

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Farmacologia**

**ÉLEN RIZZI SANCHEZ**

**“POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DAS METALOPROTEINASES  
NAS ALTERAÇÕES VASCULARES INDUZIDAS PELA  
EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CHUMBO”**

**RIBEIRÃO PRETO - SP**

**2006**

**ÉLEN RIZZI SANCHEZ**

**“POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DAS METALOPROTEINASES  
NAS ALTERAÇÕES VASCULARES INDUZIDAS PELA  
EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CHUMBO”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2006**

**Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Rizzi, ES

Alterações vasculares induzidas pela exposição crônica ao chumbo: possível participação das metaloproteinases / Élen Rizzi Sanchez; orientadora Profa Dra Raquel Fernanda Gerlach.

Ribeirão Preto, 2006,  
105 f; il 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach.

1. Chumbo, 2. Alterações vasculares, 3. Metaloproteinases, 4. Inibidor de metaloproteinases, 5. Alterações vasculares

## FOLHA DE APROVAÇÃO

ÉLEN RIZZI SANCHEZ

“Possível participação das metaloproteinases nas alterações vasculares induzidas pela exposição crônica ao chumbo”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Instituição: FMRP – USP      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Lusiane Maria Bendhack

Instituição: FMRP – USP      Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Instituição: IB – UNICAMP      Assinatura: \_\_\_\_\_

A DEUS que ilumina e guia meus caminhos;  
A meus pais, meus irmãos, meu companheiro Juliano e a todos meus amigos por  
todo amor e apoio de sempre e principalmente por me ensinarem o valor da  
persistência;

## **Agradecimentos**

Agradeço a DEUS por estar sempre presente em minha vida e ajudando a conquistar meus objetivos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach não somente pela orientação, oportunidades, paciência, respeito e compreensão, mas também pela amizade e dedicação. Dedico uma sincera admiração e agradeco por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos por acreditar em mim e com suas sábias palavras contribuir para meu crescimento profissional. Obrigada pela orientação e incentivo que foi e é fundamental para meu futuro.

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior pela paciência e dedicação a este projeto. Agradeço por todas as conversas e opiniões que contribuíram muito para meu crescimento científico e cultural.

A Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack e Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho pela atenção, dedicação, compreensão e disponibilidade em participar desta comissão julgadora, e principalmente pelos valiosos comentários desta dissertação.

A Profa Dra Maria Cristina O. Salgado por todos os valiosos comentários e discussões sobre este e futuros projetos. Agradeço pela compreensão e respeito de sempre.

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto P. Line pela atenção, compreensão e respeito.

A meus pais por sempre acreditarem em mim. Este trabalho não seria possível sem vocês. Obrigada pelo amor e dedicação que nunca precisei pedir e sempre desfrutei. Vocês são meu orgulho.

Ao meu amigo e companheiro pela paciência, amor, dedicação e compreensão que recebo dia-a-dia. Foi fundamental para mim que você fizesse de minha realização seu maior objetivo. Obrigada por me ajudar nesta etapa tão importante para mim.

Aos meus irmãos e suas famílias que me aconselham, escutam e me acolhem. Muito obrigada pela compreensão e por sempre acreditarem em mim. Eu amo todos vocês.

A minha amiga Michele por colaborar com este trabalho, mas principalmente por sua amizade e valiosos conselhos. Obrigada por todas vezes que fez de grandes problemas, simples soluções. Agradeço pela presença, compreensão, paciência e dedicação em todos os momentos.

A minha amiga Giselda por toda ternura, amizade, compreensão, preocupação e dedicação. Agradeço por todas as vezes que simples palavras me fizeram obter grandes vitórias.

Aos meus colegas de laboratório que fazem de meu ambiente de trabalho um lugar agradável e produtivo. Agradeço a vocês por todas as vezes que precisei e nunca, nunca mesmo, recebi um não como resposta de qualquer pessoa que seja, mesmo para aferir pressão de rato em plena sexta-feira, e à tarde. Gostaria de agradecer em especial, a **Caroline**, Juliana, Vânia, Valéria, Ingrid, Marcelo e Carlos pela prontidão e compreensão que dedicaram a mim durante este projeto.

Ao Dimitrius pela paciência, profissionalismo e dedicação. Agradeço sua seriedade e responsabilidade que nos renderam bons resultados e aprendizados.

A Sonia e a Fátima primeiramente pela amizade que guardo com muito carinho de duas pessoas tão maravilhosas que colaboram direta e indiretamente

para meu crescimento pessoal e profissional. Também agradeço pela competência e eficiência profissional, da qual admiro muito.

Ao Waldick pelo excelente apoio técnico, competência, eficiência profissional, amizade e compreensão.

Ao César e a Livia pela seriedade e dedicação da qual admiro e respeito muito.

Ao Tadeu pela amizade, prontidão e apoio técnico.

A Inês e a Eliana por todas as vezes que me ajudaram. Agradeço pela atenção e disponibilidade.

A todos do Departamento de Farmacologia, meus agradecimentos pelo apoio e amizade, em especial ao Michel por acreditar em mim desde o princípio.



*“Se não fôssemos capazes ou não desejássemos olhar em novas direções, se não tivéssemos dúvidas ou não soubéssemos reconhecer a nossa ignorância, nunca conseguiríamos ter idéias novas. Não haveria nada para verificar, pois já conheceríamos a verdade. Aquilo a que hoje chamamos de conhecimento científico é um corpo de afirmações com diversos graus de certeza. Algumas são muito incertas, outras são quase certas, mas nenhuma é absolutamente certa. Os cientistas estão habituados a isso. Sabemos que é consistente conseguir viver sem toda a verdade. Algumas pessoas perguntam: como é que você consegue viver sem saber? Não entendo o que querem dizer com isso. Sempre vivi sem saber. Isto é fácil. Como é possível saber o que quero saber.”*

*Richard P. Feynman*

# *RESUMO*

---

## RESUMO

A exposição crônica a baixos níveis de chumbo tem sido considerada um fator de risco para doenças cardiovasculares. Muitos estudos têm mostrado que o chumbo poderia promover alterações cardiovasculares pelo aumento de espécies reativas do oxigênio, diminuição do óxido nítrico e outras substâncias vasodilatadores e aumento de substâncias vasoconstrictoras como noradrenalina e endotelina. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular. Importante participação das MMP-2 e MMP-9 em várias doenças cardiovasculares e neoplásicas foi demonstrada. Recentemente foi descrita a possível participação da MMP-2 no processo de disfunção endotelial envolvendo a degradação de peptídeos vasodilatadores e um aumento na atividade de peptídeos vasoconstrictores. Assim sendo, nós investigamos a participação das MMPs em possíveis alterações vasculares induzida por tratamento crônico com chumbo (30ppm e 90ppm) em ratos Wistar. Somente o tratamento com 90ppm de chumbo (grupo Pb90) promoveu um aumento na pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos em relação à medida basal deste mesmo grupo ( $P < 0,005$ ). Além disso, foi observado um aumento na atividade da MMP-2 em aortas dos ratos do grupo Pb90 ( $P < 0,05$ ). Devido a este resultado, foi feito um novo estudo com 4 grupos de animais: (1) controle, (2) Pb90: Pb 90 ppm de chumbo, (3) D: tratados com doxíciclina e (4) D-Pb90: Pb90 co-tratados com doxíciclina. Novamente, o tratamento com 90ppm de chumbo induziu um aumento na PAS ( $P < 0,05$ ), sendo que o co-tratamento com doxíciclina impediu o aumento de pressão arterial induzido pelo chumbo (grupo D-Pb90,  $P < 0,001$ ). Em relação à reatividade vascular e à estrutura vascular da aorta dos ratos dos 4 grupos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Conjuntamente, podemos sugerir que o aumento na pressão arterial sistólica associada à exposição a baixa concentração de chumbo pode envolver a participação das metaloproteinases, porém não através de alterações vasculares.

# *ABSTRACT*

---

## **ABSTRACT**

Chronic exposure to low levels of lead has been considered a risk factor of cardiovascular disease. Many mechanisms are proposed as the cause of lead induced cardiovascular alterations, as increase of reactivity oxygen species and vasoconstrictor peptides, such noradrenaline, adrenaline and endothelin, besides of decrease of nitric oxide and others vasodilatatory mediators. Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes involved in the degradation of the extracellular matrix. It has been described that MMP-2 and MMP-9 may implicate in different pathological conditions, including cardiovascular and neoplastic diseases. Recent studies have shown that MMP-2 may be involved in the vascular dysfunction probably causing vasodilatatory peptide degradation and increase in the activity of vasoconstrictor peptides. In this regard, we investigated the participation of MMPs in lead chronic treatment (30 ppm or 90 ppm)-induced vascular alterations in Wistar rats. There was significant increase in the systolic blood pressure of rats treated with 90 ppm of lead when compared with the basal measurement. We found a significant increase of MMP-2 activity in aorta of rats treated with 90 ppm of lead. In this regard, it was assayed another treatment with four groups of rats: (1) control, (2) Pb90: 90 ppm of lead, (3) D: treated with doxycycline (inhibitor of MMPs) and (4) Pb90 co-treated with doxycycline. Thus, we have demonstrated that the treatment with Pb90 increased systolic blood pressure and the co-treatment with doxycycline impeded this increase of blood pressure associated with the lead exposure. The vascular reactivity and structure of aorta rats was determined to four groups study and nothing significantly difference was found with relation vascular reactivity and alterations of vascular structure between the four groups in study. In conclusion, our study shows that chronic lead exposure induced-hypertension may involved participation of MMPs, however is not associated with vascular alterations.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

