel importante na modulação da COX-2 (expressão e atividade) e produção de EROs (Ohnaka *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013). No entanto, o mecanismo molecular específico e a cascata de sinalização continuam a ser o foco de intensa pesquisa. Evidências mostram que cascatas das MAPKs são as principais vias de sinalização que regulam a proliferação celular, migração, diferenciação, inflamação e apoptose (Yang *et al.*, 2003). Além disso, Aguado *et al.* (2013) relataram que o mercúrio, um metal pesado, induz ativação das MAPKs em CMLVs. Diante disso, nós especulamos se as vias de sinalização das MAPKs poderiam estar envolvidas nas alterações induzidas por chumbo em CMLVs, o que poderia explicar nossos achados funcionais. Nossos dados mostram que o chumbo induz ativação precoce de ERK1/2 e uma ativação mais tardia da MAPK p38 sem efeitos sobre a JNK. Posser *et al.* (2007) mostraram o efeito tóxico de chumbo em células C6 de glioma e uma ativação significativa das MAPKs p38 e JNK. Além disso, vimos que o chumbo não estimula a fosforilação de Akt, o que corrobora os resultados publicados por Lu *et al.* (2001) em células de astrocitoma humano expostas ao chumbo.

Para investigar se as MAPKs p38 e ERK1/2 estavam envolvidos na ativação da COX-2 e da NADPH oxidase nos efeitos mediados pelo chumbo, inibidores específicos destas MAPKs foram usados para observar os efeitos sobre a expressão genica da COX-2, NOX1 e NOX4. O U0126 (inibidor de ERK1/2) e SB203580

(inibidor de p38) aboliram o aumento dos níveis de RNAm de COX-2, NOX1 e NOX4 em CMLVs expostas ao chumbo. Em conformidade com nossos estudos, Trouba & Germolec (2004) mostraram que a via das MAPKs desempenha um importante papel na modulação da expressão e atividade da COX-2, e a inibição das MAPKs ERK e p38 atenua o aumento a expressão de COX-2 induzido por outro metal, o arsênio, em queratinócitos humanos. Leonard *et al.* (2004) demonstraram também que a ativação das MAPKs por metais pesados pode modular os mecanismos que induzem o stress oxidativo. Nossos achados mostram pela primeira vez que a ativação de proteínas inflamatórias, tais como: NADPH oxidase e COX-2 em resposta à exposição ao chumbo é mediada por vias de sinalização que inclui as MAPKs p38 e ERK1/2 em células musculares lisas vasculares.

No entanto, quando analisamos os efeitos do chumbo sobre migração e proliferação em CMLVs, nenhuma diferença foi observada neste modelo de exposição. Alguns trabalhos mostram que o chumbo pode aumentar a proliferação de células de fígado de rato (Liu *et al.*, 1997), de CMLVs (Fujiwara *et al.*, 1995) e células do baço (Razani-Boroujerdi *et al.*, 1999). Estudos realizados por Lu *et al.* (2001) demonstraram que o chumbo induz proliferação de células de astrocitoma 1321N1 em humano, mediado por ativação das vias de transdução de sinal de MEK1/2 e ERK1/2 de forma dependente da PKC $\alpha$ . As discrepâncias com os nossos dados pode ser devido às diferenças nos protocolos relacionados com doses e/ou duração da exposição ao chumbo. Todavia, um tempo maior de exposição ou uma dose maior poderiam levar a diferenças de proliferação e migração em CMLVs, como observado em outros tipos celulares.

## 6 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS



**Figura 24:** Sumarização esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. A exposição ao chumbo, em baixas concentrações, ativa vias de sinalização das MAPKs (ERK1/2 e p38) que resultam na ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) e das subunidades da NADPH oxidase, NOX1 e NOX4, que atuam em conjunto para produzir as alterações vasculares que podem contribuir para a ocorrência de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares. EROs: espécies reativas de oxigênio, CMLV: células musculares lisas vasculares.

**CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

- O modelo experimental utilizado nesse estudo apresentou, ao término de 30 dias, baixas concentrações sanguíneas de chumbo, concentrações essas inferiores às consideradas limites pela ATSDR e permitidas pelo Ministério do Trabalho Brasileiro. Entretanto, esta baixa concentração de chumbo já foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica dos ratos tratados.
- Este tipo de tratamento induziu alteração na reatividade vascular em aorta e artérias mesentéricas de resistência, com aumento da resposta vasoconstritora e redução da resposta vasodilatadora. Estas alterações da função vascular parecem ser promovidas pela redução da biodisponibilidade do NO, pelo aumento da produção de  $O_2^{\cdot-}$  derivada da NADPH oxidase em aortas; e ainda sugere a participação dos prostanóides derivados da COX-2 em aorta e nas alterações vasculares observadas em mesentéricas de resistência.
- Este tratamento promoveu o aumento da produção de ânion superóxido, da expressão da isoforma da COX-2 e da gp91phox nas artérias e ainda dispara mecanismos compensatórios para contrabalancear o aumento da produção de EROs, como o aumento da expressão de enzimas antioxidantes como a SOD.
- A exposição de CMLVs ao chumbo promoveu aumento de EROs, sendo este possivelmente devido ao aumento da atividade da NADPH oxidase.
- O tratamento concomitante com antioxidantes, reduziu a produção de EROs e a atividade da NADPH oxidase, assim como os inibidores da COX-2 também reduziram sua atividade.
- De igual modo observado em aorta, a expressão proteica da SOD-Mn e SOD-EC estão aumentadas em CMLVs expostas ao chumbo, possivelmente na tentativa de conter o estresse oxidativo elevado. A expressão gênica e/ou proteica da COX-2, NOX1 e NOX4 também foram aumentadas nas CMLVs. O efeito de antioxidantes e inibidores da COX-2 sugere uma regulação recíproca entre ativação de NOX e COX-2.
- De forma inédita, baixas doses deste metal ativaram as MAPKs, e estas parecem estar envolvidas na modulação de COX-2 e na produção de EROs após a exposição ao chumbo. Entretanto, a migração e proliferação celular permaneceram inalteradas.



Assim, o presente estudo demonstrou pela primeira vez que o tratamento com baixas doses de chumbo, abaixo dos valores de referência para pessoas expostas, foi capaz de aumentar a pressão arterial, promover disfunção vascular e ativar as vias de sinalização das MAPKs. Estes efeitos estão associados com a ativação de proteínas inflamatórias como NADPH oxidase e a COX-2, que agem em conjunto para promover a disfunção vascular. Nossos achados suportam fortemente que a exposição ao chumbo deve ser considerada como um fator de risco ambiental para doenças cardiovasculares.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for lead*. US Department of Health and human services, Public Health Service, Atlanta, 1993.

[DNPM] Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2001. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/sm2001.html>>. Acesso em 14/mai/2010.

\_\_\_\_\_. Departamento Nacional de Produção Mineral, *Sumário Mineral*; 2007. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/sm2010.html>>. Acesso em: 14/ mai/ 2010.

[IUPAC] Commission on Atomic Weights and isotopic Abundances report for the International Union of Pure and Applied Chemistry in Atomic Weights of the Elements. 2001. *Pure and Applied Chemistry* 2003. 75: 1107-1122.

Adeagbo AS, et al. Cyclo-oxygenase-2 endothelium and aortic reactivity during de oxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *Journal of Hypertension* 2005; 23: 1025-1036.

Aguado A, Galan M, Zhenyukh O, Wiggers GA, Roque FR, Redondo S, Pecanha F, Martin A, Fortuno A, Cachofeiro V, Tejerina T, Salaices M, Briones AM. Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268: 188-200.

Ahamed M, Fareed M, Kumar A, Siddiqui WA, Siddiqui MK. Oxidative stress and neurological disorders in relation to blood lead levels in children. *Redox Rep* 2008; 13(3): 117-22.

Alvaréz Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaceis M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *Journal of Hypertension* 2005; 23(4):767-777.

Álvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernánz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltran A, Alonso MJ, Salaices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 381-388.

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 521-531.

Angeli, Jhuli Keli. Exposição aguda ao cádmio induz lesão endotelial em aorta de ratos: papel do estresse oxidativo, da angiotensina II e dos prostanóides da via da ciclooxigenase. 2013. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Ciclooxigenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 2005; 112: 759-770.

Bakris GL, Mensah GA. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiological Clinical* 2002; 20: 195-206.

Barbosa FJr, Sertorio JT, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Clinical evidence for lead-induced inhibition of nitric oxide formation. *Arch Toxicol* 2006; 80(12): 811-816.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245–313.

Bene A, Obineche E, Gillet M, Pasha MAH, Bishawi B. Association between blood levels of lead, blood pressure, and risk of diabetes and heart disease in workers. *International Archives of Occupational and Environmental health* 2001; 74: 375-378.

Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* 1998; 8:1049–1057.

Bing OH. *et al.* The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1995; 27: 383-396.

Bishop-Bailey D, Hla T, Mitchell JA. Cyclo-oxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Int J Mol Med* 1999; 3(1):41-8.

Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog* 2007; 46:591–598.

Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1804:463–475.

Bos CL, Richel DJ, Ritsema, T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *International Journal of Biochemistry*. 2004; 36: 1187-1205.

Boulton TG, et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1990; 249: 64–67.

Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Félétou M, Godecke A, Hunag PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proceedings of National Academy Science USA* 2000; 97: 9747-52.

Brasil. Ministério do Trabalho. *Norma Regulamentadora nº 7*. In: Pimenta, A.L. & Capistrano, F. D., org. Saúde do trabalhador. Hucitec: São Paulo; 1988.

Brasil. Lei nº 11.762, de 1º de agosto de 2008. Fixa o limite máximo de chumbo permitido na fabricação de tintas imobiliárias e de uso infantil e escolar, vernizes e materiais similares e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2008.

Brasil. Departamento Nacional de Produção Mineral, Sumário Mineral. 2013. Disponível: <<http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSeção=68&IDPagina=316>>.

Brasil. Ministério da Saúde. *Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao chumbo metálico*. Saúde do trabalhador. Protocolos de complexidade diferenciada. Normas e manuais técnicos. Brasília. Editora do Ministério da Saúde; 2006.

Bravo Y, Quiroz Y, Ferrebuz A, Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil administration reduces renal inflammation, oxidative stress, and arterial pressure in rats with lead-induced hypertension. *American Journal Renal Physiology* 2007; 293: 616-623.

Burkhard K1, Smith S, Deshmukh R, MacKerell AD Jr, Shapiro P. Development of extracellular signal-regulated kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2009; 9(8):678-89.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840–844.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovas Res* 2005; 68: 26-36.

Cannon III RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry* 1998; 44(8): 1809-1819.

Carmignani M, Boscolo P, Poma A, Volpe AR. Kininergic system and arterial HTN following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacology* 1999; 44: 105 - 110.

Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, Grilli A, et al. Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci* 2000; 68: 401-415.

Chai S, Webb RC. Effects of lead on vascular reactivity. *Environmental Health Perspectives* 1988; 78: 85 - 89.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40.

Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology*. 2008; 49: 134-140.

Chen JJ, Huang WC, Chen CC. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in response to proteasome inhibitors involves reactive oxygen species-mediated signaling pathway and recruitment of CCAAT/enhancer-binding protein delta and CREB-binding protein. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5579-5591.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 915– 927.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. MAP kinases. *Chem Rev* 2001; 101: 2449-2476.

Cheng Y, Schwartz J, Vokonas PS, Weiss ST, Aro A, Hu H. Electrocardiographic conduction disturbances in association with low-level lead exposure (The Normative Aging Study). *Am J Cardiol* 1998; 82(1): 594–599.

Chomczynski P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159.

Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, DeFranco DB. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* 2004; 271: 2060-2066.

Conterato GMM. *Efeitos do chumbo sobre a atividade da Tiorredoxina Redutase Citosólica (TrxR1) e parâmetros de estresse oxidativo em rins de ratos*. 2007. 70 f. [Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)] – Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

Cordeiro R, Lima Filho EC, Salgado PET. Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue I: Neuropatia periférica. *Revista de Saúde Pública* 1996; 30: 248-55.

Cordova FM, Rodrigues AL, Giacomelli MB, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* 2004; 998: 65-72.

Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1773: 1376–1387.

Courtois E, Marques M, Barrientos A, Casado S, Lopes-Farré A. Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003; 14: 1464-1470.

Cowan CL, COHEN RA. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *American Journal of Physiology* 1991; 261(3): 830-835.

da Cunha V, Souza HP, Rossoni LV, França AS, Vassallo DV. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 2000; 39(1): 124-130.

Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circulation Research* 2001; 89: 650-660.

De Batista, Priscila Rossi. Aumento da expressão do receptor tipo Toll 4 pela angiotensina II contribui para a hipertensão arterial e disfunção vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio. 2014. 220 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

de Capitani EM, Paoliello MMB, Costa de Almeida GR. Fontes de exposição humana de chumbo no Brasil. *Medicina* 2009; 42: 301-308.

Deussen A, BRAND M, PEXA A, WEICHSEL J. Metabolic coronary flow regulation-current concepts Basic research in cardiology. 2006; 101(6): 453-464.

Dias, Fernanda Moura Vargas. Avaliação da participação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> - ATPase e dos canais para K<sup>+</sup> na reatividade de anéis isolados de aorta de ratos após infarto agudo do miocárdio. 2011. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

Dietrich KN, Ris MD, Succop PA, Berger OG, Bornschein RL. Early exposure to lead and juvenile delinquency. *Neurotoxicol Teratol.* 2001; 23 (6): 511- 518.

Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griending KK. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* 2005; 112(17): 2668-76.

Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND. Lead Promotes Hydroxyl Radical Generation and Lipid Peroxidation in Cultured Aortic Endothelial Cells. *American Journal of Hypertension* 2000; 13: 552–555.