### **FIGURAS:**

<b>Figura 1</b> - Desenho esquemático da ativação das metaloproteinases .....	29
<b>Figura 2</b> - Variações da pressão arterial sistólica de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo.....	59
<b>Figura 3</b> - Concentração de chumbo no sangue de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo.....	60
<b>Figura 4</b> - Gel de zimografia representativo da pró-MMP-2 e pró-MMP-9 e MMP-9 e MMP-2 no plasma de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo.	61
<b>Figura 5</b> - Análise densitométrica da enzima pró-MMP-9 e MMP-9 no plasma de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo .....	62
<b>Figura 6</b> - Análise densitométrica da enzima pró-MMP-2 e MMP-2 no plasma de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo .....	62
<b>Figura 7</b> - Gel de zimografia representativo das pró-MMP-2 e MMP-2 ativa e em extratos de aorta de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo..	64
<b>Figura 8</b> - Análise densitométrica da pró-MMP-2 em extratos de aorta de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo .....	65
<b>Figura 9</b> - Análise densitométrica da MMP-2 ativa em extratos de aorta de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo .....	66
<b>Figura 10</b> - Variações da pressão arterial sistólica de ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina .....	69
<b>Figura 11</b> - Concentração de chumbo no sangue e aorta de ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina.....	71

<b>Figura 12</b> - Relaxamento vascular produzido pela acetilcolina nos anéis de aorta de ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina .....	73
<b>Figura 13</b> - Relaxamento vascular produzido pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina .....	76
<b>Figura 14</b> - Valores da área da seção transversal (AST) de aortas de ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina.....	80
<b>Figura 15</b> - Imagens (2,5X) de aortas de ratos dos de aortas de ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina para determinação dos valores da área da seção transversal de aorta (AST).....	81

## **TABELAS:**

<b>Tabela 1</b> - Valores obtidos da análise densitométrica das bandas da pró-MMP-2 e pró-MMP-9 e MMP-9 e MMP-2 no plasma de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo.....	63
<b>Tabela 2</b> - Valores obtidos da análise densitométrica das bandas da pró-MMP-2 e MMP-2 ativa da aorta de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo .....	67
<b>Tabela 3</b> - Média e erro padrão da média dos valores de efeito máximo (Emax) e pD <sub>2</sub> das curvas de relaxamento concentração-dependente da acetilcolina nos anéis de aorta dos ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina .....	74
<b>Tabela 4</b> - Média e erro padrão da média dos valores de efeito máximo (Emax) e pD <sub>2</sub> da curva de relaxamento concentração-dependente do Nitroprussiato de sódio nos anéis de aorta dos ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina .....	77
<b>Tabela 5</b> – Morfometria de aorta dos ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina .....	79



## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ACh – Acetilcolina

AE – Área externa da seção

AI – Área interna da seção

AST – Área da seção transversal da aorta

AM – Adrenomedulina

APS – Persulfato de amônio

At – Área total da seção

Big-ET - Big endotelina

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DE – Diâmetro externo da seção de aorta

DI – Diâmetro interno da seção de aorta

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ECM - Matriz extracelular

EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético

Emax – Efeito máximo

eNOS - Sintase do óxido nítrico endotelial

EPM – Erro padrão da média

ET – Endotelina

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

HE – Hematoxilina e eosina

mg/Kg/dia - miligramas por quilograma por dia

mmHg – milímetros de mercúrio

MMP - Metaloproteinases de matriz extracelular

N – número de animais

NEM - Netilmaleimida

NO - Óxido nítrico

NPS - Nitroprussiato de sódio

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

pD2 – logarítmo negativo da EC<sub>50</sub>

PMSF - Fenilmetilsulfonilfluorida

ppm - Partes por milhão

RMDI - Razão entre a espessura da camada média e diâmetro interno do vaso

ROS - Espécies reativas do oxigênio

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TEMED - N,N,N',N'-tetrametilenediamina

TIMP - Inibidor tecidual de metaloproteinase

# *ÍNDICE*

---

## ÍNDICE

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	15
<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
1.1 - O chumbo como um contaminante ambiental importante .....	23
1.2 - Risco aumentado de doenças cardiovasculares .....	25
1.3 - Alterações cardiovasculares provocadas pelo chumbo .....	25
1.4 - Metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) .....	27
1.5 - Participação das MMPs em doenças cardiovasculares .....	29
1.6 - Participação das MMPs no processo de disfunção vascular e controle do tônus vascular.....	32
<b>2- HIPÓTESE .....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 - Animais e pré-tratamento com chumbo e inibidor de MMPs.....	38
4.2 - Materiais.....	39
4.2.1- Reagentes e soluções utilizadas nos experimentos.....	39
4.2.2 -Equipamentos utilizados nos experimentos .....	44
4.3 – Métodos.....	45
4.3.1- Determinação da pressão arterial sistólica e do peso corporal .....	45
4.3.2 - Obtenção das amostras dos animais .....	45
4.4 - Determinação das concentrações de chumbo no sangue total e na aorta.....	46
4.4.1 - Determinação das concentrações de chumbo no sangue.....	46

4.4.2 - Determinação das concentrações de chumbo na aorta .....	47
4.5 - Determinação da atividade das MMP-2 e MMP-9 no plasma e aorta .....	48
4.5.1 - Preparação das amostras .....	48
4.5.2 - Eletroforese de gel de poliacrilamida a 12% .....	50
4.5.3 - Determinação da atividade das metaloproteinases.....	51
4.6 - Avaliação da reatividade vascular a acetilcolina e nitroprussiato.....	51
4.7 - Análise da estrutura vascular de aortas .....	53
4.7.1 - Inclusão das aortas em parafina .....	53
4.7.2 - Preparação das lâminas.....	53
4.7.3 - Coloração das Lâminas.....	54
4.7.4 - Determinação da estrutura morfológica de aorta dos ratos.....	55
4.8 - Análise dos resultados .....	56
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
5.1 - Alterações na pressão arterial de ratos induzida pelo tratamento crônico de baixas doses de chumbo.....	58
5.2 - Avaliação da concentração de chumbo no sangue .....	60
5.3 - Atividade das metaloproteinases 2 e 9 no plasma e aorta de ratos tratados com chumbo .....	61
5.3.1 - Atividade das metaloproteinases 2 e 9 no plasma .....	61
5.3.2 - Atividade das metaloproteinases 2 e 9 na aorta .....	64
5.4 - Efeito da doxíciclina sobre o aumento da pressão arterial sistólica induzida pelo tratamento crônico com 90ppm de chumbo .....	68
5.5 - Avaliação da concentração de chumbo na aorta .....	70
5.6 - Efeito do tratamento crônico com 90ppm de chumbo na presença e ausência do tratamento crônico com doxíciclina sobre a reatividade vascular.....	72

5.7 - Avaliação de alterações morfológicas induzidas pelo tratamento crônico com 90ppm de chumbo e co-tratamento crônico com doxiciclina .....	78
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>90</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>

# *INTRODUÇÃO*

---

## 1-INTRODUÇÃO

### 1.1 - O chumbo como um contaminante ambiental importante:

O chumbo é o metal pesado mais abundante na crosta terrestre e provavelmente é um dos contaminantes mais antigos já estudados. Evidências de exposição a este elemento químico podem ser encontradas mesmo antes do Império Romano. Nesta época, era comum armazenar alimentos e bebidas, como o vinho, por exemplo, em potes que continham chumbo em sua composição [1].

Devido ao seu baixo ponto de fusão, ductabilidade e facilidade em formar ligas metálicas, o chumbo foi um dos primeiros metais a ser manipulado pelo homem para a fabricação de utensílios, armas e adornos. A partir do século XVIII o chumbo foi incorporado em processos industriais. Assim, um número maior de casos de exposição aguda ao chumbo ocorreu neste período. A exposição por este metal perdurou por muitos anos sem nenhum critério para regulamentar os níveis de exposição prejudiciais à saúde [2].

A exposição ao chumbo não se limita apenas às pessoas que trabalham com este metal, como por exemplo, em fábricas de baterias. A população em geral pode também estar exposta devido ao uso de utensílios cerâmicos, alimentos industrializados, água de beber (encanamentos contendo alta concentração de chumbo), uso de compostos que contém chumbo como: tintas de paredes e cosméticos, e pela deposição residual das fumaças das indústrias e veículos motorizados. Além disso, o chumbo, utilizado na gasolina como aditivo promoveu um considerável aumento na contaminação da população por este metal [2,3].

A introdução da gasolina livre de chumbo e sua diminuição nas tintas de parede pode ter sido fator que têm contribuído para a diminuição da sua



concentração no sangue de pessoas da população dos EUA de 1 a 74 anos de idade (de 12,8 para 2,8µg/dia de 1988 a 1991) [4].

Atualmente, a exposição ao chumbo de forma ambiental é geralmente bem controlada na maioria dos países industrializados. Entretanto, a exposição ocupacional ao chumbo ainda ocorre na maioria das indústrias que utilizam chumbo como material de fundição, em fábricas de bateria e em empresas de demolição [5,6].

A determinação do metal em sangue total é recomendada pelo CDC (Centro para Controle e Prevenção de Doenças) para diagnóstico de exposição ao chumbo. Níveis inferiores a 10 µg/dL são considerados normais de exposição ao chumbo [7]. Contudo, atualmente, dados na literatura indicam que exposição a baixas concentrações de chumbo, resultando em concentrações no sangue inferiores a 10 µg/dL, podem promover disfunção cognitiva e neurocomportamentais, além de danos no sistema nervoso central, hipertensão e dano renal [1].

A cinética deste metal contribui para sua permanência no organismo por vários anos após a exposição. Quando este metal alcança a corrente sanguínea, tende a se direcionar aos “tecidos moles” (fígado, rins, cérebro, pulmões, músculos, coração) e, após algumas semanas, a maior parte se deposita nos “tecidos duros” (dentes e ossos), podendo permanecer no organismo entre 10 e 40 anos [8].

Os efeitos tóxicos de exposição ao chumbo inorgânico envolvem vários órgãos e atividades bioquímicas. Vários estudos mostraram que o principal alvo toxicológico do chumbo, tanto em crianças quanto em adultos, é o sistema nervoso central [9-12]. Neste sentido, a longa exposição ao metal pelas crianças pode causar uma série de disfunções neurológicas, incluindo a redução da capacidade intelectual [9,13,14]. Em adultos expostos de forma ocupacional têm sido observadas

alterações neurocomportamentais, além de redução na velocidade de condução nervosa em adultos [15]. Entretanto, outras alterações também associadas à toxicidade do chumbo incluem: redução do crescimento, redução da síntese de hemoglobina, encefalopatia e nefropatia, além de alterações cardiovasculares [13]; [12,14].

### **1.2 - Risco aumentado de doenças cardiovasculares:**

Exposição crônica a baixas concentrações de chumbo tem sido relacionada a sérios problemas de distúrbios nas funções de contratilidade e ritmicidade do coração [16,17]. A exposição ao chumbo pode estar associada a um aumento na morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares em áreas contaminadas com este metal [18-20]. Além disso, exposição crônica a baixos níveis de chumbo pode promover hipertensão tanto em humanos [19,21-23], como em animais [24-26] .

Contudo, a literatura apresenta dados conflitantes sobre as possíveis alterações fisiopatológicas induzidas por este metal no sistema cardiovascular. Assim, é necessário ressaltar que ainda são poucos os estudos mostrando os mecanismos envolvidos nas alterações no sistema cardiovascular após a exposição a este metal.

### **1.3 - Alterações cardiovasculares provocadas pelo chumbo:**

Alguns estudos têm mostrado uma provável inibição da enzima sódio potássio ATPase [27], aumento na concentração de adrenalina e noradrenalina, diminuição na responsividade de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos [24,25], e também alterações na atividade da proteína quinase C [28-30]. Além disso, outros estudos mostraram que o chumbo pode promover ativação do sistema renina-angiotensina, aumentando

renina e a enzima conversora de angiotensina (ECA) [31]. Isso poderia levar a alterações no sistema das cininas, como uma diminuição de bradicinina no plasma, proporcionando um aumento na contração da musculatura vascular lisa [32].

Khalil-Manesh e colaboradores sugeriram que a elevação da pressão arterial induzida pelo chumbo possa estar relacionada com um aumento de vasoconstrictores como endotelina-3 associada com uma diminuição do nucleotídeo cíclico responsável por efeitos vasodilatadores, guanosina monofosfato cíclica (GMPc) [33]. Além disso, outros estudos também descreveram uma diminuição na concentração de óxido nítrico (NO) em ratos tratados com chumbo [34]. Neste mesmo estudo, Vaziri e colaboradores relataram que um aumento da pressão sanguínea induzida por tratamento crônico com chumbo está relacionado a um aumento no plasma de espécies reativas de oxigênio (ROS) [34]. Em estudos posteriores foi observado que a adição de chumbo, em cultura de células endoteliais aórticas e coronarianas promoveu formação de radicais hidroxila contribuindo assim para a inativação do NO produzido pela enzima sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS). [35,36].

Além destes efeitos, vários estudos foram realizados na tentativa de investigar possíveis alterações na reatividade vascular induzidas por chumbo. Contudo, os resultados observados são muito conflitantes. Por exemplo, há evidências de que ratos tratados por um período crônico com chumbo apresentam um aumento na resposta vasoconstrictora em relação ao seu grupo controle [37,38].

Em outros estudos, não foram observadas diferenças nas respostas vasoconstrictoras entre os animais que receberam tratamento com chumbo e o grupo controle [39,40]. Além disso, Purdy e colaboradores investigaram os efeitos do tratamento crônico com chumbo em ratos em relação a drogas vasodilatadoras.

Neste estudo, nenhuma diferença foi observada na resposta vasodilatadora dependente ou independente do endotélio entre os ratos tratados com o chumbo e seus respectivos controles [39]. Entretanto, em outros dois trabalhos, os autores mostraram que ratos tratados com chumbo apresentam uma resposta vasodilatadora dependente de endotélio menor quando comparada a um grupo controle [40,41].

Shelkovnikov e colaboradores investigaram os efeitos de várias concentrações de chumbo adicionado diretamente a banhos para órgãos isolados. Os resultados obtidos sugerem que o chumbo não promove alterações na contração induzida por noradrenalina ou no relaxamento induzido por acetilcolina [42].

Assim sendo, uma possível explicação para os resultados conflitantes destes estudos poderia ser o tempo de tratamento que variou de semanas a meses ou a dose de chumbo administrada nestes experimentos, que variou de 5 a 100 ppm de chumbo.

#### **1.4 - Metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs):**

Metaloproteinases da matriz extracelular são endopeptidases cálcio-dependente, contendo zinco, expressas em várias células e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias [43]. A família das MMPs apresenta mais de 20 enzimas as quais são responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular, incluindo componentes da membrana basal, colágeno, fibronectina e proteoglicanos [43]. As metaloproteinases apresentam alguns domínios estruturais semelhantes. Diferentes metaloproteinases são produzidas por diferentes tipos celulares [44] e se diferem em relação a especificidade de substratos. São classificadas em: (1) Colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), (2) Gelatinases (MMP-2 ou

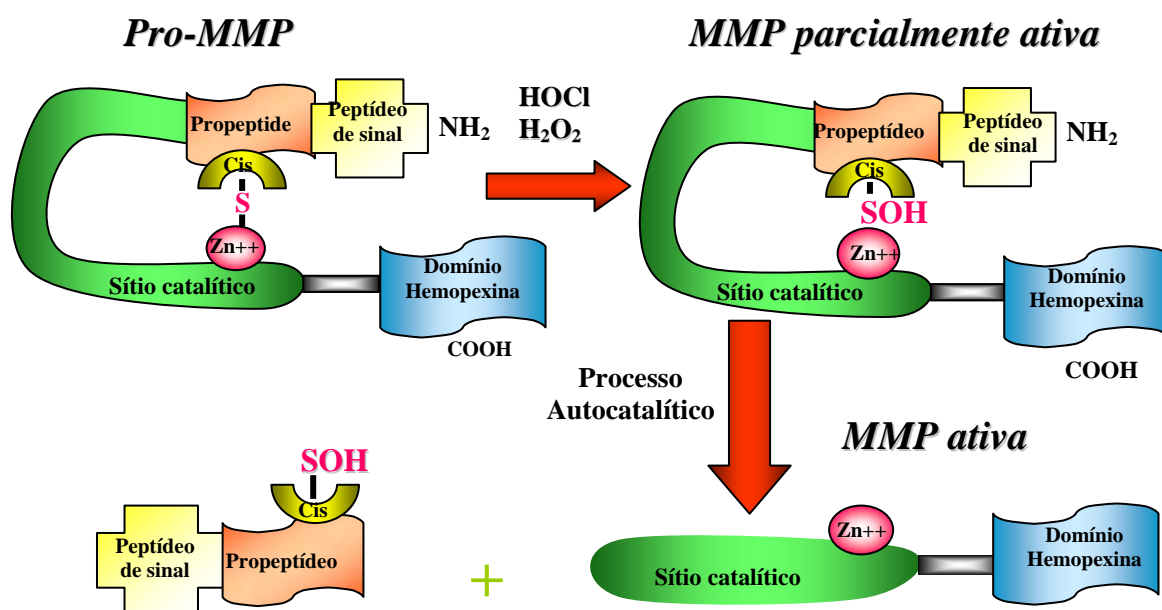
Gelatinase A e MMP-9 ou Gelatinase B), (3) Estromelisinases (Estromelisina 1 ou MMP-3 e Estromelisina 2 ou MMP-10), (4) Matrilisinases ( Matrilisina 1 ou MMP-7 e Matrilisina 2 ou MMP-26), (5) MMPs de membranas (MT1-MMP(MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP (MMP-25)) e (6) Outras MMPs (MMP-12, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28) que não se enquadram nesses grupos principais [45,46].

Estas endopeptidases são sintetizadas e secretadas como pró-forma latente (zimogênios ou pró-MMPs). Podem ser reguladas por mecanismos de transcrição ou mecanismos pós-tradução. A regulação na transcrição acontece por vários fatores incluindo fatores de crescimento, hormônios e citocinas [45,47]. Com relação aos mecanismos de pós-tradução, a pró-forma da enzima, latente na matriz extracelular dos tecidos, pode ser ativada por fatores como estresse de cisalhamento tensão mecânica e estresse oxidativo (figura 1); o propeptídeo também é removido resultando na ativação da MMP, por outras proteases da matriz, como por exemplo, a trombina e plasmina [45,48]. O controle da atividade das MMPs nos tecidos também pode ser mediado por inibidores teciduais de metaloproteínases (TIMPs), dos quais TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 têm sido descritos [45].

Uma vez em sua forma ativa, as MMPs participam do processo fisiológico de remodelamento da matriz extracelular (ECM) através da degradação de proteínas em suas ligações peptídicas específicas, sendo este um de seus principais efeitos biológicos [46].

Estudos têm mostrado que atividade excessiva ou desequilibrada de MMPs está associada à patogênese de várias doenças como doenças neoplásicas[49], doenças inflamatórias crônicas [50]; e doenças cardiovasculares [51-53]. Estudos têm mostrado participação relevante das MMPs na hipertensão e insuficiência

cardíaca [54], sugerindo que MMPs podem estar envolvidas no processo de remodelamento cardiovascular [51].