Ding Y, Vaziri ND, Gonick HC. Lead-induced HTN. II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ Res* 1998; 76: 107–113.

Dinh QN, et al. Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. *BioMed Research International* 2014; 406960.

Dohi Y, Kojima M, Sato K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 28:732-37.



Droge W. Free radicals in the physiology control of cell function. *Physiology Review* 2002; 82: 47- 95.

Drummond GR, Selemidis S, Griending KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(6):453-71.

Ehrlich R, Robins T, Jordaan E, Miller S, Mbuli S, Selby P, Wynchank S, Cantrell A, De Broe M, D' Haese P, Todd A, Landrigan P. Lead absorption and renal dysfunction in South African battery factory. *Occupational and Environmental Medicine*.1998; 55: 453-460.

Español Cano, S. Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Apresentado na jornada internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal en Iberoamérica, 2001.

Farmand F, Ehdaie A, Roberts CK, Sindhu RK. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ Res* 2005; 98: 33-39.

Féléto M, Calcium- activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology* 2009; 159:545-562.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium- Derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arteriosclerosis, Thromosis and Vascular Biology* 2006; 26: 1215-1225.

Féléto M, HUANG Y, VANHOUTTE PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 e COX-2 products. *British Journal of Pharmacology* 2011;164: 894-912.

Féléto M, HUANG Y, VANHOUTTE PM. Vasoconstrictor prostanóides. *Pflugers Archiv* 2010; 459(6): 941-950.

Féléto M, VANHOUTTE PM. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacological research* 2004; 49(6): 565-580.

Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995; 95: 1669-1675.

Ferrell JE Jr. MAP kinases in mitogenesis and development. *Curr Top Dev Biol* 1995; 33: 1-60.

Fioresi M, Furieri LB, Simões MR, Ribeiro RF Jr, Meira EF, Fernandes AA, Stefanon I, Vassallo DV. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46(2):178-85.

Fioresi M, Simoes MR, Furieri LB, Broseghini-Filho GB, Vescovi MV, Stefanon I, Vassallo DV. Chronic lead exposure increases blood pressure and myocardial contractility in rats. *PLoS One* 2014; 9(5): e96900.

Fiorim J, Ribeiro Junior RF, Silveira EA, Padilha AS, Vescovi MV, de Jesus HC, Stefanon I, Salaiques M, Vassallo DV. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. *PLoS One* 2011; 6(2): e17117.

Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological Review* 1982; 62: 347 - 504.

Forstermann U, Closs EL, Pollock JS, Nakane M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-1131.

Freis ED. Age, race, and sex and other indices of risk in hypertension. *American Journal of Medicine* 1973; 55: 275-280.

Frisbee JC, MAIER KG, STEPP DW. Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. *American journal of physiology* 2002; 283(6): 2160-2168.

Fujiwara Y, Watanabe S, Sakamoto M, Kaji T. Repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells after simultaneous exposure to lead and zinc. *Toxicol Lett* 1998; 94: 181–188.

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: 105-110.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*.1980; 288: 373-6.

Furchgott RF. The role of the endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. *Annual reviews Pharmacology and Toxicology* 1984; 24: 175 - 197.

Gao L, Mann GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double edged sword in redox signaling. *Cardiovascular Research* 2009; 82: 9 - 20.

Garcia-Cohen EC, Marin J, Diez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodriguez-Martinez MA. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 75-81.

GarcíaPascual A, Labadía A, Jimenez E, Costa G. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K<sup>+</sup> conductance. *British journal of pharmacology*. 1995; 115(7): 1221-1230.

García-Redondo AB, *et al.* Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, and superoxide anion levels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2009; 328: 19-27.

Garland JG, Mcpherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *British journal of pharmacology* 1992; 105(2): 429-435.

Gaut JP, Byun J, Tran HD, Lauber WM, Carrol JA, Hotchkiss RS, Belaaouaj A, Heinecke JW. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Invest* 2002; 109: 1311-1319.

Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 289-299.

Gil-Longo J, Gonzalez-Vazquez C. Characterization of four different effects elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat aorta. *Vasc Pharmacol* 2005; 43:128–138.

Glenn SB, Stewart WF, Links JM, Told AC, Schwartz BS. The longitudinal association of lead with blood pressure. *Epidemiology* 2003; 14 (1): 30-36.

Goldstein GW. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology* 1993; 14: 97-101.

Gonick HC, Ding Y, Bondy SC, Ni Z, Vaziri ND. Lead-induced hypertension: interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension* 1997; 30: 1487-1492.

Gonick HC. Nephrotoxicity of cadmium & lead. *The Indian Journal Medicine Research* 2008; 128: 335-352.

Goyer RA. Toxic effects of metals – Lead, p. 639-646. In Mary O. Amdur, J.D.; Curtis D.K. *Casareh and Doull's toxicology – the basic science of poisons*. Editora Pergamon Press, USA, 1991.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912-1916.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494-501.

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

Hailing L, Guizzetti M, Costa LG. Inorganic lead activates the mitogen-activated protein kinase kinase-mitogen-activated protein kinase-p90(RSK) signaling pathway in human astrocytoma cells via a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(3): 818-23.

Hamilton CA, Brosnam MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*. 2002; 40: 755-762.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyr M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37 [part 2]: 529-534.

Hanninen H, Aitio A, Kovala T, Luukkonen R, Matikainen E, Mannelin T. Occupational exposure to lead and neuropsychological dysfunction. *Occupational and Environmental Medicine* 1998; 55: 202-209.

Harlan WR. The Relationship of Blood Lead Levels to Blood Pressure in the U.S. Population. *Environmental Health Perspectives* 1988; 78: 9-13.

Harrap SB. Hypertension: genes versus environmental. *Lancet*.1994; 334 (8916): 169-171.

Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *The Medical Clinics and North America* 2009; 93: 621-635.

Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now: *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 774-797.

Heller R, Polack T, Gräbner R, Till U. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis*. 1999;144(1):49-57.

Hernanz R, Briones AM, Salices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2014; 126(2): 111-21.

Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Buss R, Schröder K, Brandes RP. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 2008; 51: 211–217.

Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 1991; 266(34): 22789-91.

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

Hillebrands JL1, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107(11): 1411-22.

Jacob LCB, Alvarenga KF, Morata TC. Os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo sobre o sistema auditivo: uma revisão da literatura. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2002; 68: 564-569.

Jaffe EA. Physiologic functions of normal endothelial cells. *Annals of New York Academy of Science* 1985; 454: 279-291.

Kaito S, *et al.* Effects of pressure- or volume-overload hypertrophy on passive stiffness in isolated adult cardiac muscle cells. *The American Journal of Physiology* 1996; 271: Pt 2, p. H2572–H2583.

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001; 294: 1030-1038.

Karimi G, Khoshbaten A, Abdollahi M, Sharifzadeh M, Namiranian K, Dehpour AR. Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacol Res* 2002; 46: 31-37.

Kasperczyk A, Kasperczyk S, Horak S, Ostałowska A, Grucka-Mamczar E, Romuk E, Olejek A, Birkner E. Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228: 378-384

Kasperczyk S, Kasperczyk J, Ostałowska A, Zalejska-Fiolka J, Wielkoszyński T, Swietochowska E, Birkner E. The role of the antioxidant enzymes in erythrocytes in the development of arterial hypertension among humans exposed to lead. *Biol Trace Elem Res* 2009; 130: 95-106.

Kerr S, Brosnan J, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: Role of endothelium. *Hypertension* 1999; 33: 1353-1358.

Khalil-Manesh F, Gonixk HC, Weiler EW, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead induced hypertension: possible role of endothelial factors. *American Journal of Hypertension* 1993; 6: 723 - 729.

Khan DA, Qayyum S, Saleem S, Khan FA. Lead-induced oxidative stress adversely affects health of the occupational workers. *Toxicol Ind Health* 2008; 24: 611-618.

Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006; 113(15): 1888-904.

Kim KA, Lim YS, Kim KM, Yoon JH, Lee HS. 15d-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 modulates collagen type I synthesis in human hepatic stellate cells by inducing oxidative stress. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73: 361-367.

Koh KK, Oh PC, Wuon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovascular Research* 2009; 81: 649-659.

Kopp JS, Barron JT, Tow JP. Cardiovascular Actions of Lead and Relationship to Hypertension: A Review. *Environmental Health Perspectives* 1988; 78: 91 - 99.

Kosnett MJ, Wedeen RP, Rothenberg SJ, Hipkins KL, Materna BL, Schwartz BS, Hu H, Woolf A. Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ. Health Perspect* 2007; 115: 463-471.

Kreusch MA. Avaliação com propostas de melhoria do processo industrial de reciclagem do chumbo e indicação de aplicabilidade para a escória gerada. [Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)] – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Matérias e Processos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807–869.

Landrigan PJ. The world wide problem of lead in petrol. *Bulletin of World Health Organization*. 2002; 1p.

Lasa M, Mahtani KR, Finch A, Brewer G, Saklatvala J, Clark AR. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinases p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4265-4274.

Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol* 2003; 285: R277-R297.

Lassègue B, San Martín A, Grindling KK. Biochemistry, physiology and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation Research* 2012; 110: 1364-1390.

Lawton LJ, Donaldson WE. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biological Trace Element Research* 1991; 28: 83-97.

Leal RB, Cordova FM, Herd L, Bobrovskaya L, Dunkley PR. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 178: 44-51.

Lee C-H, Wei Y-H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* 2007; 232: 592-606.

Lenormand P, et al. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 1079–1088.

Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1921-1942.

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74:49-139

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of applied physiology* 2001; 91(3): 1421-1430.

Liu H, Montaser A, Dolan SP, Schwartz RS. Inter-laboratory note. Evaluation of a low sample consumption, high-efficiency nebulizer for elemental analysis of biological samples using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 1996; 11: 307-311.

Liu JY, Lin JK, Liu CC, Chen WK, Liu CP, Wang CJ, Yen CC, Hsieh YS. Augmentation of protein kinase C activity and liver cell proliferation in lead nitrate-treated rats. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43: 355-364.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ . *Method Methods* 2001; 25: 402-408.

Lu H, Guizzetti M, Costa LG. Inorganic lead stimulates DNA synthesis in human astrocytoma cells: role of protein kinase C $\alpha$ . *J Neurochem* 2001; 78: 590-599.

Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang Z. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992; 19:117-130.

Lustberg M, Silbergeld E. Blood lead levels and mortality. *Archives Internal Medicine*. 2002; 162: 2443-2449.

Maheswaran R, Gill JS, Beevers DG. Blood pressure and industrial lead exposure. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 645-653.

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: 1341-1346.

Mamtani R, Stern P, Dawood I, Cheema S. Metals and disease: a global primary health care perspective. *J Toxicol* 2011; 2011: 319136.



Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *Journal of autonomic pharmacology* 1995; 15(4): 279-307.

Marques M, Millás I, Jiménez A, García-Colis E, Rodrigues-Feo J.A, Velasco S, Barrientos A, Casado S, López-Farré A. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 2001; 12: 2594-2600.

Martín A, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *Journal of Hypertension* 2012; 30: 315-326.

Martínez-Revelles S, Avendano MS, García-Redondo AB, Álvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18: 51-65.

Massó EL, Corredor L, Antonio MT. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/ or cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2007; 21: 210-216.

Matos RQ, Ferreira OM. Recuperação de chumbo de baterias automotivas, análise de risco dos resíduos resultantes. Universidade católica de goiás – departamento de engenharia – engenharia ambiental. 2007.

Mayr B., Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Cell Biol* 2001; 2: 599-609.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension* 1999; 34: 539-545.

McNeish AJ, Wilson WS, Martin W. Ascorbate blocks endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated vasodilation in the bovine ciliary vascular bed and rat mesentery. *British Journal of Pharmacology* 2002; 135: 1801-1809.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 2010; 450(6): 807-16.

Mielke K, Herdegen T. JNK and p38 stresskinases-degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Pro Neurobiol* 2000; 61: 45-60.

- Moller L, Kristensen TS. Blood lead as a cardiovascular risk factor. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1091-1100.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends in pharmacological sciences* 1997; 18(7): 252-256.
- Moncada M, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991; 43: 109-142.
- Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research* 1977; 11: 323-44.
- Moncada S. Nitric oxide. *Journal of hypertension*. 1994; 12(10): 35-39.
- Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20(1): 164-82.
- Moraes GA. Normas Regulamentadoras Comentadas. 11 edição. Revisada, ampliada, ilustrada e atualizada. Rio de Janeiro. 2014; 2: 3,1045.
- Moreira FR, Moreira JC. Effects of lead exposure on the human body and health implications. *Revista Panamericana del Salud Publica* 2004; 15: 119-129.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 2: 274-278.
- Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiological Reviews* 1990; 70(4): 921-961.
- Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research* 1977; 41 (1): 19-26.
- Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarization contributes to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in femoral veins of rats. *American journal of physiology* 1991; 261(4): 1034-1037.

Nakamura T, Sakamoto K. Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284 (1): 203 - 210.

Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure in cardiovascular disease –A systematic review. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115: 472-482

Needleman HL, Riess JA, Tobin MJ, Biesecker GE, Greenhouse JB. Bone lead levels and delinquent behavior. *JAMA* 1996; 275: 363-369.

Nelson MT, QUAYLE JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American journal of physiology* 1995; 268: 799-822.

Ni Z, Hou S, Barton CH, Vaziri ND. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2004; 66: 2329-2336.

Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2000; 35: 68-75.

Osol G, Cipolla M, Knutson S. A new method for mechanically denuding the endothelium of small (50-150 microns) arteries with a human hair. *Blood Vessels* 1989; 26(5): 320-4.

Oury TD, Chang LY, Marklund SL, Day BJ, Crapo JD. Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab Invest* 1994; 70: 889-898.

Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 957-965.

Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195(2):539-44.