**Figura 1.** Ativação das MMPs. As MMPs são secretadas como zimógenos inativos que precisam ser processados para tornarem-se ativos. O sítio catalítico contém o zinco que é ligado à cisteína na região do propeptídeo. Esta conformação é requerida para que a enzima continue inativa. Por exemplo, sob condições de stress oxidativo alguns oxidantes, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), podem interagir com a enzima e então modificar o resíduo tiol. Tais modificações clivam a ligação do zinco no sítio catalítico com o domínio do propeptídeo, expondo este sítio catalítico da enzima levando a ativação da enzima [48].

### 1.5 - Participação das MMPs em doenças cardiovasculares:

O remodelamento vascular pode ocorrer como uma resposta adaptativa à elevação da pressão arterial, com objetivo de normalizar a tensão exercida na parede dos vasos. Neste processo de remodelamento pode ocorrer hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa vascular [55-57]. No caso de hipertensão arterial,

podemos caracterizar o remodelamento dos vasos sanguíneos por um espessamento da camada média (remodelamento hipertrófico), principalmente nos vasos de grande calibre, redução no lúmen e alterações na matriz extracelular [55,58], levando a um aumento da relação entre o diâmetro da parede vascular e lúmen do vaso (RMDI). Este aumento pode ser explicado por alteração no tamanho ou número das células da musculatura vascular lisa, levando a um espessamento da camada média [55,59].

Estas alterações nos vasos sanguíneos estão relacionadas com disfunção endotelial, evidenciada por uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio [60,61], com aumento de substâncias vasoativas como a angiotensina II [62] e MMPs [55,63].

Dentre as metaloproteinases, especificamente a MMP-2 e a MMP-9 possuem importante função em muitos processos fisiológicos. Um aumento na expressão e atividade destas enzimas foi observado em várias doenças incluindo doenças cardiovasculares [52,64,65] e neoplásicas [49]. Johnson e Galis mostraram em modelo experimental de deficiência destas MMPs, que tanto MMP-2 como MMP-9 participam do processo de espessamento da neo-íntima e migração das células musculares lisas [66]. Outros estudos sugerem que as MMPs, principalmente as MMP-2, estão envolvidas no remodelamento vascular associado a doenças vasculares por promoverem tanto a degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular, como por acentuar a migração de células musculares lisas [67,68].

Desta maneira, estas metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) parecem exercer um papel importante na hipertensão. Além disso, há estudos demonstrando um aumento das concentrações plasmáticas tanto de MMP-2 como de MMP-9 em pacientes com hipertensão sistólica isolada quando comparados com os controles

[69], e também um aumento da atividade de MMPs-2 e MMPs-9 em rins fibróticos de ratos espontaneamente hipertensos em relação aos seus controles normotensos [70,71].

A metaloproteinase-9 apresenta uma massa molecular de 92 kDa em sua forma latente e 82 kDa em sua forma ativa [72] e está presente em macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células mesangiais, células endoteliais e células da musculatura lisa vascular [73]. Há evidências que haja grande expressão da MMP-9 em regiões de placas ateroscleróticas e vários estudos sugerem que a MMP-9 pode ser um biomarcador de doenças cardiovasculares [64,65,74] e de doenças neoplásicas [49,75].

Vários estudos têm mostrado que a hipertensão pode promover um aumento na atividade da MMP-9 [55,69,76] e parece que este aumento possui importante participação no remodelamento vascular [55,69].

Já em relação à MMP-2, esta se caracteriza em sua forma latente por uma massa molecular de 72 kDa e é encontrada na musculatura vascular lisa, endotélio e glomérulos [77]. Vários estudos sugerem que a MMP-2 está envolvida no remodelamento vascular associado a doenças vasculares por promover tanto a degradação das proteínas da matriz extracelular, como por acentuar a migração de células musculares lisas [67,68,78]. Além disso, Bouvet e colaboradores mostraram que a MMP-2 pode estar envolvida em processos de hipertensão, pois ao induzir um processo de hipertensão pela administração crônica de L-NAME a ratos, ocorreu aumento da quantidade e da atividade de MMP-2 em artérias de grande calibre [56].

Além disso, alguns estudos têm mostrado que a MMP-2 também pode estar envolvida no processo de disfunção vascular por promover um aumento da ação de



peptídeos vasoconstrictores [79] ou diminuir a ação de peptídeos vasodilatadores [80,81].

### **1.6 - Participação das MMPs no processo de disfunção vascular e controle do tônus vascular**

Alguns trabalhos têm demonstrado que esta enzima poderia aumentar a ação de peptídeos vasoativos constrictores como endotelina ou diminuir a ação vasodilatadora de outros peptídeos vasoativos tais como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a adrenomedulina. [79-81].

Assim sendo, Fernandez Patron e colaboradores demonstraram que a MMP-2 vacular pode clivar “Big endotelina - 1” [Big-ET - 1 (1-38)], em endotelina-1 [ET-1 (1-32)] que consiste num vasoconstritor mais potente do que a endotelina [79]. Em 2000, estes mesmos autores também mostraram que esta mesma enzima foi capaz de clivar o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que consiste num potente peptídeo de ação vasodilatadora, em peptídeos com ações vasodiladoras menos potentes [80]. Já no ano de 2004, Martinez e colaboradores mostraram que a MMP-2 teria a capacidade de clivar a adrenomedulina (peptídeo vasodilatador) em outros peptídeos com ação menos vasodilatadora ou vasoconstrictora (AM 11-22) [81].

*HIPÓTESE*

---

## **1- HIPÓTESE**

A hipótese deste trabalho é de que a exposição a baixas doses de chumbo pode causar aumento de pressão arterial e outras alterações cardiovasculares através de mecanismos que envolvam a participação de metaloproteinases da matriz extracelular.

## *OBJETIVOS*

---

## 2- OBJETIVOS

3.1 - Verificar se exposição crônica a baixas doses de chumbo promove aumento na pressão arterial;

3.2 - Avaliar se a exposição a baixas doses de chumbo afeta a atividade das metaloproteinases dos tipos 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) no plasma e na aorta de ratos;

3.3 - Verificar se o co-tratamento com inibidor de metaloproteinases (doxíciclina) atenua o aumento de pressão arterial sistólica de ratos associado à exposição a baixas doses de chumbo;

3.4 - Verificar se o co-tratamento com inibidor de metaloproteinases (doxíciclina) afeta possíveis alterações de reatividade vascular de ratos associadas à exposição a baixas doses de chumbo;

3.5 - Verificar se o co-tratamento com inibidor de metaloproteinases (doxíciclina) afeta possíveis alterações histológicas vasculares associadas à exposição a baixas doses de chumbo.

# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 4-Materiais e métodos

### 4.1 - Animais e pré-tratamento com chumbo e inibidor de MMPs:

Para realização deste estudo foram utilizados ratos machos Wistar, com peso de aproximadamente 250 gramas, obtidos do biotério central da Universidade de São Paulo (Campus de Ribeirão Preto), e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP em uma sala com ciclos claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada (22-25 °C) e livre acesso à ração.

O estudo foi realizado em dois protocolos. No primeiro protocolo os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais: **(1) grupo controle** [ratos tratados com acetato de sódio (0,6 g/L)] na água de beber, **(2) grupo Pb30** [ratos tratados com acetato de chumbo na água de beber (0,05g/L ou 30ppm de chumbo)] e **(3) grupo Pb90** [ratos tratados acetato de chumbo na água de beber (0,15 g/L ou 90ppm de chumbo)], por um período de dois meses. No segundo protocolo os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais: **(1) grupo controle** (ratos tratados com acetato de sódio (0,6 g/L)) na água de beber e água (1mL/dia) por gavagem), **(2) grupo Pb90** (ratos tratados acetato de chumbo na água de beber (0,15 g/L ou 90 ppm de chumbo) e água (1 mL/dia) por gavagem), **(3) grupo D** (ratos tratados acetato de sódio na água de beber (0,6 g/L) e com doxiciclina (inibidor inespecífico de metaloproteinases, 30 mg/Kg/dia) por gavagem) e **(4) grupo D-Pb90** (ratos tratados acetato de chumbo na água de beber (0,15g/L ou 90 ppm de chumbo) e com doxiciclina (30 mg/Kg/dia) por gavagem). Neste segundo protocolo os tratamentos dos grupos de animais foram realizados durante um período de dois meses.

## **4.2- Materiais:**

### **4.2.1- Reagentes e soluções utilizadas nos experimentos:**

#### **A - Reagentes:**

Aceticolina, fenilefrina, nitroprussiato de sódio, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, EDTA, HCl, NaOH, eosina, floxina éter etílico, xilol, paraformaldeído, glicina, gelatina, TEMED, ácido pícrico “ e etanol 92,8° foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Acetato de chumbo, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anidro), ácido nítrico, HNO<sub>3</sub>, agarose, parafina e Triton X-100 foram comprados da Merck S.A. (São Paulo, SP, Brasil). O ácido acético Glacial, acrilamida e metanol foram adquiridos da VETEC (São Paulo, SP, Brasil). Azul de bromofenol e o coomassie Blue G-250 foram comprados da USB corporation (Cleveland, Ohio, USA). O acetato de sódio foi adquirido da J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA). A doxiciclina foi adquirida da farmácia de manipulação Relva (Ribeirão Preto, SP, Brasil). O APS, Tris Base, Fenantrolina, PMSF, NEM e bisacrilamida foram adquiridos da Amersham GE (Uppsala, Suécia). O Padrão interno Soro fetal bovino foi adquirido da Invitrogen, São Paulo, SP, (Brasil)

#### **B - Soluções:**

##### **B.1- Preparação das soluções para tratamento dos animais:**

###### B.1.1 - Tratamento com Chumbo:

- Acetato de chumbo: 0,05 g (30 ppm de chumbo) ou 0,15 g (90 ppm de chumbo);
- Ácido acético: 0,5 mL;
- Água destilada q.s.p 1000 mL.



**B.1.2 - Tratamento do grupo controle:**

- Acetato de Sódio: 0,6g;
- Ácido acético: 0,5 mL;
- Água q.s.p 1000 mL.

**B.1.3 - Tratamento com doxiciclina:**

- Doxiciclina: 30 mg/Kg de rato;
- Água destilada: 0,5 mL por rato.

**B.2 - Determinação da concentração de chumbo no sangue e aorta:**

- Ácido Nítrico 0,5 % v/v: destilado em temperatura inferior à de ebulição, utilizando destilador de quartzo Küner Analysentechnik para eliminação de impurezas;
- Soluções de referência para curva de calibração: Chumbo (acetato de chumbo) 0-200 µg/L precipitadas em ácido nítrico 0,5 % v/v + 0,5 % v/v Triton X-100.

Obs.: Todas as operações para o preparo das soluções de referencia de chumbo foram realizadas em sala limpa classe 10000, pertencente ao centro de Energia Nuclear na Agricultura –USP (CENA-Piracicaba/SP)

**B.3. Zimografia e eletroforese para MMPs pelo sistema SDS-PAGE**

**B.3.1 - Solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%:** Acrilamida (30 g), bisacrilamida: (0,8 g) e água destilada q.s.p 100 mL. (6% no gel de largada e 12% no gel de corrida)

B.3.2 - Tampão do Gel de Separação 4 x Tris HCl/ SDS - pH 8,8: Tris Base: 91 g em 300 ml de água destilada, HCl 1 N para ajustar pH para 8,8, água destilada q.s.p 500 mL e SDS: 2 g.

B.3.3 - Tampão do Gel de Largada 4 x Tris HCl/SDS – pH 6,8: Tris Base: 6,05 g em 40 mL de água destilada, HCl 1 N para ajustar o pH 6,8, água destilada q.s.p 100 mL e SDS : 0,66 g.

B.3.4 - Persulfato de Amônio (APS) 10%: APS: 1,0 g e Água destilada q.s.p 10 mL.

B.3.5 - Gelatina 40 mg/ml (w/v): Gelatina: 1,0 g e água destilada: 20 mL.

B.3.6 - Tampão de Corrida 5x : Tris Base: 15,1 g, Glicina: 72,0 g, SDS: 5,0 g, água destilada q.s.p 1000 mL (Diluído 1x quando usado).

B.3.7 - Solução Renaturante Triton X-100 a 2 % (v/v): Triton X-100 10 mL em água quente e água destilada q.s.p. 500 mL.

B.3.8 - Tris.HCl 1 M – pH 7,4: Trizma Base (Tris): 121 g, HCl 1 N para pH para 7,4.

B.3.9 - Tampão Tris a 50 mM com CaCl<sub>2</sub> a 10 mM – pH 7,4: Tris.HCl 1 M pH 7,4: 50 mL em água destilada q.s.p 1000 mL e CaCl<sub>2</sub>. 6 H<sub>2</sub>O: 2,2g.

B.3.10 - Corante Coomassie Blue: Metanol 30 %, Ácido acético 5%, Coomassie Blue G-250 0,05%.

B.3.11 - Descorante: Metanol 30 %, Ácido acético 10 %.

B.3.12 - Tampão de Amostra Não Redutor 2 X: Tris HCl/SDS (4x) - pH 6,8: 25,0 mL, Glicerol: 20,0 mL, SDS: 4 g, azul de bromofenol: 1,0 mg (dentro do dessecador) e água destilada q.sp. 100 mL.

B.3.13 - Solução de encolhimento: Metanol 50%, Glicerol 5 %.

B.3.14 - Tampão de extração:  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tris 20 mM pH 7.4, Fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM.

## **B.5 - Reatividade vascular:**

Solução de Krebs: em mM: NaCl 130,  $\text{CaCl}_2$  1.6,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2, KCl 4.7,  $\text{NaHCO}_3$  14.9,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  5.5).

## **B.6 - Histologia:**

### B.6.1 - Tampão Fosfato 0,2 M pH 7,4:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 5,52 g;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro: 22,72 g;
- Água destilada q.s.p 1000 mL.

### B.6.2 - Paraformaldeído 4 % tamponado com paraformaldeído pH 7,4:

- Solução estoque paraformaldeído 8 % em água destilada;
- NaOH 10 N: 1gota para cada 100 mL.

B.6.3-Hematoxilina de Harris:

- Hematoxilina: 2 g em 20 mL de álcool absoluto;
- Alúmen de Potássio: 20 g em 400 mL de água destilada;
- Óxido de Mercúrio: 1g.

B.6.4 - Eosina-Floxina

- Eosina: 1% em água destilada (50 mL);
- Floxina: 1% em água destilada (5 mL);
- Álcool 95%: 390 mL;
- Ácido acético Glacial: 2 mL.

**4.2.2 - Equipamentos utilizados nos experimentos:**

- Aparelho de aferir pressão arterial de cauda (montagem manual)
- Centrífuga (CELM - 3 plus);
- Banho Maria (Nova Ética);
- Estufa (Soc. FABBE Ltda);
- Fonte de eletroforese (Eletroforesis Power Supply-EPS 301);
- Sistema de fotodocumentação (Kodak EDAS 200);
- Transdutor de tensão isométrica (Letica);
- Balança de precisão (Shimadzu AY220);
- pHmetro (incibrás);
- Transdutor COBE;
- Amplificador GP4A;
- Microtomo (Leica RM2025);
- Microscópio (Leica DMLB);
- Espectrômetro de absorção atômica (Varian modelo SpectrAA 220 com forno de grafite e plataforma integrada com aquecimento transversal (THGA);
- Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Microondas AntonPaar PMD (Graz, Austria);
- Destilador (Fisatron).

### **4.3 - Métodos:**

#### **4.3.1 - Determinação da pressão arterial sistólica e do peso corporal:**

O peso dos animais e a pressão arterial de cauda foram determinados uma vez por semana, durante os dois meses de tratamento à exposição ao chumbo e co-tratamento com doxiciclina. Os animais foram pesados em uma balança para pequenos animais. O método utilizado para aferir pressão arterial sistólica dos ratos foi por esfigmomanômetro de cauda. Este método consiste no uso de um esfigmomanômetro colocado em torno da cauda do animal conectado a um sensor. O animal é colocado em um gabinete à temperatura de 37 °C dentro de uma caixa de acrílico contendo um esfigmomanômetro que será envolvido na cauda do rato. O animal permanece neste local por 10-15 minutos em estado de vigília para se acostumar com ao ambiente evitando que o estresse induzido por ele não interfira na pressão arterial. A temperatura é necessária para promover um certo aquecimento do animal, levando a uma dilatação da artéria caudal. Após este período, o esfigmomanômetro é inflado, promovendo a compressão da artéria caudal do animal e possibilitando a medida de pressão realizada pelo aparelho. São aferidas três mediadas sucessivas para cada animal.

#### **4.3.2 - Obtenção das amostras dos animais:**

Após o período de dois meses de tratamento os animais foram decapitados e 1mL de sangue foram recolhidos em tubos Vacutainer (BD System) livres de metal para análise da concentração de chumbo no sangue total. Outros 4mL de sangue foram coletados em tubos Falcon contendo EDTA 0,5 M pH 7,4 (1:10) e centrifugados por 5 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Estas amostras

foram aliquotadas em tubos Eppendorf para determinação da atividade das metaloproteinases. Também foram retiradas aortas dos animais para estudo de reatividade vascular, além de armazenar 0,08 g deste tecido em tubos Eppendorf e 0,08 g em tubos Vacutainer (BD System) para determinação da atividade das metaloproteinases e concentrações de chumbo, respectivamente. Os tecidos utilizados, para posteriores análises, foram armazenados em seus respectivos tubos devidamente etiquetados a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  para determinação de metaloproteinases e  $-20^{\circ}\text{C}$  para determinação das concentrações de chumbo no sangue.

Para análises morfológicas de aortas dos ratos do estudo, a aorta torácica de cada animal foi removida, lavada com solução de Krebs, e dissecada de seus tecidos conjuntivos e gordura e imediatamente imerso em tubo eppendorf contendo solução de paraformaldeído 4% pH 7,4, durante 24 horas. Após este período o tecido foi retirado do paraformaldeído 4% pH 7,4 e embebido em solução de álcool 70 % v/v e armazenado em temperatura ambiente.

#### **4.4 - Determinação das concentrações de chumbo no sangue total e aorta:**

Todas estas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

##### **4.4.1 - Determinação das concentrações de chumbo no sangue:**

Para a determinação de chumbo em sangue total foi utilizado o método proposto por Zhou e colaboradores [82]. Para tal, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica marca Varian modelo SpectrAA 220 com forno de grafite. Todas

as medidas foram realizadas em 283.3 nm, usando lâmpadas de descarga sem eletrodo de chumbo, sistema EDL II, da Varian como fonte de radiação e monocromador com fenda para 0,7nm. As medidas foram realizadas sempre em área de pico.