Paoliello MMB, Chasin AAM. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. *Cadernos de Referência Ambiental* 2001; v.3. Salvador: CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS-CREA.

Paoliello MMB, Capitana EM. *Chumbo*. São Paulo; 2003. 353p. (Azevedo FA, Chasin AM, editores. *Metais: Gerenciamento da Toxicidade*).

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. *Diabetes Care* 2008; 31(2).

Parkington HC, Tonta MA, Coleman HA, Tare M. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *Journal of Physiology* 1995; 484(2):469-80.

Parmeggiani L. *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety*, 3<sup>a</sup> ed. Geneva: *International Labour Office* 1983; 2: 1200-1209.

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

Pearson G, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrinol Rev* 2001; 22:153–183.

Peçanha FM, Wiggers GA, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, García-Redondo AB, Vassallo DV, Alonso MJ, Salices M. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 29-36.

Peterson GL. SIMPLIFICATION OF PROTEIN ASSAY METHOD OF LOWRY ET AL WHICH IS MORE GENERALLY APPLICABLE. *Analytical Biochemistry* 1977; 83(2): 346-356.

Pirkle JL, Kaufmann RB, Brody DJ, Hickman T, Gunter EW, Paschal DC. Exposure of the US population to lead, 1991–94. *Environmental Health Perspective* 1998; 106: 745–750.

Posser T, de Aguiar CB, Garcez RC, Rossi FM, Oliveira CS, Trentin AG, Neto VM, Leal RB. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch Toxicol* 2007; 81: 407-414.

Prozialeck WC, Edwards JR, Nebert DW, Woods JM, Barchowsky A, Atchison WD. The Vascular System as a Target of Metal Toxicity. *Toxicological Sciences* 2008; 102(2): 207 - 218.

Rabelo LA, Cortes SF, Alvarez-Leite JI, Lemos VS. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *British Journal of Pharmacology* 2003; 138: 1215-20.

Raingeaud J, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270:7420–7426.

Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007; 26:3100–3112.

Ramesh G. T., Manna S. K., Aggarwal B. B., Jadhav A. L. Lead activates nuclear transcription factor-kappa $\beta$ , activator protein-1, and amino-terminal c-Jun kinase in pheochromocytoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 155: 280-286.

Ramos KS. Vascular toxicology: a cellular and molecular perspective. In: *Cardiovascular Toxicology*. v. 2, p. 483- 516, Acosta, D., Jr. (ed.) Raven Press, New York (1992).

Razani-Boroujerdi S, Edwards B, Sopori ML. Lead stimulates lymphocyte proliferation through enhanced T cell-B cell interaction. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 714-719.

Riganti C, Costamagna C, Doublier S, Miraglia E, Polimeni M, Bosia A, Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228: 277–285.

Rodríguez-Iturbe, B., Vaziri, N. D., Herrera-Acosta, J., Johnson, R. J., 2004. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 286, F606-F616.

Roncal C, Mu W, Reungjui S, Kim KM, Henderson GN, Ouyang X, Nakagawa T, Johnson RJ. Lead, at Low Levels, Accelerates Arteriopathy and Tubulointerstitial Injury in Chronic Kidney Disease. *American Journal Physiology Renal Physiology* 2007; 293: 1391-1396.

Ross R. Growth regulatory mechanisms and formation of the lesions of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748:1-4.

Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative

potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 2001;104(15): 1767-72.

Sancho P, Martin-Sanz P, Fabregat I. Reciprocal regulation of NADPH oxidases and the cyclooxygenase-2 pathway. *Free Radic Biol Med* 2011;51: 1789-1798.

Sanín LH, González-Cossío T, Romieu I, Hernández-Avila M. Accumulation of lead in bone and its effects on health. *Salud Publica Mex* 1998; 40: 359-368.

Saryan LA, Zenz C. Lead and its compounds. In: Zenz, C; Dickerson, OB; Horvath, EP. *Occupational Medicine*. Ed. Mosby-Year Book, EUA. 1994, p. 506 - 541.

Schieven GL. The p38 alpha kinase plays a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem* 2009; 9: 1038-1048.

Schwartz J. Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men and women. *Environ Health Perspect* 1991; 91: 71–75.

Scotland RS, Ahluwalia A, Hobbs AJ. C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease. *Pharmacol Ther* 2005; 105: 85-93.

Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N, Larijani B, Khoshbaten A. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. *Toxicology Letters* 2004; 153: 233-238.

Shelkovnikov SA, Gonick HC. Influence of lead on rat thoracic aorta contraction and relaxation. *American Journal of Hypertension* 2001; 14: 873 - 878.

Silveira EA, Lizardo JHF, Souza LP, Stefanon I, Vassallo DV. Acute lead-induced vasoconstriction in vascular beds of isolated perfused rat tails in endothelium dependent. *Brazilian Journal Medical Biological Research* 2010; 43(5):492-499.

Silveira EA, Siman FD, de Oliveira FT, Vescovi MV, Furieri LB, Lizardo JH, Stefanon I, Padilha AS, Vassallo DV.. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radic Biol Med* 2014; 67: 366-376.

Simões MR, Ribeiro Junior RF, Vescovi MV, de Jesus HC, Padilha AS, Stefanon I, Vassallo DV, Salaires M, Fioresi M.. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the renin-angiotensin system. *PLoS One* 2011; 6(4): e18730.

Sindhu RK, Ehdaie A, Farman F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Varizi ND. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1743: 86-92.

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: 275 - 289.

Souza AM, Tavares CFF. Chumbo e anemia. *Medicina*. 2009; 42(3): 327-30.

Stichtenoth DO, Marhauer V, Tsikas D, Gutzki FM, Frölich JC. Effects of specific COX-2-inhibition on renin release and renal and systemic prostanoid synthesis in healthy volunteers. *Kidney Int* 2005; 68: 2197-2207.

Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiothaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 139-155.

Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 2032-2036.

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(17): 7773-7.

Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 25: 1083-1089.

Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14: 311-317.

Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. *Exp Biol Med* 2007; 232: 27-37.

Szocs K, Lassègue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 21-27.

Taddei, S. et al. A cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension* 1997; 29, n. 1 Pt 2, 274-279.

Taddei S, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A<sub>2</sub>. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8: S328-31.

Tang EH, Leung FP, Huang Y, Félétou M, So KF, Man RY, Vanhoutte PM. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 15- 23.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42: 1075-1081.

Tibbles LA, Woodgett JR.. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1230-1254.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology* 2004; 122: 339-352.

Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC.. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv* 2011; 11: 27-35.

Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ella SMN, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*.2003; 39(6): 249-267.

Trouba KJ, Germolec DR. Micromolar concentrations of sodium arsenite induce cyclooxygenase-2 expression and stimulate p42/44 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Sci* 2004; 79, 248-257.

Tsalev DL, Zaprianov ZK. *Lead*, 1985 p. 137-150. In: Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice. CRC Press, Florida.

Tschudi MR, Mesaros S, Luscher TF and Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 1996; 27: 32-35.



Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *The Journal of clinical investigation* 1997; 100(11): 2793-2799.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1-40.

Van Der Meer AD, et al. A microfluidic wound-healing assay for quantifying endothelial cell migration. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 2010; 298: H719-H725.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120.

Vane JR, Anggsrd EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England Journal of Medicine* 1990; 323: 27-36.

Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res* 1995; 18: 87-98.

Vanhoutte PM, Félétou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 449-58.

Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9220-9225.

Vassallo DV, Lebarch EC, Moreira CM, Wiggers GA, Stefanon I. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 789-795.

Vassallo DV, Moreira CM, Oliveira EM, Bertollo DM, Veloso TC. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. *Toxicological and Applied Pharmacological*. 1999; 156(2): 113-118.

Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. Compensatory Up-regulation of nitric oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; Reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; 298: 679-685.

Vaziri ND, Gonick HC. Cardiovascular effects of lead exposure. *The Indian Journal Medical Research* 2008; 128: 426-435.

Vaziri ND, Ding Y, Ni Z, Gonick HC. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effect of lazaroid therapy. *Kidney Int* 1997; 52: 1042-1046.

Vaziri ND, Liang K, Ding Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int* 1999; 56: 1492-1498.

Vaziri ND.. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13: 93-99.

Vaziri ND, Sica DA. Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *Curr Hypertens Rep* 2004; 6 (4): 314 - 320.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. DBH VI. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2010; 17(1):4.

Wang H, Xi S, Xu Y, Wang F, Zheng Y, Li B, Li X, Zheng Q, Sun G. Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction. *Toxicol. In Vitro* 2013; 27: 1043-1048.

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

Webb RC, Winkquist RJ, Victory W, Vander AJ. In vivo and in vitro effects of lead on vascular reactivity in rats. *American Journal of Physiology* 1981; 241(2):H211-6.

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

Weinhold B. Environmental cardiology: getting to the heart of the matter. *Environ Health Perspect* 2004; 112: A880-A887.

West AE, Griffith EC, Greenberg ME. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 921-931.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogenactivated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79:143–180.

Wiggers GA, Pecanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaices M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: H1033-H1043.

Wiggers, Giulia Alessandra. Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos. 2008. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

Wong SL, Wong WT, Tian XY, Lau CW, Huang Y. Prostaglandins in action indispensable roles of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contractions. *Adv Pharmacol* 2010; 60: 61-83.

Woolfson RG, Poston L. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxation of human subcutaneous resistance arteries. *Clinical Science* 1990; 79(3): 273-278.

World Health Organization (WHO). IPCS. Environmental Health criteria-165-Inorganic Lead. Geneva, 1995. 300p. Publish under the joint sponsorship the United Nations. Environmental Program, the International Labour Organization, and the world health organization.

Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vázquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R1343-R1360.

Wu R, Millette E, Wu L, De Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; 19: 741-748.

Wu R, Laplante MA, De Champlain J. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* 2005; 45: 1139-1144.

Wu R, Duchemin S, Laplante MA, De Champlain J, Girouard H. Cyclooxygenase-2 knockout genotype in mice is associated with blunted angiotensin II-induced oxidative stress and hypertension. *Am J Hypertens* 2011; 24:1239-1244.

Xie Y, Chiba M, Shinohara A, Watanabe H, Inaba Y. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *Ind Health* 1998; 36: 234-239.

Yang J, Yu Y, Duerksen-Hughes PJ. Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress. *Mutat Res* 2003; 543: 31-58.

Yazbeck C, Thiebaugeorges O, Moureau T, Goua V, Debotte G, Sahuquillo J, Forhan A, Foliguet B, Magnin G, Slama R, Charles MA, Huel G. Maternal blood lead levels and the risk of pregnancy-induced hypertension: The EDEN cohort study. *Environmental Health Perspectives* 2009; 117: 1527-1530.

Zhang LF, Peng SQ, Sheng M, Li BL, Gang H, Sheng DY. Direct effects of lead ( $Pb^{+2}$ ) on the relaxation of in vitro cultured rat aorta to acetylcholine. *Toxicology Letters* 2007; 170: 104-110.

Zhou MS, Nishida Y, Chen QH, Kosaka H. Endothelium-derived contracting factor in carotid artery of hypertensive Dahl rats. *Hypertension* 1999; 34: 39-43.

Zygmunt PM, Grundemar L, Högestatt ED. Endothelium-dependent relaxation resistant to N omega-nitro-L-arginine in the rat hepatic artery and aorta. *Acta physiologica Scandinavia* 1994; 152(1): 107-114.



***ANEXO***

## ANEXO I

## Artigo científico publicado relacionado ao tema desta tese.

Toxicology and Applied Pharmacology 283 (2015) 127–138



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ytaap](http://www.elsevier.com/locate/ytaap)

## MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways



Maylla Ronacher Simões<sup>a,b,\*</sup>, Andrea Aguado<sup>b</sup>, Jonaína Fiorim<sup>a</sup>, Edna Aparecida Silveira<sup>a</sup>, Bruna Fernandes Azevedo<sup>a</sup>, Cindy Medice Toscano<sup>a</sup>, Olha Zhenyukh<sup>b</sup>, Ana María Briones<sup>b</sup>, María Jesús Alonso<sup>d</sup>, Dalton Valentim Vassallo<sup>a,c</sup>, Mercedes Salices<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Dept. of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES CEP 29040-091, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Health Science Center of Vitória-EMESCAM, Vitória, ES CEP 29045-402, Brazil

<sup>d</sup> Dept. of Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 October 2014

Revised 21 December 2014

Accepted 6 January 2015

Available online 14 January 2015

## Keywords:

Lead exposure

MAPK pathway

Oxidative stress

Cyclooxygenase-2

Vascular reactivity

Blood pressure

## ABSTRACT

Chronic exposure to low lead concentration produces hypertension; however, the underlying mechanisms remain unclear. We analyzed the role of oxidative stress, cyclooxygenase-2-dependent pathways and MAPK in the vascular alterations induced by chronic lead exposure. Aortas from lead-treated Wistar rats (1st dose: 10 µg/100 g; subsequent doses: 0.125 µg/100 g, intramuscular, 30 days) and cultured aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) from Sprague Dawley rats stimulated with lead (20 µg/dL) were used. Lead blood levels of treated rats attained 21.7 ± 2.38 µg/dL. Lead exposure increased systolic blood pressure and aortic ring contractile response to phenylephrine, reduced acetylcholine-induced relaxation and did not affect sodium nitroprusside relaxation. Endothelium removal and L-NAME left-shifted the response to phenylephrine more in untreated than in lead-treated rats. Apocynin and indomethacin decreased more the response to phenylephrine in treated than in untreated rats. Aortic protein expression of gp91(phox), Cu/Zn-SOD, Mn-SOD and COX-2 increased after lead exposure. In cultured VSMCs lead 1) increased superoxide anion production, NADPH oxidase activity and gene and/or protein levels of NOX-1, NOX-4, Mn-SOD, EC-SOD and COX-2 and 2) activated ERK1/2 and p38 MAPK. Both antioxidants and COX-2 inhibitors normalized superoxide anion production, NADPH oxidase activity and mRNA levels of NOX-1, NOX-4 and COX-2. Blockade of the ERK1/2 and p38 signaling pathways abolished lead-induced NOX-1, NOX-4 and COX-2 expression. Results show that lead activation of the MAPK signaling pathways activates inflammatory proteins such as NADPH oxidase and COX-2, suggesting a reciprocal interplay and contribution to vascular dysfunction as an underlying mechanisms for lead-induced hypertension.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Lead is an environmental pollutant that has emerged as a potential risk factor related to the development of cardiovascular complications. It has been extensively reported that chronic exposure to low levels of lead causes hypertension (Gonick et al., 1997; Vaziri et al., 1997;

Vaziri et al., 1999). Several mechanisms have been implicated in lead-induced hypertension. Thus, alterations of the muscular and endothelial layers of blood vessels induced by direct interaction with lead cause disturbances in the renin-angiotensin-aldosterone system, stimulation of the sympathetic system and an excessive synthesis of reactive oxygen species (ROS) (Zawadzki et al., 2006). Moreover, alterations in calcium exchangeability (Goldstein, 1993), inhibition of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Weiler et al., 1990), direct activation of smooth muscle protein kinase C (Watts et al., 1995) and endothelial dysfunction (Silveira et al., 2014) have also been reported.

It has been demonstrated that alterations in vascular tone are possibly involved in lead-induced hypertension (Marques et al., 2001). ROS have a key role in the pathogenesis of cardiovascular disease, which results in the disturbance of the structure of biological cell membranes in many organs within an organism, the impairment of cellular function, alterations of NO synthase activity and increased concentrations of

Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; COX-2, cyclooxygenase; MAPK, mitogen-activated protein kinases; DHE, dihydroethidium; ERK, extracellular signal-regulated protein kinases; JNK, c-Jun N-terminal kinases.

\* Correspondence to: M.R. Simões, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, UFES, Av. Marechal Campos, 1468, 29040-095 Vitória, ES, Brazil. Fax: +55 27 3335 7330.

\*\* Correspondence to: M. Salices, Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, 28029-Madrid, Spain.

E-mail addresses: [yllars@hotmail.com](mailto:yllars@hotmail.com) (M.R. Simões), [mercedes.salices@uam.es](mailto:mercedes.salices@uam.es) (M. Salices).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.01.005>

0041-008X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

inflammatory markers (Cai and Harrison, 2000; Elahi et al., 2009). COX-2, a pro-inflammatory enzyme, has been described as a source of free radicals (Virdis et al., 2013; Martínez-Revelles et al., 2013). It has been established that COX-2-derived prostanoids contribute to the endothelial dysfunction in hypertensive animals (Wong et al., 2010). A recent study by our group demonstrated that low levels of blood lead increased vascular reactivity. This increase was associated with reduced NO bioavailability, increased ROS, increased participation of COX-2-derived prostanoids and increased renin-angiotensin system activity (Silveira et al., 2014).

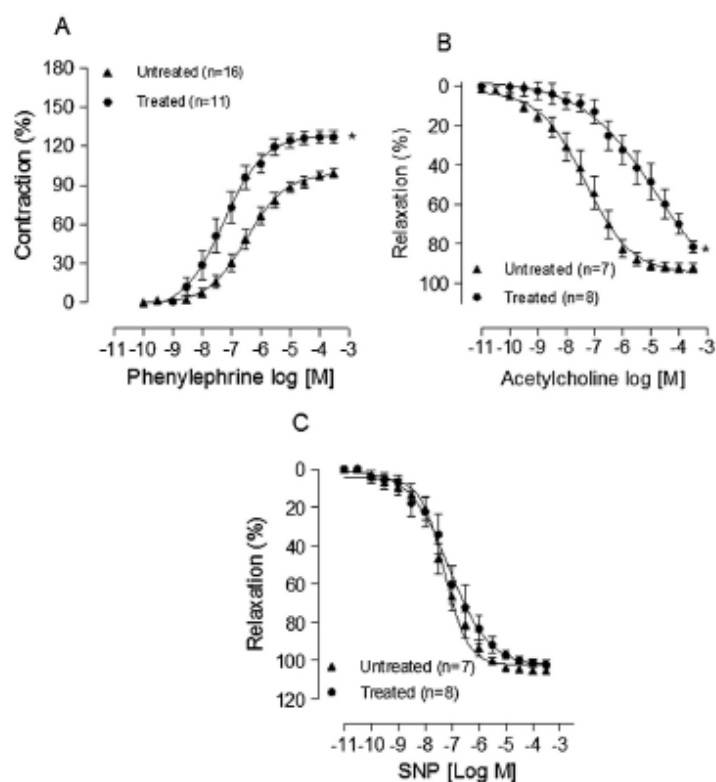
Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a family of enzymes that comprise global groups of signaling proteins that play critical regulatory roles in cell physiology (Chang and Karin, 2001; Chen et al., 2001). The activation of extracellular signal-regulated protein kinases (ERK1/2) is mainly associated with cell survival and proliferation (Hetman and Gozdz, 2004), while c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and p38 MAPK cascades are associated with the promotion of inflammation and programmed cell death (Tibbles and Woodgett, 1999; Chen et al., 2001). Some studies have linked the prostanoid pathway to the activation of the MAPK signaling cascade and to the induction of oxidative stress (Chen et al., 2005; Kim et al., 2005). In addition, MAPK activation by heavy metals may modulate mechanisms that induce oxidative stress (Leonard et al., 2004). Despite the extensive documentation of the toxic effects of lead in the cardiovascular system, a complete and detailed elucidation of the cell target and mechanisms by which lead exerts its effects remains to be defined. This study investigates the role of oxidative stress and cyclooxygenase-2 in the altered vascular reactivity induced by a 30-day treatment with a low

concentration of lead. In addition, we analyze the ability of lead to activate ERK1/2, p38 MAPK and JNK in VSMCs and its implication on the oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways involved in vascular alterations induced by lead.

## Materials and methods

**Ethics statement and animals.** Male Wistar (250–300 g) and Sprague Dawley (SD) (4 months old) rats were used. All experimental procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Espírito Santo (CEUA-UFES 063/2011) and by the Ethical Committee of Research of the Universidad Autónoma de Madrid, Spain (CEI-UAM 31-759). This study was carried out in strict accordance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology, the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institute of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996) and with the current Spanish and European laws (RD 223/88 Ministerio de Administraciones Públicas, MAPA, and 609/86).

Rats were housed under a 12-h light/12-h dark cycle, had free access to water and were fed with rat chow ad libitum. In one set of experiments, Wistar rats were divided into two groups: control (vehicle-saline, intramuscular) or treated with lead acetate for 30 days (1st dose: 10 µg/100 g; subsequent doses: 0.125 µg/100 g intramuscular, to cover daily loss). At the end of the treatment, rats were anesthetized and killed by exsanguination. The thoracic aortas were carefully dissected out, and the fat and connective tissue removed. For the vascular reactivity experiments, the aortas were divided into cylindrical segments



**Fig. 1.** Chronic lead treatment affects aortic reactivity. Effects of 30-day exposure to lead on the concentration–response curves to (A) phenylephrine, (B) acetylcholine and (C) sodium nitroprusside (SNP) in aortic rings. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  versus untreated using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. Number of animals used is indicated in parentheses.



**Table 1**

pD<sub>2</sub> and the maximum response to phenylephrine in aortic segments from untreated rats and rats treated with lead with or without endothelium (E-), L-NAME, apocynin, or indomethacin.

	Untreated		Lead treated	
	R <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>	R <sub>max</sub>	pD <sub>2</sub>
Control	99 ± 3.5	6.37 ± 0.20	1.27 ± 5.2*	7.26 ± 0.22*
E-	137 ± 9.6*	7.11 ± 0.07*	1.48 ± 7.9†	7.87 ± 0.30†
L-NAME	133 ± 8.2*	6.95 ± 0.12	1.46 ± 2.9†	7.91 ± 0.16†
Apocynin	84 ± 5.5*	6.22 ± 0.18	89 ± 6.7†	7.39 ± 0.25
Indomethacin	89 ± 3.4	6.73 ± 0.28	90 ± 4.5†	7.65 ± 0.25

Data are expressed as the mean ± SEM. R<sub>max</sub> values were expressed as a percentage of the maximal response induced by 75 mM KCl. R<sub>max</sub>: Maximal response.

\* P < 0.05 vs Control untreated.

† P < 0.05 vs Control lead treated.

(4 mm in length). In another set of experiments, thoracic aortas from SD rats were isolated and processed to obtain primary cultures of vascular smooth muscle cells (VSMCs) for cell culture experiments.

**Blood pressure measurements.** Indirect systolic blood pressure was measured at the beginning and at the end of treatment using tail-cuff plethysmography (ITC Life Science, Inc.). Conscious rats were restrained for 5–10 min in a warm and quiet room and conditioned to numerous cuff inflation–deflation cycles by a trained operator. Systolic blood pressure was measured, and the mean of ten measurements was recorded.

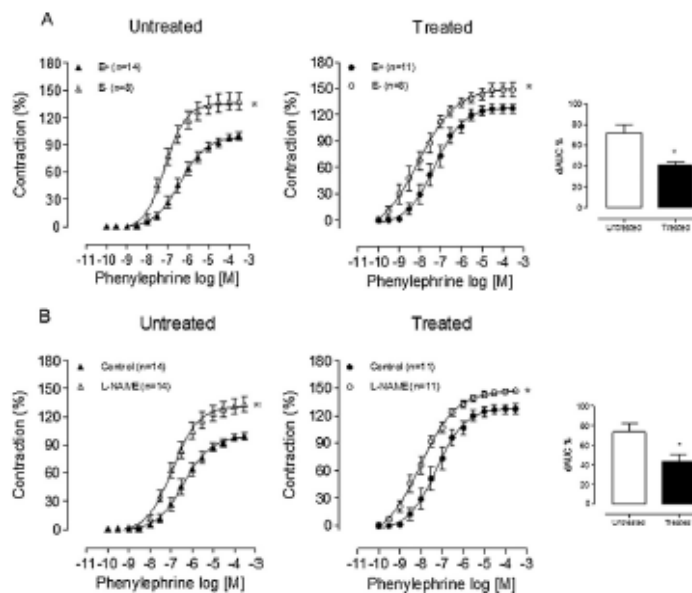
**Blood lead level measurements.** Blood lead levels were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (Nexon 300D, Perkin Elmer, USA) after acid decomposition of the whole blood samples as previously described (Liu et al., 1996). The samples were measured in triplicate.

**Vascular function.** Vascular function was studied in aortic segments by isometric tension recording using an isometric force transducer (TSD

125C, CA, USA) connected to an acquisition system (Biopac Systems, Inc., Santa Barbara, USA). Segments were mounted between two parallel wires in organ baths containing Krebs–Henseleit solution (KHS, in mM: 124 NaCl, 4.6 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 EDTA, 23 NaHCO<sub>3</sub>, 11.1 glucose) at 37 °C and gassed with 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub> (pH 7.4). After a 45-min equilibration period, aortic rings were initially exposed twice to 75 mM KCl to test their functional integrity and to assess the maximal developed tension. The presence of endothelium was confirmed by the effect of 10 μM acetylcholine in segments previously contracted with 1 μM phenylephrine. A relaxation equal to or greater than 90% was considered demonstrative of the functional integrity of the endothelium. After a washout period, single concentration–response curves to phenylephrine (0.1 nM–0.3 mM) or acetylcholine (ACh, 0.01 nM–0.3 mM) were performed. In some experiments, concentration–response curves to sodium nitroprusside (SNP, 0.01 nM–0.3 mM) were performed in segments contracted with phenylephrine (1 μM).

Parallel experiments with aortic segments from the same animal were performed in the absence (control) and presence of the nonspecific NOS inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM), the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10 μM) and the NADPH oxidase inhibitor apocynin (30 μM). These drugs were added to the bath 30 min before the phenylephrine curves. The influence of the endothelium on the response to phenylephrine was investigated after mechanical removal of this vascular component by rubbing the lumen with a needle. The absence of endothelium was confirmed by the inability of 10 μM acetylcholine to produce relaxation.