Resumidamente, 100 µL de cada amostra de sangue total foram diluídas na proporção de 1:10 em uma solução contendo 0,2 % v/v HNO<sub>3</sub> 0,5 % de Triton X-100. Desta mistura resultante, foram retirados 12 µL e injetados diretamente no forno de grafite, com tubo de grafite cuja plataforma previamente revestida com tungstênio e ródio (W-Rh). A calibração foi realizada utilizando soluções de referência de chumbo (acetato de chumbo) de zero a 200 µg/L precipitadas em ácido nítrico 0,2% v/v. O limite de detecção do método foi 0,07 µg/L.

#### **4.4.2 - Determinação das concentrações de chumbo na aorta:**

Para a determinação de chumbo em aorta foi utilizado o método proposto por Lima e colaboradores [83]. Para isso, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica marca Varian modelo SpectrAA 220 com forno de grafite. Todas as medidas foram realizadas em 283.3 nm, usando lâmpadas de descarga sem eletrodo de chumbo, sistema EDL II, da Varian como fonte de radiação e monocromador com fenda para 0,7nm. As medidas foram realizadas sempre em área de pico.

Conforme método proposto por Lima e colaboradores, para a digestão, pesamos as aortas, acrescentamos ácido nítrico (1% v/v) e colocamos em bombas de digestão do aparelho de microondas AntonPaar PMD (Graz, Austria). Ao final da digestão, as amostras foram diluídas em água milli-Q para completar volume de 25 mL.

Desta solução resultante foram retirados 12 µL que foram injetados diretamente no forno de grafite, com tubo de grafite cuja plataforma previamente



revestida com tungstênio e ródio (W-Rh). A calibração foi realizada utilizando soluções de referência de chumbo (acetato de chumbo) de zero a 200 µg/L precipitadas em ácido nítrico 1% v/v. O limite de detecção do método foi 0,07 µg/L.

#### **4.5 - Determinação da atividade das MMP-2 e MMP-9 no plasma e na aorta:**

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

##### **4.5.1 - Preparação das amostras:**

###### **Plasma:**

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

###### **Aorta:**

As amostras de aorta foram pesadas e para cada 0,08g de tecido, colocadas em tubo Eppendorf, foram acrescentados 150µL do tampão de extração (CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris 20 mM pH 7.4, Fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM). As amostras foram trituradas com o uso do politron. Foram acrescentados mais 150 µL do tampão de extração ao término da trituração e esta suspensão foi colocada no vortex para homogeneizar. Estas amostras foram colocadas no gelo, dentro da geladeira por no mínimo 16 horas para ocorrer o processo de extração das proteínas do tecido.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado e armazenado em dois tubos eppendorf devidamente rotulados no freezer a - 20 °C. Um destes tubos foi utilizado para dosagem de proteínas pelo método de Lowry e o outro tubo foi utilizado para determinar a atividade das metaloproteinases.

#### DOSAGEM DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY

Como a quantidade de proteínas, presente na aorta dos ratos, varia entre um animal e outro, e isto pode interferir nos resultados da atividade das metaloproteinases, foi necessária a determinação da quantidade de proteínas de todas as amostras. Assim sendo, a quantidade de cada amostra aplicada no gel foi referente a 40 µg de proteína.

A dosagem de proteínas totais foi feita baseada no método de Lowry e colaboradores (1951) [84]. Assim sendo, antes da dosagem das proteínas as amostras foram diluídas em água MILLI-Q para que as concentrações de proteínas presentes nas amostras ficassem dentro dos pontos da curva de calibração (intervalo de 0,125 – 4 mg de proteínas). Para a construção da curva de calibração foi utilizada a soro albumina bovina (BSA) com concentração de proteína conhecida de 3 mg/mL (diluído em água MILLI-Q e solução tampão de extração (1:2:1)) e um padrão BSA de 8 mg/mL (diluído em água MILLI-Q e tampão de extração (1:0,5:0,5)). Através do BSA de 8 mg/mL foram feitas as seguintes soluções: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg/mL, sendo estas soluções os pontos da curva de calibração.

Em microplacas foram aplicadas: 20µL de solução NaOH 1 N/ Triton 0,02 %; 10µL das amostras e as soluções para a curva de calibração. Além disso, também foram aplicadas 200 µL de solução de tartarato e 20 µL da solução de Folin. Estas

soluções foram misturadas com auxílio de uma pipeta e após 30 minutos foram lidas em um espectrofotômetro a 750 nm. Pela obtenção dos valores fornecidos pelo aparelho foi construída uma curva de calibração possibilitando a determinação das quantidades de proteínas presentes nas amostras e assim foi possível aplicar 40 mg de proteínas de cada amostra no gel.

#### **4.5.2 - Eletroforese de gel de poliacrilamida a 12%:**

As amostras preparadas foram separadas por eletroforese em um sistema descontínuo de tampões, conforme a técnica de SDS-PAGE, em géis preparados em concentração de 12 % de poliacrilamida e contendo 1 % gelatina.

Após a corrida, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 (a 2,5 % em água) para remover o SDS e, em seguida, permaneceram submersos durante 16 horas em solução de Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4, contendo  $\text{CaCl}_2$  a 10 mM, à temperatura de 37 °C. Em seguida, os géis foram fixados e corados com solução de Coomassie Blue (metanol 30 %, ácido acético 5%, Coomassie Blue G-250 0,05%) por 4 horas, sendo em seguida descorados até a visualização das bandas características da atividade de MMPs: bandas claras contra um fundo azul escuro (devido à coloração da gelatina incorporada ao gel preparado).

#### **4.5.3 - Determinação da atividade das metaloproteinases:**

A determinação da atividade foi feita através do perfil das bandas que puderam ser visualizadas após coloração com Cromassie Blue.

A atividade das enzimas foi determinada por análise densitométrica usando um sistema de documentação Kodak Eletrophoresis Documentation and Analysis System- EDAS 290; Kodak, Rochester, NY). As formas latente e ativa das MMP-2 e MMP-9 foram identificadas através de suas massas moleculares 72 KDa, 68 KDa, 92 KDa e 87 KDa; respectivamente.

#### **4.6 - Avaliação da reatividade vascular a acetilcolina e nitroprussiato:**

Cinco ratos de cada grupo foram sacrificados por decapitação. A aorta torácica de cada animal foi removida, lavada com solução de Krebs, e dissecada de seus tecidos conjuntivos e gordura. Dois anéis de 4 mm de comprimento foram cortados da parte proximal de cada aorta. Em seguida, dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen de cada anel e colocados em cubas para órgãos isolados com volume de 10 mL contendo solução de Krebs, em uma temperatura de 37 °C e pH 7,4, sob aeração constante com mistura carbogênica (95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>). Uma das extremidades do gancho metálico foi conectada a transdutor de tensão isométrica (Letica) e a outra extremidade foi fixada à base da cuba. Este sistema foi conectado a um computador para registro da tensão isométrica, em gramas, utilizando o programa Chart V4.04.PowerLab ADInstruments (2000). Após 60 minutos de estabilização sob tensão basal de 1,5 g, os anéis aórticos foram estimulados com fenilefrina 1 µM por no mínimo duas vezes, até que a amplitude de resposta alcançasse pelo menos 80 % de contração. Isto foi realizado com o objetivo de verificar a integridade dos anéis antes de iniciar os experimentos. A presença ou ausência de endotélio foi testada com acetilcolina (Ach) 1 µM. Os anéis de aorta que

apresentaram relaxamento igual ou superior a 80% da contração induzida com fenilefrina foram considerados com endotélio íntegro. Os anéis incapazes de produzir relaxamento na presença de ACh foram considerados sem endotélio sendo utilizados para as curvas de Nitroprussiato de sódio (NPS).

Após os anéis serem testados quanto as suas capacidades de contração e relaxamento, foram lavados com solução de Krebs, por várias vezes, até que atingissem a linha de base. Em seguida, os anéis foram estimulados novamente com fenilefrina (1  $\mu$ M). Quando a contração atingiu o máximo, mantendo-se estável por um período de 5 minutos, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de ACh (1 pM - 10  $\mu$ M) nos anéis com endotélio presente e NPS (1 pM - 10  $\mu$ M) nos anéis ausentes de endotélio, com o objetivo de verificar se a exposição crônica ao chumbo poderia promover um relaxamento menor em comparação com aos anéis de aorta dos ratos não expostos; e ainda se o co-tratamento com doxiciclina poderia melhorar esta provável diminuição no relaxamento vascular induzida por ACh ou NPS em anéis de aorta de ratos expostos ao chumbo. Cada nova dose de ACh ou NPS era adicionada ao meio de incubação após a concentração anterior atingir seu relaxamento máximo e se manter estável.

As respostas de relaxamento promovidas pela ACh ou NPS foram calculadas pela porcentagem da redução contrátil induzida por fenilefrina após realização destes experimentos.

## **4.7 - Análise da estrutura vascular de aortas:**

### **4.7.1 - Inclusão das aortas em parafina:**

As amostras de aortas fixadas em paraformaldeído tamponado 4 % pH 7,4 por 24 horas e armazenadas no álcool 70 % v/v. As amostras no álcool passaram por um procedimento de desidratação em concentrações de álcool e foram diafanizadas e incluídas em parafina. Assim sendo, as aortas foram retiradas do álcool 70% v/v e colocadas em álcool 90% v/v, 95 % v/v, 100 % v/v (ou absoluto I), absoluto II e absoluto III, sucessivamente após permanência de 45 minutos em cada solução citada. Posterior a este procedimento as amostras foram embebidas em solução de xilol 70 % v/v, xilol absoluto I, xilol absoluto II e xilol absoluto III, sucessivamente após permanência de 20 minutos em cada solução citada. Em seguida a estes dois procedimentos, as aortas são colocadas em 3 banhos de parafina (para permitir infiltração da parafina no tecido), por um período de 40 minutos em cada banho. Posteriormente as aortas são colocadas em moldes contendo parafina e esta amostra é mantida a uma temperatura ambiente até tornar-se sólida. O molde contendo a aorta é então colocado em um suporte de madeira para fornecer sustentação para os cortes realizados para a microtomia (Leica RM2025).

### **4.7.2 - Preparação das lâminas:**

Foram feitos três cortes adjacentes de 4 µm para cada animal. Estes cortes foram colocados em laminas de vidro Knittel, umidecidas com água destilada. Posteriormente estas lâminas são colocadas em uma chapa pré-aquecida (37-39 °C)

para promover a aderência e abertura dos cortes. Para cada animal foram feitas 3 lâminas, com o objetivo de corar uma lâmina com hematoxilina e eosina (HE).

Para corar os anéis de aorta foi necessário retirar a parafina envolvida nos seção de aorta. Estas lâminas foram embebidas no álcool 90 % v/v, 95 %v/v, 100 % v/v (ou absoluto I), absoluto II e absoluto III por 30 minutos em cada solução citada anteriormente. Posterior a este procedimento, as amostras foram embebidas em solução de xilol 70 % v/v, xilol absoluto I, xilol absoluto II e xilol absoluto III sucessivamente, após permanência de 10 minutos em cada solução citada. Após este procedimento os cortes ficam praticamente ausentes de parafina podendo ser corados com seus respectivos corantes.

#### **4.7.3 - Coloração das Lâminas:**

As lâminas foram coradas para visualização da camada média utilizando-se os corantes hematoxilina e eosina (HE). O corante necessita permanecer em contato com o tecido por um período de 5 minutos com hematoxilina e 2 minutos com eosina. Para retirar o excesso do corante do tecido, as laminas foram submetidas a dois banhos em água corrente. Depois foram colocadas em álcool 90 % v/v, 95 %v/v, 100 % v/v (ou absoluto I), absoluto II e absoluto III por 10 minutos em cada solução citada anteriormente. Posterior a este procedimento, as amostras foram embebidas em solução de xilol 70 % v/v, xilol absoluto I, xilol absoluto II e xilol absoluto III sucessivamente, após permanência de 5 minutos em cada solução citada.

#### 4.7.4 - Determinação morfológica da parede vascular:

A morfologia da aorta dos animais foram analisados segundo método proposto por Dao e colaboradores [57].

As secções presentes nas lâminas (contendo cortes de aorta) foram visualizadas em microscópio Leica DMLB e a imagem adquirida com uma câmera para análise digital pelo “software” Leica IM50. A quantificações foram realizadas utilizando um programa de acesso público NIH image J (disponível no site: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>).

Este programa permite a determinação da área interna (AI) e área externa (AE) dos anéis de aorta, em objetiva 2,5 X (Figura 15). Assim o AST (área da seção transversal), que é um marcador de hipertrofia, foi calculado pela subtração entre AE e AI ( $AST = AE - AI$ ). A partir destes dados foi possível calcular o diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE), sendo DE igual a raiz quadrada de  $4AI/\pi$  e DI a raiz quadrada de  $4AI/\pi$ . A espessura da camada média (Média) foi determinada pela metade da diferença entre DE e DI (assim,  $Média = (DE - DI)/2$ ). Dessa maneira foi possível determinar se o chumbo poderia induzir um aumento na força de tensão da parede do vaso, que seria observada através da razão entre espessura da camada média e o diâmetro interno. Assim quanto menor o DI e maior a Média, maior seria a força de tensão sobre o vaso. Para isso, determinamos a RMDI que consiste na razão entre o valor da Média e o DI (assim,  $RMDI = Média/DI$ ).

Os valores são obtidos em pixels e transformados em micrômetros, com auxílio de uma barra inserida nas fotos. As barras possuem um valor conhecido em micrômetros que calculamos, através do programa, o seu valor em pixels possibilitando a conversão para micrômetros.



#### **4.8 – Análise dos resultados:**

Os resultados de pressão arterial de cauda foram analisados primeiramente por ANOVA (análise de variância) de uma via para medidas repetidas seguido do teste Dunnet ( GraphPad Prism, Software Inc., San Diego, CA, USA). A atividade das MMPs foram analisadas por ANOVA (análise de variância) de uma via seguida do teste Dunnet ( GraphPad Prism, Software Inc., San Diego, CA, USA). A mesma análise foi realizada para os resultados de chumbo no sangue dos animais controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo.

Para o procedimento de reatividade vascular, os parâmetros avaliados foram: curva de relaxamento, pD2 (-log EC<sub>50</sub>) e efeito máximo (Emax) entre os grupos tratados ou não com Chumbo que receberam água ou doxiciclina por gavagem. Os valores de pD2 para acetilcolina e nitroprussiato de sódio foram calculados por equação de regressão não-linear. Os resultados foram analisados por ANOVA (análise de variância) de uma via seguida do test Student-Newman-Keuls. (GraphPad Prism, Software Inc., San Diego, CA, USA).

Em relação às alterações morfológicas e concentração de chumbo no sangue e aorta entre os grupos experimentais tratados ou não com Pb que receberam ou não tratamento com doxiciclina foi feito uma ANOVA (análise de variância) de duas vias. (GraphPad Prism, Software Inc., San Diego, CA, USA).

Todos os resultados foram apresentados como média e seus respectivos erros padrão da média (média EPM). Foi considerado estatisticamente significativo o valor mínimo de probabilidade menor 0,05 ( $p < 0,05$ )

# *RESULTADOS*

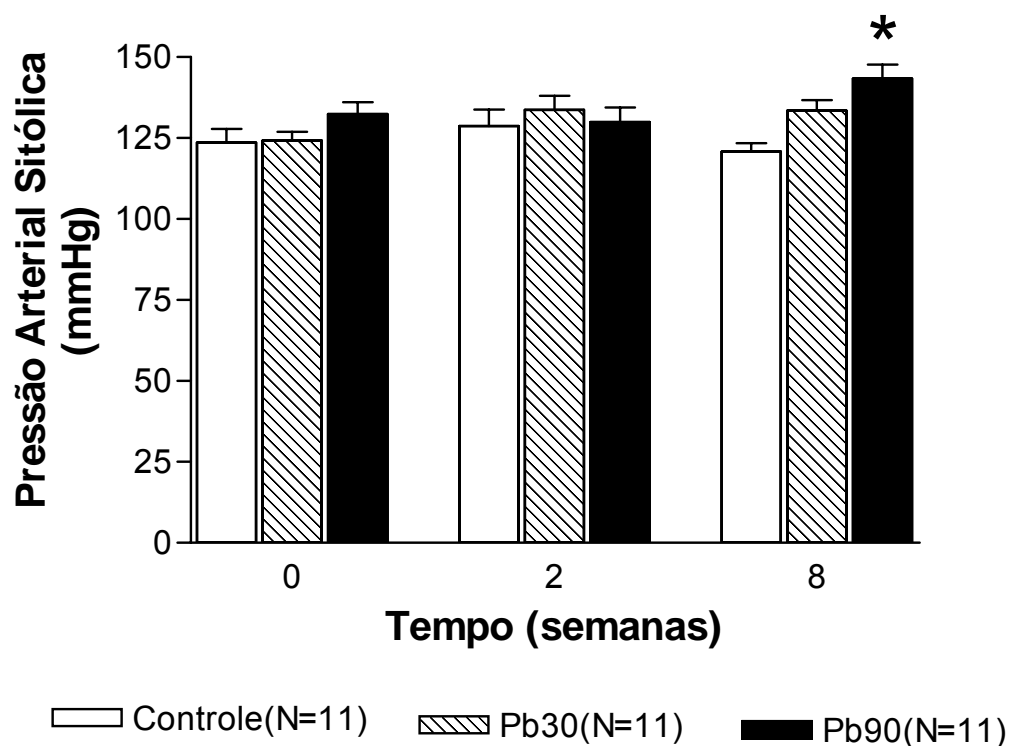
---

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - Alterações na pressão arterial de ratos induzida pelo tratamento crônico com baixas concentrações de chumbo:

Foi observado um aumento na pressão arterial sistólica dos ratos expostos cronicamente (dois meses) com 90 ppm de chumbo na oitava semana de tratamento, sendo o valor médio de pressão arterial sistólica basal de 128,2  $\pm$  3,6 mmHg que aumentou para 146,5  $\pm$  3,8 mmHg ao final da oitava semana de tratamento, ( $P < 0,005$ , Figura 2). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores médios de pressão arterial sistólica dos grupos controle e tratados com 30 ppm de chumbo (Pb30), sendo  $P > 0,05$ . O valor de pressão arterial sistólica basal para o grupo controle foi de 124,7  $\pm$  3,5 para 122,6  $\pm$  3,5 mmHg ao final da oitava semana de tratamento ( $P > 0,05$ ) e o valor de pressão arterial sistólica basal para o grupo Pb30 foi de 125,4  $\pm$  3,6 para 135,7  $\pm$  2,7 mmHg ao final da oitava semana de tratamento, ( $P > 0,05$ , Figura 2).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores médios em relação ao peso corporal dos animais ao final da oitava semana de tratamento, sendo obtido os seguintes valores (em gramas): 520  $\pm$  18; 517  $\pm$  13; 544  $\pm$  14 para os grupos controle, tratados com 30ppm de chumbo e tratados com 90 ppm de chumbo, respectivamente.