**In situ detection of vascular O<sub>2</sub><sup>-</sup> production.** The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in situ, as previously described (Wiggers et al., 2008). Dihydroethidium freely permeates the cell membrane and is oxidized in the presence of O<sub>2</sub><sup>-</sup> to ethidium bromide, which is trapped by intercalation with DNA. Ethidium bromide is excited at 546 nm and has an emission spectrum

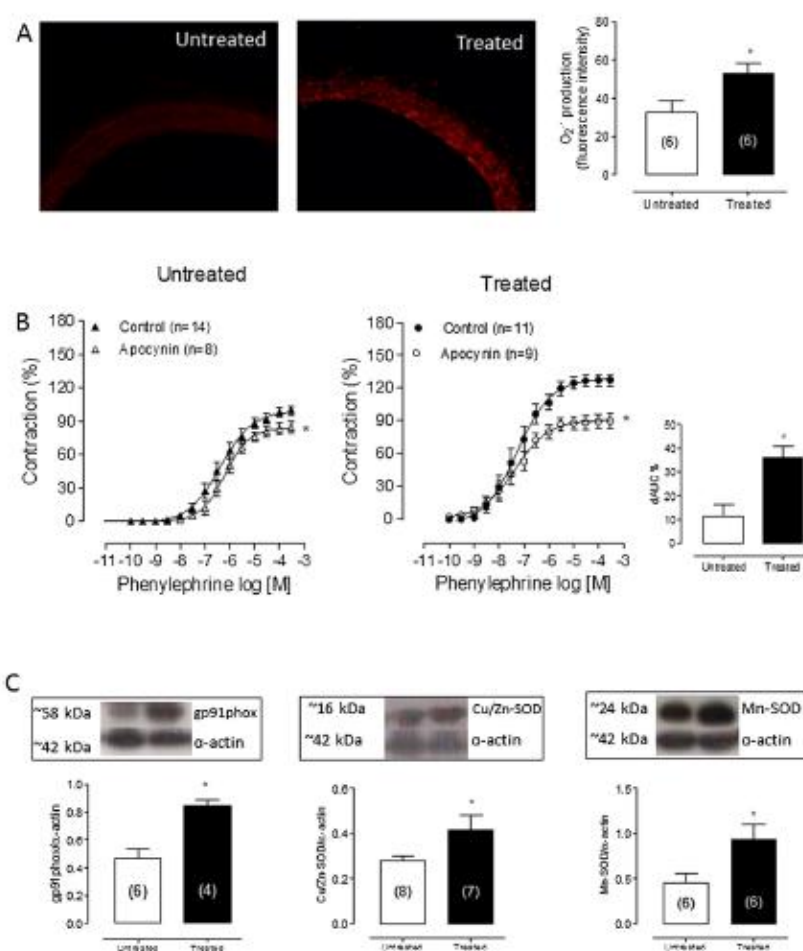


**Fig. 2.** Effects of chronic lead treatment on NO-mediated vascular response in aortic rings. Effects of (A) endothelium removal (E-) and (B) L-NAME (100 μM) on the concentration–response curve to phenylephrine in aortic rings from untreated and treated rats. \*P < 0.05 versus E+ or control using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. The inset shows differences in the area under the concentration–response curves (dAUC) in (A) endothelium-denuded and intact segments and (B) in the presence and absence of L-NAME. \*P < 0.05 versus untreated by Student's *t*-test. Data are expressed as the mean ± SEM. Number of animals used is indicated in parentheses.

of 610 nm. Frozen tissue segments were cut into 10- $\mu$ m-thick sections and placed on a glass slide. Serial sections were equilibrated under identical conditions for 30 min at 37 °C in Krebs–HEPES buffer (in mM: 130 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0.24 MgCl<sub>2</sub>, 8.3 HEPES, and 11.1 glucose, pH = 7.4). Fresh buffer containing DHE (2  $\mu$ M) was applied topically to each tissue section, covered with a cover slip, incubated for 30 min in a light-protected humidified chamber at 37 °C and then viewed with an inverted fluorescence microscope (NIKON Eclipse Ti-S,  $\times$  40 objective; N.Y., U.S.A.) using the same imaging settings in the untreated and lead-treated rats. Fluorescence was detected with a 568-nm long-pass filter. For quantification, eight frozen tissue segments per animal were sampled for each experimental condition and averaged. The mean fluorescence densities in the target region were calculated.

**Cell culture.** Primary cultures of VSMCs were obtained from SD rats as previously described (Aguado et al., 2013). Rat thoracic aortas were

aseptically removed, cleaned of fat tissue and blood cells and placed in cold (4 °C) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (HAM) medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) containing 0.1% BSA, 200 U/mL penicillin, and 200  $\mu$ g/mL streptomycin (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK). The aortas were digested in the same medium containing 2 mg/ml collagenase type II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA) and incubated for 30 min at 37 °C in a humidified atmosphere of CO<sub>2</sub> (5%). Then, after peeling off the adventitia using forceps, the medial smooth muscle layer was cut into small pieces and placed on 60  $\times$  15-mm tissue dishes in DMEM/F-12 (HAM) medium supplemented with 10% fetal calf serum (Biological Industries, Kibbutz, Israel) containing 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. Cells were allowed to reach confluence (10–12 days). Confluent cells were trypsinized with PBS/trypsin-EDTA (Sigma), washed and plated at a density of 30% in DMEM medium. Cells were identified as smooth cells by immunocytochemical staining with



**Fig. 3.** Lead induces vascular oxidative stress. (A) Representative fluorescent photomicrographs of arterial sections labeled with the oxidative dye hydroethidine and vascular superoxide anion quantification. \* $P$  < 0.05 versus untreated by Student's  $t$ -test. (B) Effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on the concentration–response curve to phenylephrine in aortic rings from untreated and treated rats; inset shows the difference in the area under the concentration–response curve (dAUC) of the respective group. \* $P$  < 0.05 versus control using two-way ANOVA and Bonferroni post-test versus untreated by Student's  $t$ -test. (C) Densitometric analysis of western blots for gp91(phox), Cu-Zn-SOD and Mn-SOD protein expression in aortas from untreated and treated rats. Representative blots are also shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P$  < 0.05 versus untreated by Student's  $t$ -test. Number of animals used is indicated in parentheses.

specific monoclonal anti- $\alpha$ -actin antibody (Sigma Chemical Co). We should emphasize that the cells employed here were the product of primary culture of VSMCs studied after only 5 passages to avoid transformation.

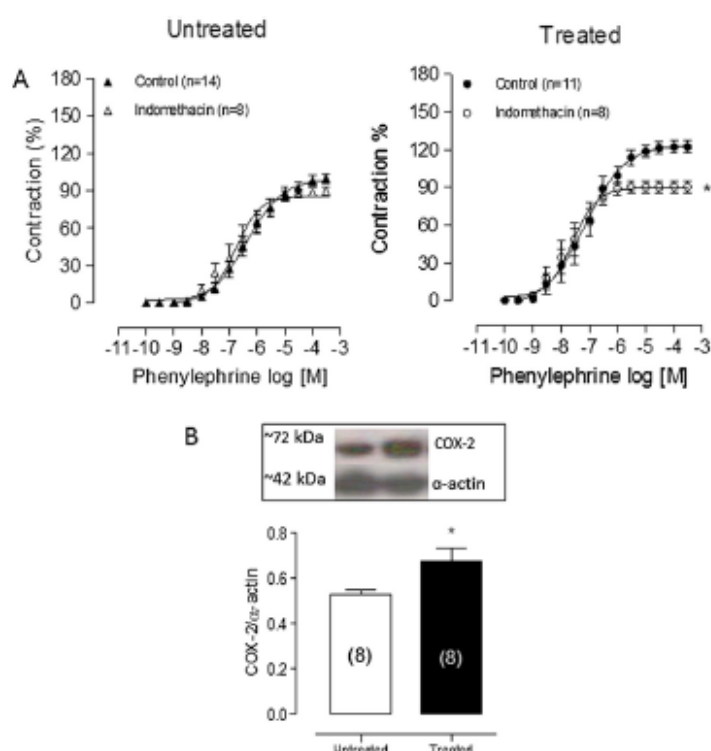
VSMCs were plated onto 6-well plates and cultured until 80% confluence. DMEM/F-12 (HAM) medium supplemented with serum was replaced with fresh medium containing 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL of streptomycin for 24 h before treatment. For the experiments, quiescent cells were incubated with vehicle (control) or with lead acetate (20  $\mu$ g/dL, during 48 h) in the absence or presence (30 min before and throughout lead incubation) of the ROS scavenger tempol (10  $\mu$ M), the NOX-1 inhibitor ML 171 (0.5  $\mu$ M), the specific scavenger of mitochondrial superoxide mito-TEMPO (5  $\mu$ M) or the COX-2 inhibitors celecoxib (10  $\mu$ M) and rofecoxib (10  $\mu$ M). In another set of experiments, cells were incubated with lead acetate for different stimulation times (5 min–24 h) to evaluate the effect on the activation of p38, ERK1/2, JNKs, MAPK and Akt. Finally, the effects of the ERK1/2 inhibitor U0126 (10  $\mu$ M) and the p38 MAPK inhibitor SB203580 (10  $\mu$ M) on COX-2, NOX-1 and NOX-4 mRNA levels were evaluated in cells exposed to 20  $\mu$ g/dL lead acetate for 48 h.

**Cell viability assay.** We used the MTT reduction assay following the procedure previously described (Mosmann, 1983). In brief, after incubation with lead acetate at different concentrations, 0.5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added to each well, and incubation was performed at 37 °C for 2 h. The formazan salt formed was dissolved in DMSO, and colorimetric determination was performed at 540 nm. Control cells without lead were considered to

have 100% viability. VCMS viability after exposure to lead was expressed as the percent of control within each individual experiment.

**Detection of superoxide anion production by fluorescence microscopy.** VSMCs were incubated with lead for 48 h, and intracellular  $O_2^{\cdot-}$  production was measured by fluorescence imaging analysis using DHE as described above. Briefly, VSMCs were plated onto glass coverslips inserted into 6-well plates and cultured and preincubated with tempol (10  $\mu$ M) and mito-TEMPO (5  $\mu$ M) 30 min before lead exposure. Afterwards, cells were loaded with DHE (10  $\mu$ M) in cell culture medium (DMEM/F-12 HAM, serum free) for 30 min at 37 °C. Images were then acquired with a Leica TCS SP2 confocal system ( $\times 40$ ) and processed using Metamorph image analysis software. Non-stimulated VSMCs were imaged daily in parallel using the same image settings during the course of the study. DHE fluorescence was quantified in individual cell nuclei (10–20 nuclei/image/experimental condition). At least 5 independent experiments were performed. Then, we expressed the effects of the different drugs as fold increases over the control.

**NADPH oxidase activity.** Cells were grown on 6-well culture plates and incubated with lead (20  $\mu$ g/dL, during 48 h). The  $O_2^{\cdot-}$  production generated by NADPH oxidase activity was determined by a chemiluminescence assay using lucigenin (5  $\mu$ M) and NADPH (100  $\mu$ M). The reaction was started by the addition of a mixture of lucigenin and NADPH to the protein sample in a final volume of 250  $\mu$ L. Chemiluminescence was determined every 24 s for 5 min in a plate luminometer (AUTO-Lumat LB953, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad



**Fig. 4.** Role of prostanooids in aortic segments from untreated and treated rats. (A) Effect of the nonselective COX inhibitor indomethacin on the concentration–response curve to phenylephrine in aortic rings from untreated and treated rats. \* $P < 0.05$  versus control using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. (B) Densitometric analysis of western blots for COX-2 protein expression in aortas from untreated and treated rats. Representative blots are also shown. \* $P < 0.05$  versus untreated by Student's *t*-test. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Number of animals used is indicated in parentheses.

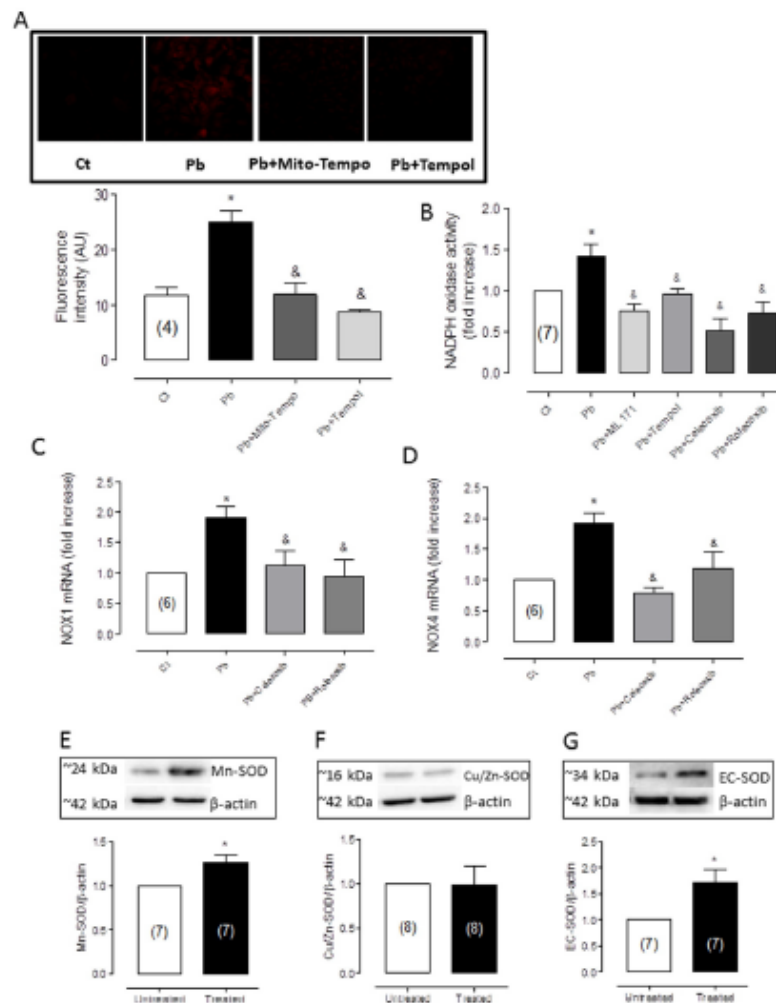


Wildbad, Germany). Buffer blank was subtracted from each reading. Luminescence was normalized by protein concentration measured by the Lowry assay and data were expressed as fold increase over the control.

**Western blot analysis.** Proteins from homogenized aortas and cells were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) that were incubated overnight at 4 °C with monoclonal antibodies for COX-2 (1:200; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), COX-1 (1:500, Cayman Chemical), and gp91(phox) (1:1000, Transduction Laboratories, Lexington, UK) and polyclonal antibodies for Mn-SOD (0.025 µg/mL; StressGen Bioreagents Corp., Victoria, Canada), Cu/Zn-SOD (1:10000; Nventa Biopharmaceuticals, Victoria, BC, Canada), EC-SOD (1:4000; Enzo Life Sciences), phospho ERK1/2 and ERK1/2, phospho p38 and p38

MAPK, phospho JNK and JNK, phospho Akt and Akt (1:1000; Cell Signaling, Boston, MA). Membranes were thoroughly washed and incubated with horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit (1:2000; Bio-Rad, USA) or anti-mouse (1:5000; StressGen Bioreagents Corp., Victoria, Canada) antibodies for 1 h at room temperature. After thorough washing, the bands were detected using an ECL plus Western Blotting detection system (GE Healthcare) after exposure to X-Ray AX film (Konica Minolta, Tokyo, Japan and Hyperfilm ECL International). Signals on the immunoblot were quantified using the Image J computer program.  $\alpha$ -Actin (aorta) (1:5000, Sigma Chemical Co) and  $\beta$ -actin (cells) (1:10,000; Transduction Laboratories) expressions were used as loading controls.

**Quantitative real time PCR assay.** Total RNA was obtained using TRI Reagent (Sigma Chemical Co.) according to the manufacturer's



**Fig. 5.** Lead induces oxidative stress in vascular smooth muscle cells. Effect of lead (Pb) on VSMC superoxide anion production in the absence or the presence of mito-TEMPO (5 µM) and Tempol (10 µM) (A); NADPH oxidase activity in the absence or the presence of ML 171 (0.5 µM), Tempol (10 µM), Celecoxib (10 µM) and Rofecoxib (10 µM) (B); NOX-1 and NOX-4 gene expression in the absence or the presence of Celecoxib and Rofecoxib (C,D); Mn-SOD, Cu/Zn-SOD and EC-SOD protein expression (E–G). Representative images of cells stained with dihydroethidium and representative blots are also shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05 versus untreated cells (Ct or untreated), &P < 0.05 versus Pb using one-way ANOVA followed by Tukey test or Student's t-test. Number of different cultures is indicated in parentheses.

recommendations and was reverse transcribed using a High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with random hexamers. qRT-PCR for COX-2, NOX-1 and NOX-4 was performed using the fluorescent dye SyBRGreen (iQaq FAST SyBRGreen Supermix with ROX, Bio-Rad, USA). To normalize, we amplified  $\beta_2$ -microglobulin as a housekeeping gene. All qRT-PCRs were performed in duplicate. Primers sequences were as follows: COX-2 (FW: AAGG GAGTCTGGAAACATTGTGAAC; RV: CAAATGTGATCTGGACGCAACA), NOX-1 (FW: CGGCAGAAGGTCGTGATTA; RV: TGGAGCAGAGGTCA GAGT), NOX-4 (FW: GCCTCCATCAAGCCAAGA; RV: CCAGTCATCCAG TAGAGTGTT) and  $\beta_2$ -microglobulin (FW: ACCCTGGTCTTCTCGTG CTT; RV: TAGCAGTTCAGTATGTTCCGCTT). Quantification was performed on a 7500 Fast (Applied Biosystems). PCR cycles proceeded as follows: initial denaturation for 30 s at 95 °C followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s. At the end of the PCR, a melting curve analysis was performed to show the specificity of the product detected. To calculate the relative index of gene expression, we employed the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using untreated samples as a calibrator (Livak and Schmittgen, 2001).

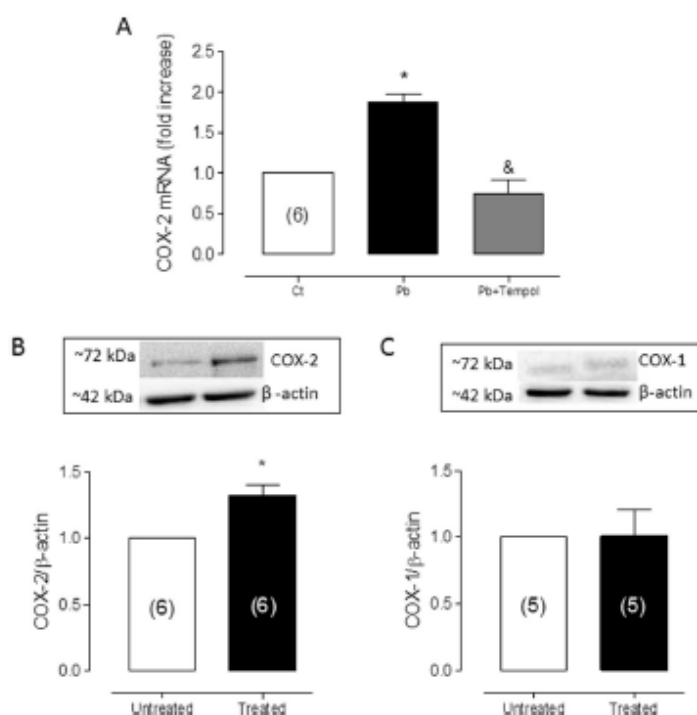
**In vitro wound healing assay.** To verify if lead induced cell migration, a wound healing assay was performed. For this assay, cells were seeded and cultured to confluence in a 24-well plate. Then, the cells were switched to serum-free medium for 24 h before the initiation of the experiments. A wound was made with a P10 pipette tip (CRP, with a filter). The medium was changed twice (5 mL/well) to wash away any cell debris remaining in the wound area. A line was drawn through the center of the wells, perpendicular to the wound. A picture was taken at time zero at the site of intersection of the line and the wound. Then, the cells were treated for 24 h with lead (20  $\mu$ g/dL). At 24 h, we took a picture in the same location. Adobe Photoshop CS2 was used to

determine the area of wound closure compared to time 0 for the stimulus and with respect to the control situation.

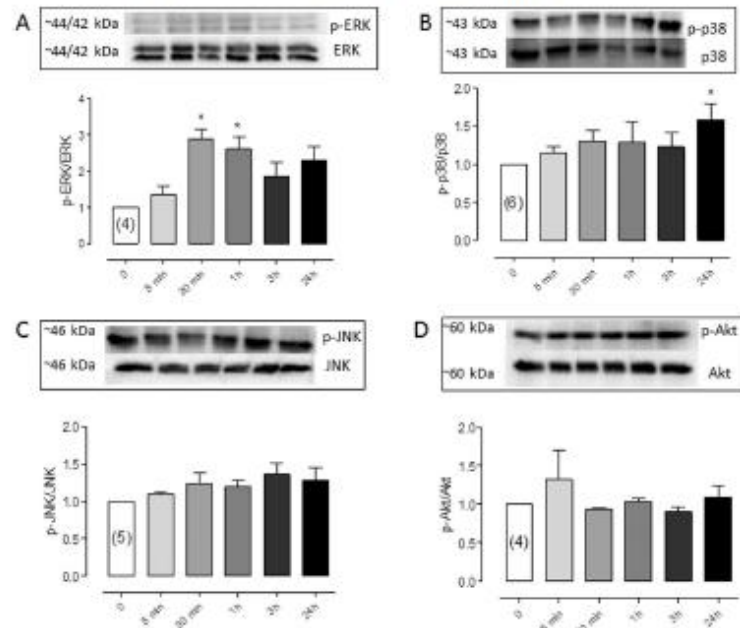
**Cell proliferation assay.** Cell proliferation was assessed using a CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA). VSMCs were seeded on 96-well plates ( $20 \times 10^3$  cells/well) in DMEM/F12 (HAM) medium and were allowed to attach for 24–36 h. Afterwards, cells were switched to serum free medium for 24 h. Cells were then treated with lead (20  $\mu$ g/dL) or vehicle for 48 h. The proliferative response was quantified by adding MTS tetrazolium solution (20  $\mu$ L/well). After 2–3 h of incubation, absorbance was measured at 490 nm in a microplate reader (ASYS Hitech GmbH, Austria). Different assays were each performed in triplicate.

**Drugs and reagents.** *l*-Phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, sodium nitroprusside, apocynin, lucigenin, mito-TEMPO, ML 171, tempol (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl), salts and other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. and Merck (Darmstadt, Germany). DHE, streptomycin and penicillin were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Celecoxib and rofecoxib were obtained from Pfizer (New York, NY, USA) or LKT Laboratories (St. Paul, Mn, USA), respectively. U0126 and SB203580 were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Lead acetate was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All drugs were dissolved in distilled water except celecoxib, rofecoxib, U0126 and SB203580, which were dissolved in DMSO. DMSO did not have any effect on the parameters evaluated in VSMCs.

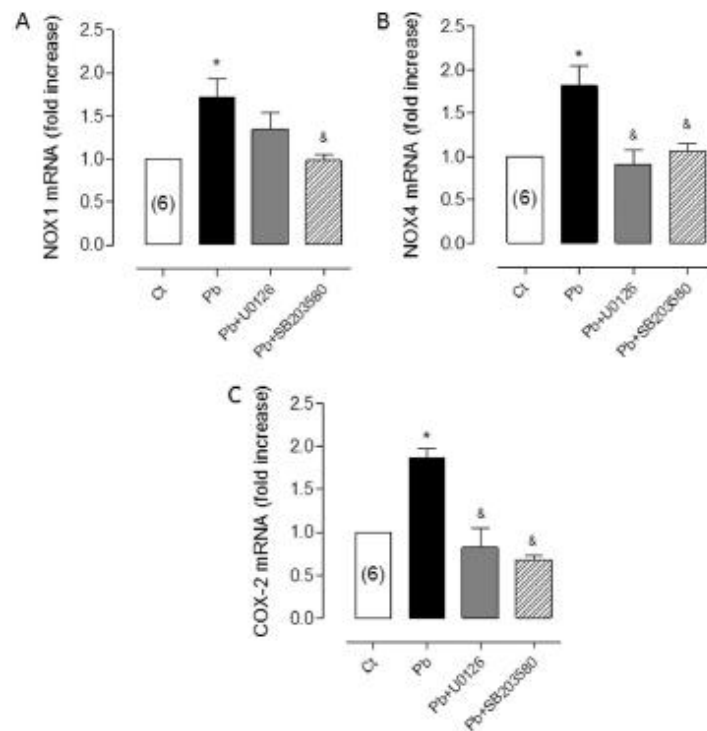
**Data analysis and statistics.** Contractile responses were expressed as a percentage of the maximal response induced by 75 mM KCl. Relaxation



**Fig. 6.** Effect of lead on vascular cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and the relationship with oxidative stress. (A) Effects of lead (Pb) on COX-2 mRNA levels in the absence or the presence of Tempol (10  $\mu$ M). Effect of lead on COX-2 (B) and COX-1 (C) protein expression. Representative blots are also shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  versus untreated cells (Ct), &P < 0.05 versus Pb using one-way ANOVA followed by Tukey test or Student's *t*-test. Number of cell cultures is indicated in parentheses.



**Fig. 7.** Lead induces ERK1/2 and p38 MAPK phosphorylation. Effects of lead on (A) ERK1/2, (B) p38 MAPK, (C) JNK and (D) Akt activation. Representative blots are also shown. The results are expressed as the ratio between phospho-MAPK and total MAPK and normalized to values obtained for unstimulated control (0) cell. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  versus unstimulated cells (0) by one-way ANOVA followed by Tukey test. Number of cell cultures is indicated in parentheses.



**Fig. 8.** Role of ERK1/2 and p38 MAPK pathways on lead-induced NOX-1, NOX-4 and COX-2 expression. Effects of U0126 (10  $\mu$ M) and SB203580 (10  $\mu$ M) on lead (Pb)-induced (A) NOX-1, (B) NOX-4 and (C) COX-2 gene expression in smooth muscle cells. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  versus untreated (Cl), &#x26;  $P < 0.05$  versus Pb by one-way ANOVA followed by Tukey test. Number of cell cultures is indicated in parentheses.

responses to ACh or SNP were expressed as the percentage of the previous contraction. For each concentration–response curve, the maximal effect ( $R_{max}$ ) and the concentration of agonist that produced 50% of the maximal response ( $EC_{50}$ ) were calculated using non-linear regression analysis (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The sensitivities of the agonists were expressed as  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ). To compare the effects of endothelium denudation, L-NAME or apocynin on the contractile responses to phenylephrine, some results were expressed as differences in the area under the concentration response curves (dAUC) for the control and experimental groups. AUCs were calculated from the individual concentration–response plots using a computer program (GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The differences were expressed as the percentage of the AUC of the corresponding control situation.

All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the number of animals or independent experiments in the case of cell cultures used in each experiment. The results were analyzed using Student's *t* test or one- or two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test or Tukey test by using GraphPad Prism Software. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

Rats exposed to lead for 30 days had similar body weight [Control: before  $218 \pm 3.08$  g and after  $325 \pm 5.80$  g ( $n = 9$ ); lead-treated: before  $217 \pm 2.57$  g and after  $328 \pm 7.27$  g ( $n = 9$ )  $P > 0.05$ ] and tibia length

[Control:  $3.8 \pm 0.1$  cm ( $n = 6$ ); Lead-treated:  $3.4 \pm 0.1$  cm ( $n = 9$ )  $P > 0.05$ ]. The left ventricular mass:tibia length ratio was not affected in lead-treated animals ( $0.173 \pm 0.003$  g/cm) when compared with controls ( $0.178 \pm 0.006$  g/cm). The blood lead concentration attained was  $21.7 \pm 2.38$   $\mu$ g/dL ( $n = 6$ ) and the systolic blood pressure (SBP) was increased by treatment (Control:  $127 \pm 0.57$  mmHg,  $n = 7$ ; lead treated:  $144 \pm 1.67$  mmHg,  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ).

### Effects of lead treatment on vascular reactivity

Lead treatment did not affect the response to KCl (untreated:  $3.75 \pm 0.13$  g,  $n = 9$ ; lead-treated:  $3.52 \pm 0.19$  g,  $n = 9$ ;  $P > 0.05$ ). However, treatment increased vasoconstrictor responses to phenylephrine and decreased the endothelium-dependent responses induced by ACh (Figs. 1 A–B, Table 1). The vasodilator responses induced by SNP were unaffected by lead treatment (Fig. 1 C). These results suggest that lead treatment affects endothelial function in aortic rings.

### Effects of lead treatment on endothelial modulation of vasoconstrictor responses

To evaluate if lead treatment alters NO modulation in aortic segment responses, the effect of endothelium removal and incubation with the NOS inhibitor L-NAME ( $100 \mu$ M) on vasoconstrictor responses were investigated. Both endothelium removal and NOS inhibitor addition left-shifted the concentration–response curves to phenylephrine in aortic segments from both groups, but this effect was smaller in preparations from lead-treated rats than in those from control rats, as shown by the dAUC values (Figs. 2 A–B). These findings suggest that NO production and/or bioavailability are reduced after lead treatment.

### Role of oxidative stress and prostanoids on the effect of lead on vasoconstrictor responses

Reduction in NO bioavailability caused by increased ROS production is associated with endothelial dysfunction accompanying hypertension (Cai and Harrison, 2000). The basal  $O_2^-$  production in the aortas from lead-treated rats was greater than that from the untreated rats (Fig. 3 A). The participation of ROS in the vascular responses was evaluated using the NADPH oxidase inhibitor apocynin ( $30 \mu$ M). Apocynin reduced the vascular response to phenylephrine in both experimental groups (Fig. 3 B, Table 1); however, this effect was greater in preparations from lead-treated rats than in those from control rats as demonstrated by the dAUC (Fig. 3 B). gp91(phox), Cu/Zn-SOD and Mn-SOD protein expression was increased in the aorta from the lead treated group compared to controls (Fig. 3 C).

The cyclooxygenase inhibitor indomethacin ( $10 \mu$ M) was used to investigate the role of prostanoids on the increased response to phenylephrine in lead-treated rats. Indomethacin did not alter phenylephrine responses in control aortic segments. However, in arteries from lead-treated rats, indomethacin reduced phenylephrine contraction (Fig. 4 A, Table 1). We investigated COX-2 protein expression and observed an increase in this enzyme in the lead-treated group (Fig. 4 B).

Altogether, these results show that chronic treatment with low concentrations of lead increases oxidative stress and prostanoid pathways and could contribute to the impaired vascular function observed in the aortas from lead-treated rats.

### Effect of lead exposure on oxidative stress and COX-2 expression in VSMCs

In an attempt to investigate the underlying mechanism of lead effects on oxidation and COX-2 expression observed in vascular reactivity, we used VSMCs. First, we evaluated cell viability with 10, 20 and 100  $\mu$ g/dL lead acetate during 48 h using a MTT cell viability assay. No differences were observed in cell viability (data not shown). Therefore, we

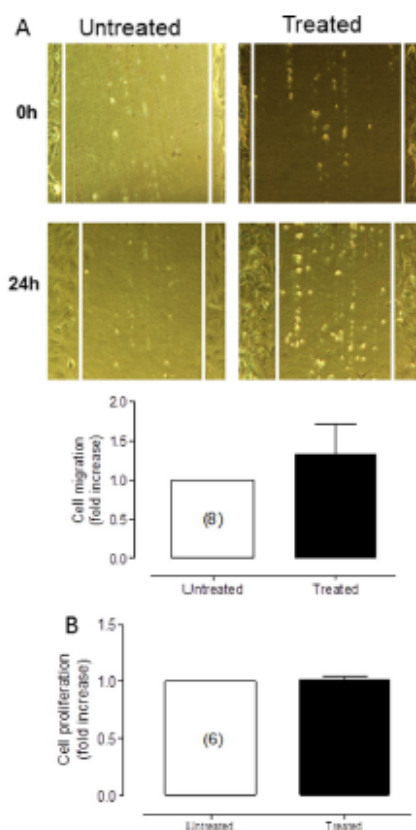


Fig. 9. Effects of lead on cell migration and proliferation. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Number of cell cultures is indicated in parentheses.



chose the concentration of 20 µg/dL because this is close to the concentration attained in blood from rats treated for 30 days with lead acetate.

Incubation of VSMCs with lead (20 µg/dL, 48 h) increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> production, as determined by increased DHE-induced fluorescence (Fig. 5A). This increased production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> was diminished by the SOD mimetic tempol and by the specific scavenger of mitochondrial superoxide mito-TEMPO (Fig. 5A), suggesting a role for mitochondrial oxidative stress in the effects of lead. Lead also increased NADPH oxidase activity as well as the mRNA levels of the NADPH oxidase subunits NOX-1 and NOX-4 (Figs. 5B–D). The increased NADPH activity was normalized by ML 171 (0.5 µM) and tempol (10 µM). In addition, the NADPH oxidase activity and NOX mRNA levels were reduced by the COX-2 inhibitors celecoxib (10 µM) and rofecoxib (10 µM) (Figs. 5B–D), which implies a role for COX-2-derived products in NADPH oxidase activation. We also studied whether lead-treatment might alter the expression of the superoxide detoxificant enzyme SOD. Mn-SOD and EC-SOD protein expression was augmented in VSMCs treated with lead (Figs. 5E and G). However, Cu/Zn-SOD protein expression was not affected (Fig. 5F).

VSMCs treated with lead for 48 h also increased COX-2 mRNA levels (Fig. 6A). This increase was accompanied by an increase in COX-2 protein expression, without changes in COX-1 protein expression (Figs. 6B–C). In addition, we observed that pre-treatment of VSMCs with the antioxidant tempol prevented lead-induced COX-2 gene expression, suggesting a relationship between ROS and COX-2 products (Fig. 6A).

#### MAPK signaling pathways involved in the lead-induced NOX and COX-2 mRNA levels

The MAPK pathway plays a role in modulating COX-2 (expression and activity) and ROS production (Ohnaka et al., 2000; Wang et al., 2013). Thus, we investigated whether the MAPK signaling pathway was involved in the effects induced by lead on NOX and COX-2 mRNA levels. We observed a time-dependent stimulation of ERK1/2 by lead at 30–60 min but not at long exposure times (3 and 24 h) (Fig. 7A). In contrast, p38 was activated by lead only after long exposure times (24 h) (Fig. 7B). However, neither JNK nor Akt was activated by lead at any time points (Figs. 7C–D). The p38 MAPK inhibitor SB203580 (10 µM) but not the ERK1/2 MAPK inhibitor U0126 (10 µM) normalized lead-induced NOX-1 gene expression (Fig. 8A); both U0126 and SB203580 normalized lead-induced NOX-4 and COX-2 gene expression (Figs. 8B–C). These findings suggest that the activation of these kinases by lead is involved in events that induce NADPH oxidase and COX-2 activation. However, lead did not induce either cell migration or proliferation (Figs. 9A–B).

#### Discussion

The exposure to environmental chemicals, including lead, is emerging as a potential cardiovascular risk factor (Weinhold, 2004; Mamtani et al., 2011; Simões et al., 2011). The main finding of the present study is that 30-day treatment with a low dose of lead increases blood lead concentrations to values (21.7 µg/dL) lower than the reference value (60 µg/dL), but these concentrations are sufficient to increase systolic blood pressure and phenylephrine-induced contractility and to decrease endothelium-dependent vasodilator responses in rat aortas. Our results also suggest that p38 and ERK1/2 MAPKs are involved in the increase in vascular COX-2 levels and ROS production after lead exposure that act in concert to produce the vascular changes that could contribute to the occurrence of arterial hypertension.

The effects of lead on human health depend on blood levels and on the duration of the exposure. Several studies have supported the association between high blood lead levels and hypertension in humans (Andrzejak et al., 2004; Patrick, 2006; Kosnett et al., 2007). The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) considered the reference blood lead concentration level to be 60 µg/dL (Patrick, 2006;

Kosnett et al., 2007). Nevertheless, individuals with baseline blood lead levels of 46.8 µg/dL or 67.8 µg/dL have also shown increases in arterial pressure (Malvezzi et al., 2001; Andrzejak et al., 2004) suggesting that even lower than recommended maximal doses might have cardiovascular deleterious consequences. A similar association was reported in treated rats with lead blood concentrations between 31.8 µg/dL and 42.5 µg/dL (Gonick et al., 1997; Marques et al., 2001). Moreover, in the present study, treated rats attained a blood lead concentration of 21.7 ± 2.38 µg/dL that increased systolic blood pressure.

The mechanisms by which lead may cause hypertension are not entirely clear (Heydari et al., 2006). Different studies have identified several candidates, including oxidative stress, impairment of the NO system, inflammation, dysregulation of vasoactive hormones, and alterations of cellular Ca<sup>2+</sup> transport and intracellular Ca<sup>2+</sup> distribution (Goldstein, 1993; Feng et al., 1995; Heydari et al., 2006). Using animal models, our group has already successfully documented that chronic exposure to lead exerts detrimental effects on the function of the heart and aorta (Simões et al., 2011; Fiorim et al., 2011; Silveira et al., 2014; Fiorese et al., 2014). In the present study, aortic reactivity to phenylephrine was increased, whereas relaxation in response to acetylcholine was reduced. Similar findings were recently reported in aortas from rats with blood lead levels smaller than those in the present study (Silveira et al., 2014). Alterations in the reactivity of the aorta after lead treatment were endothelium dependent, as evidenced by the magnitude of lead-induced effects being reduced in aortic rings without endothelium. In addition, the NOS inhibitor L-NAME increased the reactivity to phenylephrine to a lower extent in arteries from lead-treated rats. These results suggest that lead decreased endothelial NO bioavailability, consequently increasing the reactivity to phenylephrine in aortic rings. In agreement, a previous study showed that treatment with 100 ppm lead acetate for 28 days reduces NO bioavailability in the rat aorta (Karimi et al., 2002). However, our group has reported that low concentrations of lead increase the NO bioavailability in the initial stages of lead exposure (7 days) (Fiorim et al., 2011), but this effect might be changed after a long exposure, as we observed in the present study. However, the endothelium-independent relaxation induced by the NO donor sodium nitroprusside was not altered after 30 days of lead exposure, in agreement with previous reports (Silveira et al., 2014).

Oxidative stress can lead to endothelial dysfunction, vascular structural alterations and hypertension, (Rodríguez-Iturbe et al., 2004; Vaziri, 2004). The inactivation of NO by ROS can result in vasoconstriction, increased platelet/leukocyte adhesion, vascular smooth muscle cell migration/proliferation, and matrix accumulation leading to vascular remodeling (Touyz et al., 2011; Drummond et al., 2011). It is known that increased ROS production contributes to the inflammatory process associated with lead-induced hypertension (Vaziri et al., 1997; Silveira et al., 2014). Herein, we observed increased superoxide anion production in the aorta from lead-treated rats and in VSMCs exposed to lead. In addition, the antioxidant apocynin reduced the vasoconstrictor response induced by phenylephrine, more in aortas from lead-treated rats, suggesting the involvement of superoxide anions in the vascular effects of lead, in accordance with the results recently described (Silveira et al., 2014). On the other hand, the formed peroxynitrite by the reaction of NO with superoxide anion would also contribute to the altered vascular responses observed after lead exposure, as it has been described by other investigators in vascular diseases such as atherosclerosis, hypertension, ischemia, endotoxic shock, and diabetes (Zou, 2007).

NADPH oxidase isoforms have been described as a major source of ROS in vascular tissue (Griendling et al., 2000). Our results point to the up-regulation of NADPH oxidase as the potential source of ROS in lead-exposed vascular cells. Thus, we found that 1) the protein expression of the gp91(phox) NADPH oxidase subunit was increased in arteries from treated rats; and 2) the mRNA levels of NOX-1 and NOX-4 subunits of NADPH oxidase and NADPH activity were increased in lead-treated VSMCs. However, the participation of other sources of ROS, such as the mitochondria, cannot be discarded. Thus, the increased



$O_2^-$  production observed in VSMCs treated with lead was diminished by the mitochondria-targeted SOD-2 mimetic mito-TEMPO. Decreased antioxidant defenses would also contribute to the increased oxidative stress. A major antioxidant defense system against  $O_2^-$  are the superoxide dismutases which plays an important role in regulating blood pressure and endothelial function by reducing extracellular  $O_2^-$  level, thereby preventing oxidative inactivation of NO released from endothelium (Oury et al., 1994; Oury et al., 1996; Stralin et al., 1995). However, the protein expression of Mn-SOD, Cu/Zn-SOD and EC-SOD was increased in lead-treated arteries or VSMCs, suggesting that antioxidant mechanisms are activated in lead-exposed cells probably to protect against increased oxidative stress. In agreement, Ni et al. (2004) demonstrated an increase in superoxide and hydrogen peroxide in human endothelium and VSMCs from human coronary arteries after lead acetate (1 ppm) treatment for 60 h, accompanied by an increase in Cu/Zn-SOD protein expression. In the same study, the authors demonstrated a significant up-regulation of the gp91(phox) subunit of NADPH oxidase in lead-exposed endothelial cells.

COX-2, the source of the prostaglandins that mediate inflammation, is rapidly induced in response to different stimuli, including growth factors, proinflammatory cytokines and oxidative stress (Feng et al., 1995; Martínez-Revelles et al., 2013; Wang et al., 2013). Increased vascular COX-2 expression is usually associated with hypertension (Álvarez et al., 2007). COX-2 derived prostanoids were also implicated in the vascular effects of lead (Silveira et al., 2014) and other heavy metals, such as mercury (Pecanha et al., 2010). Herein, we observed an increase in COX-2, but not in COX-1, protein or mRNA levels in aortas from lead-treated rats and/or in VSMCs exposed to lead. After COX blockade with indomethacin, a reduction in the phenylephrine-induced vasoconstrictor responses in aortic segments from lead-treated rats was observed, but not in control rats. These findings suggest the participation of COX-2-derived prostanoids in the increased vasoconstrictor responses induced by lead treatment.

Some studies have reported that oxidative stress upregulates COX-2 expression (Feng et al., 1995; García-Cohen et al., 2000; Álvarez et al., 2007) and that antioxidant treatment reduces COX-2 expression (Feng et al., 1995; Martínez-Revelles et al., 2013). In fact, increased ROS production is hypothesized as one possible mechanism for the increased vasomotor COX-2 activity in the setting of hypertension (García-Cohen et al., 2000; Álvarez et al., 2007; Martínez-Revelles et al., 2013). As discussed above, we show that lead stimulated COX-2 expression and ROS production. More importantly, our results also suggest an interaction between COX-2 and ROS in VSMCs exposed to lead. Thus, the ROS scavenger tempol reduced the increased COX-2 mRNA levels, whereas the COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib reduced the increased NADPH activity and NOX-1 and NOX-4 mRNA levels. This reciprocal interaction between both pathways would increase the harmful effects of lead at the vascular level. In aortas from angiotensin II-infused mice, the existence of a reciprocal relationship between ROS and COX-2-derived products has been described as responsible for the vascular dysfunction observed in this hypertension model (Martínez-Revelles et al., 2013). Sancho et al. (2011) also showed a reciprocal regulation of NADPH oxidase and the COX-2 pathway in liver cells under inflammatory conditions.

Previous reports indicate that MAPK pathways play an important role in modulating COX-2 (expression and activity) and ROS production (Ohnaka et al., 2000; Wang et al., 2013). However, dissection of the specific molecular mechanisms and signaling cascades continues to be the focus of intense research. Evidence shows that MAPK cascades are the major signaling pathway that regulates cell proliferation, migration, differentiation, inflammation and apoptosis (Yang et al., 2003). Moreover, Aguado et al. (2013) reported that mercury, another heavy metal, induced MAPK activation in VSMCs. Therefore, we speculated that MAPK signaling pathways might be involved in the lead-induced alterations in VSMCs. Our current data show that lead induces an early activation of ERK1/2 and a delayed activation of p38 MAPKs without effects

on JNK. Posser et al. (2007) showed the toxic effect of lead on C6 glioma cells and a significant activation of p38 and JNK MAPKs. In addition, we found that lead did not stimulate Akt phosphorylation, which corroborates results published by Lu et al. (2001) in human astrocytoma cells. To investigate if the p38 and ERK1/2 MAPK pathways were involved in COX-2 and NADPH oxidase activation, the effect of specific inhibitors on COX-2, NOX-1 and NOX-4 expression was investigated. U0126 (inhibitor of ERK1/2) and SB203580 (inhibitor of p38) abrogated lead-induced COX-2, NOX-1 and NOX-4 mRNA expression in cultured VSMC. These findings suggest that the activation of inflammatory proteins such as NADPH oxidase and COX-2 in response to lead exposure is mediated through p38 and ERK1/2 signaling pathways. However, when we analyzed the effects of lead on migration and proliferation in VSMCs, no differences were observed in this model of exposure. There is evidence that lead can increase the proliferation of rat liver cells (Liu et al., 1997), VSMC (Fujiwara et al., 1995) and spleen cells (Razani-Boroujerdi et al., 1999). Lu et al. (2001) demonstrated that lead induces proliferation in human 1321N1 astrocytoma cells that is mediated by the activation of the MEK1/2 and ERK1/2 signal transduction pathways in a PKC-dependent manner. The discrepancies with our data could be due to differences in the exposure protocols related to doses and/or duration of lead exposure.

In summary, the present study demonstrated for the first time that treatment with low doses of lead increased systolic arterial blood pressure, promoted vascular dysfunction and activated MAPK signaling pathways. These effects are associated with the activation of inflammatory proteins such as NADPH oxidase and COX-2 that act in concert to contribute to vascular dysfunction. These findings strongly support that lead exposure should be considered an environmental risk factor for cardiovascular disease.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported by MINECO (SAF2012-36400), ISCIII (RD12/0042/0024), Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (PHBP14/00001), PRONEX-CNPq/FAPES (48511935/2009). MRS was a fellow of CAPES and CNPq. AMB was supported by the Ramon y Cajal Program (RyC2010-06473). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### References

- Aguado, A., Galan, M., Zhenyukh, O., Wiggers, G.A., Roque, F.R., Redondo, S., Pecanha, F., Martín, A., Fortunio, A., Cachafeiro, V., Tejerina, T., Salices, M., Briones, A.M., 2013. Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 188–200.
- Álvarez, Y., Pérez-Girón, J.V., Hernández, R., Briones, A.M., García-Redondo, A., Beltrán, A., Alonso, M.J., Salices, M., 2007. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 381–388.
- Andrzejak, R., Poreba, R., Derkacz, A., 2004. [Effect of chronic lead poisoning on the parameters of heart rate variability]. *Med. Med. Pr.* 55, 139–144.
- Cai, H., Harrison, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87, 840–844.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410, 37–40.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.H., 2001. MAP kinases. *Chem. Rev.* 101, 2449–2476.
- Chen, J.J., Huang, W.C., Chen, C.C., 2005. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in response to proteasome inhibitors involves reactive oxygen species-mediated signaling pathway and recruitment of CCAAT/enhancer-binding protein delta and CREB-binding protein. *Mol. Biol. Cell* 16, 5579–5591.
- Drummond, G.R., Selemidis, S., Griendling, K.K., Sobey, C.G., 2011. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 453–471.

- Elahi, M.M., Kong, Y.X., Matata, B.M., 2009. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2, 259–269.
- Feng, L., Xia, Y., Garcia, G.E., Hwang, D., Wilson, C.B., 1995. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 95, 1669–1675.
- Fioresi, M., Simoes, M.R., Furieri, L.B., Broseghini-Filho, G.B., Vescovi, M.V., Stefanon, I., Vassallo, D.V., 2014. Chronic lead exposure increases blood pressure and myocardial contractility in rats. *PLoS One* 9 (5), e96900.
- Fiorini, J., Ribeiro Junior, R.F., Silveira, E.A., Padilha, A.S., Vescovi, M.V., de Jesus, H.C., Stefanon, I., Saláez, M., Vassallo, D.V., 2011. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. *PLoS One* 6 (2), e17117.
- Fujiwara, Y., Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M., Kozuka, H., 1995. Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology* 98, 105–110.
- García-Cohen, E.C., Marin, J., Diez-Picazo, L.D., Baena, A.B., Saláez, M., Rodríguez-Martínez, M.A., 2000. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 75–81.
- Goldstein, G.W., 1993. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology* 14, 97–101.
- Gonick, H.C., Ding, Y., Bondy, S.C., Ni, Z., Vaziri, N.D., 1997. Lead-induced hypertension: interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension* 30, 1487–1492.
- Griendling, K.K., Sorensen, D., Ushio-Fukai, M., 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86, 494–501.
- Hetman, M., Gozdz, A., 2004. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur. J. Biochem.* 271, 2050–2055.
- Heydari, A., Norouzzadeh, A., Khoshbaten, A., Asgari, A., Najafi, S., Badalzadeh, R., 2006. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol. Lett.* 166, 88–94.
- Karimi, G., Khoshbaten, A., Abdollahi, M., Sharifzadeh, M., Namiranian, K., Delipour, A.R., 2002. Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacol. Res.* 46, 31–37.
- Kim, K.A., Lim, Y.S., Kim, K.M., Yoon, J.H., Lee, H.S., 2005. 15d-Deoxy-Delta1,2,14-prostaglandin J2 modulates collagen type I synthesis in human hepatic stellate cells by inducing oxidative stress. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 73, 361–367.
- Kosnett, M.J., Wedeen, R.P., Rothenberg, S.J., Hopkins, K.L., Materna, B.L., Schwartz, B.S., Hu, H., Woolf, A., 2007. Recommendations for medical management of adult lead exposure. *Environ. Health Perspect.* 115, 463–471.
- Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1921–1942.
- Liu, H., Montazer, A., Dolan, S.P., Schwartz, R.S., 1996. Inter-laboratory note. Evaluation of a low sample consumption, high-efficiency nebulizer for elemental analysis of biological samples using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 307–311.
- Liu, J.Y., Lin, J.K., Liu, C.C., Chen, W.K., Liu, C.P., Wang, C.J., Yen, C.C., Hoieh, Y.S., 1997. Augmentation of protein kinase C activity and liver cell proliferation in lead nitrate-treated rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43, 355–364.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Lu, H., Guizzetti, M., Costa, L.G., 2001. Inorganic lead stimulates DNA synthesis in human astrocytoma cells: role of protein kinase C. *J. Neurochem.* 78, 590–599.
- Mahezi, C.K., Moreira, E.G., Vassiliev, I., Vassiliev, V.S., Cordellini, S., 2001. Effect of L-arginine, dimethylsulfoxide (DMSO) and the association of L-arginine and DMSO on tissue lead mobilization and blood pressure level in plumbism. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 1341–1346.
- Mamtani, R., Stern, P., Dawood, L., Cheema, S., 2011. Metals and disease: a global primary health care perspective. *J. Toxicol.* 2011, 319136.
- Marques, M., Millas, L., Jimenez, A., Garcia-Colis, E., Rodriguez-Feo, J.A., Velasco, S., Barrientos, A., Casado, S., Lopez-Farre, A., 2001. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 2594–2600.
- Martínez-Revelles, S., Avendano, M.S., García-Redondo, A.B., Álvarez, Y., Aguado, A., Pérez-Girón, J.V., García-Redondo, L., Esteban, V., Redondo, J.M., Alonso, M.J., Briones, A.M., Saláez, M., 2013. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 51–65.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Ni, Z., Hou, S., Barton, C.H., Vaziri, N.D., 2004. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 66, 2329–2336.
- Ohnaka, K., Numaguchi, K., Yamakawa, T., Inagami, T., 2000. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35, 68–75.
- Oury, T.D., Chang, L.Y., Marikund, S.L., Day, B.J., Crapo, J.D., 1994. Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab Invest* 70, 889–898.
- Oury, T.D., Day, B.J., Crapo, J.D., 1996. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 957–965.
- Patrick, L., 2006. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: exposure, evaluation, and treatment. *Altern. Med. Rev.* 11, 2–22.
- Pecanha, F.M., Wiggers, G.A., Briones, A.M., Pérez-Girón, J.V., Miguel, M., García-Redondo, A.B., Vassallo, D.V., Alonso, M.J., Saláez, M., 2010. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanooids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. *J. Physiol. Pharmacol.* 61, 29–36.
- Posser, T., de Aguiar, C.B., Garcez, R.C., Rossi, F.M., Oliveira, C.S., Trentin, A.G., Neto, V.M., Leal, R.R., 2007. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch. Toxicol.* 81, 407–414.
- Razani-Borojerdi, S., Edwards, B., Sopori, M.L., 1999. Lead stimulates lymphocyte proliferation through enhanced T cell-B cell interaction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 714–719.
- Rodríguez-Ilturbe, B., Vaziri, N.D., Herrera-Acosta, J., Johnson, R.J., 2004. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F606–F616.
- Sancho, P., Martín-Sanz, P., Fabregat, I., 2011. Reciprocal regulation of NADPH oxidases and the cyclooxygenase-2 pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1789–1798.
- Silveira, E.A., Siman, F.D., de Oliveira, F.T., Vescovi, M.V., Furieri, L.B., Lizardo, J.H., Stefanon, I., Padilha, A.S., Vassallo, D.V., 2014. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radic. Biol. Med.* 67, 366–376.
- Simões, M.R., Ribeiro Junior, R.F., Vescovi, M.V., de Jesus, H.C., Padilha, A.S., Stefanon, I., Vassallo, D.V., Saláez, M., Fioresi, M., 2011. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the renin-angiotensin system. *PLoS One* 6 (4), e18730.
- Stralin, P., Karlsson, K., Johansson, B.O., Marikund, S.L., 1995. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 2032–2036.
- Tibbles, L.A., Woodgett, J.R., 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1230–1254.
- Touyz, R.M., Briones, A.M., Sedek, M., Burger, D., Montezano, A.C., 2011. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol. Interv.* 11, 27–35.
- Vaziri, N.D., 2004. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 13, 93–99.
- Vaziri, N.D., Ding, Y., Ni, Z., Gonick, H.C., 1997. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effect of lazaroid therapy. *Kidney Int.* 52, 1042–1046.
- Vaziri, N.D., Liang, K., Ding, Y., 1999. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int.* 56, 1492–1498.
- Virdis, A., Bocca, A., Colucci, R., Duranti, E., Foma, M., Marenzani, G., Ippolito, C., Bernardini, N., Blandizzi, C., Bernini, G., Taddei, S., 2013. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension* 62, 337–344.
- Wang, H., Xi, S., Xu, Y., Wang, F., Zheng, Y., Li, B., Li, X., Zheng, Q., Sun, G., 2013. Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction. *Toxicol. In Vitro* 27, 1043–1048.
- Watts, S.W., Chai, S., Webb, R.C., 1995. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology* 99, 55–65.
- Weiler, E., Khalil-Manesh, F., Gonick, H.C., 1990. Effects of lead and a low-molecular-weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase. *Clin. Sci. (Lond.)* 79, 185–192.
- Weinhold, B., 2004. Environmental cardiology: getting to the heart of the matter. *Environ. Health Perspect.* 112, A880–A887.
- Wiggers, G.A., Pecanha, F.M., Briones, A.M., Pérez-Girón, J.V., Miguel, M., Vassallo, D.V., Cachofeiro, V., Alonso, M.J., Saláez, M., 2008. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H1033–H1043.
- Wong, S.L., Wong, W.T., Tian, X.Y., Lau, C.W., Huang, Y., 2010. Prostaglandins in action: indispensable roles of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contractions. *Adv. Pharmacol.* 60, 61–83.
- Yang, J., Yu, Y., Duerksen-Hughes, P.J., 2003. Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress. *Mutat. Res.* 543, 31–58.
- Zawadzki, M., Poreba, R., Gac, P., 2006. Mechanisms and toxic effects of lead on the cardiovascular system. *Med. Pr.* 57, 543–549.
- Zou, M.H., 2007. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 82 (1–4), 119–127.