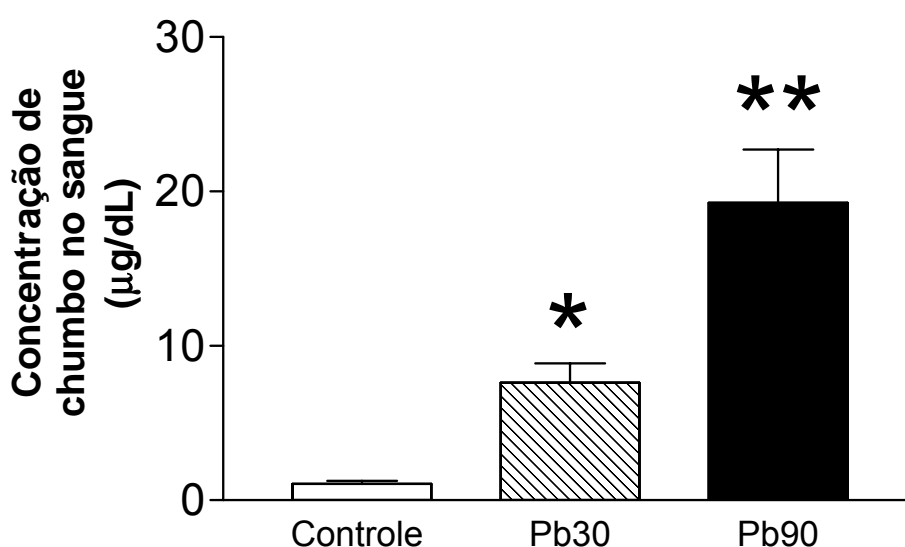


**Figura 2:** Variações da pressão arterial sistólica de ratos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo. A pressão arterial sistólica foi aferida uma semana antes do início do tratamento (tempo zero (0)), após duas semanas de tratamento (tempo dois (2)) e na oitava semana de tratamento (tempo oito (8)). Os valores são mostrados como média E.P.M., sendo  $*P < 0,005$  quando comparado com valor basal respectivo de cada grupo. (N = 11 animais por grupo).

## 5.2 - Avaliação da concentração de chumbo no sangue:

Para verificar as concentrações de chumbo no sangue, os animais foram decapitados ao final da oitava semana e o sangue destes animais foram coletados em tubos ausentes da contaminação por metais.

Como mostra a figura 3, o tratamento crônico com chumbo aumentou significativamente as concentrações de chumbo no sangue quando comparados com o grupo controle, sendo o valor de  $P < 0,05$  para o grupo tratado com 30ppm (Pb30) e  $P < 0,001$  para o grupo tratado com 90ppm (Pb90) de chumbo. Assim, a concentração média deste metal no sangue foi de  $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g/dL}$  para o grupo controle e  $7,6 \pm 1,6 \mu\text{g/dL}$  e  $19,3 \pm 3,4 \mu\text{g/dL}$  para os grupos Pb30 e Pb90, respectivamente.



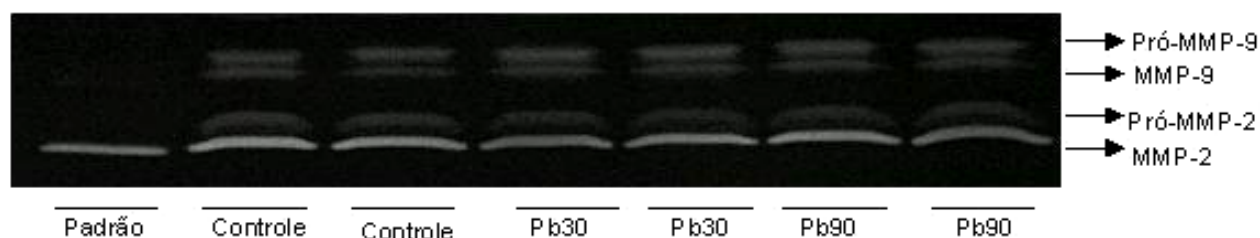
**Figura 3:** Concentração de chumbo no sangue de ratos controle e tratados com 30 ppm (Pb30) ou 90 ppm de chumbo (Pb90) por 8 semanas. Os valores são mostrados como média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,001$  quando comparados com grupo controle. (N = 5 animais por grupo)

### 5.3 - Atividade das metaloproteínases 2 e 9 no plasma e aorta de ratos tratados com chumbo:

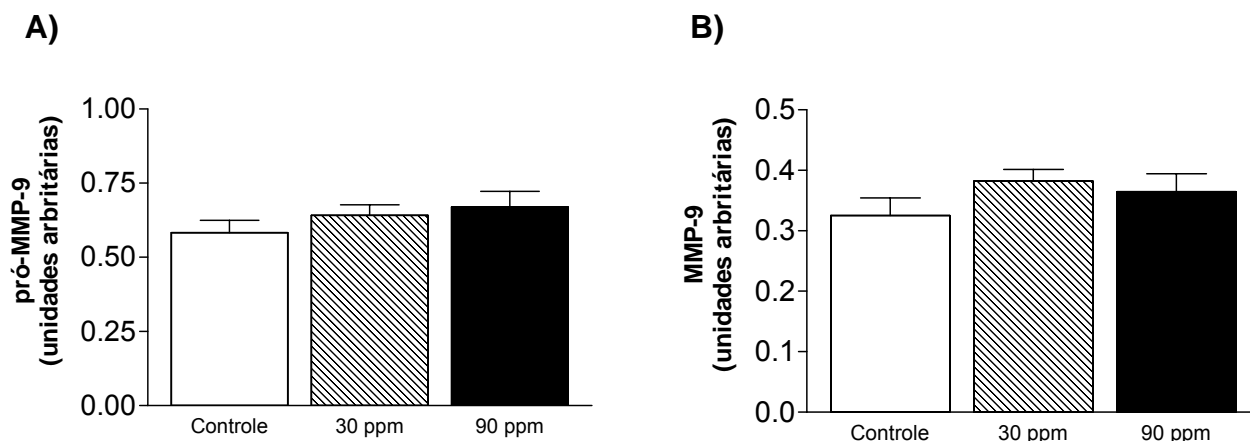
#### 5.3.1 - Atividade das metaloproteínases 2 e 9 no plasma :

Os animais foram decapitados ao final da oitava semana e o sangue destes animais foram coletados e imediatamente centrifugados (10 min a 3000 rpm) para obtenção do plasma.

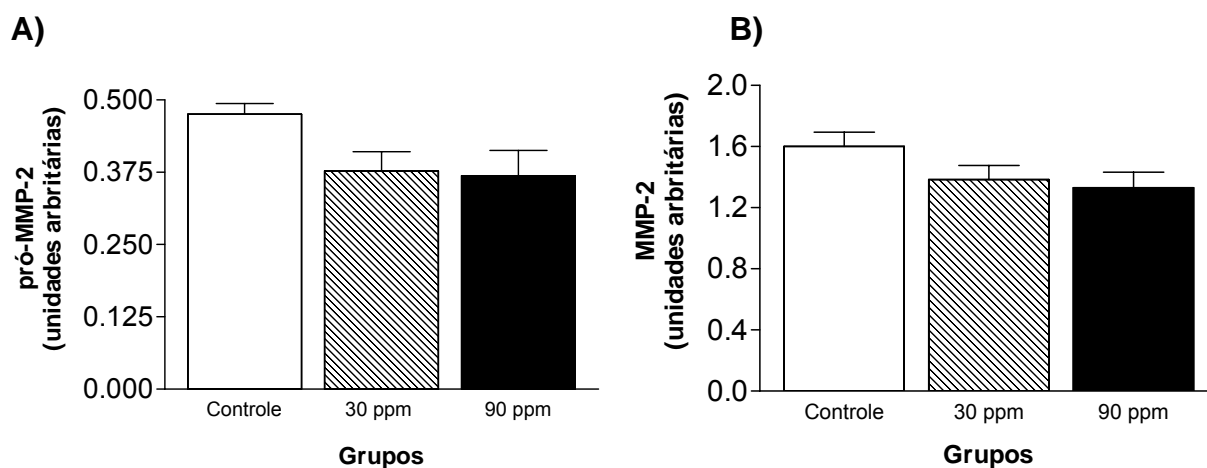
A figura 4 consiste em um zimograma representativo das amostras de plasma de ratos, mostrando as bandas relativas à pró-MMP-9, MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2. A análise densitométrica das bandas correspondentes à pró-MMP-9, MMP-9 e pró-MMP-2 e MMP-2 estão representadas nas figuras 5 e 6, respectivamente. Os valores médios obtidos estão representados na tabela 1. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a pró-MMP9, MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2 presente no plasma dos ratos entre os grupos controle e tratados com 30 ppm ou 90 ppm de chumbo ( $P>0,05$ ).



**Figura 4:** Gel de zimografia representativo da pró-MMP-2 e pró-MMP-9 e MMP-9 e MMP-2 no plasma de ratos controle e tratados com 30 ppm (Pb30) ou 90 ppm de chumbo (Pb90) ao final da oitava semana de tratamento.



**Figura 5:** Análise densitométrica da enzima pró-MMP-9 (A) e MMP-9 (B) no plasma de ratos controle e tratados com chumbo 30 ppm (Pb30) ou 90ppm de chumbo (Pb90) ao final da oitava semana de tratamento. Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Valor de  $P > 0,05$  para todos os grupos quando comparados com o grupo controle. (N = 11 animais por grupo)



**Figura 6:** Análise densitométrica da pró-MMP-2 (A) e MMP-2 (B) no plasma de ratos controle e tratados com chumbo 30 ppm (Pb30) e 90 ppm de chumbo (Pb90) ao final da oitava semana de tratamento. Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Valor de  $P > 0,05$  para todos os grupos quando comparados com o grupo controle. (N = 11 animais por grupo)

**Tabela 1:** Valores obtidos da análise densitométrica das metaloproteinases no plasma. Os valores são mostrados como média E.P.M. Valor de  $P > 0,05$  para todos os grupos quando comparados com o grupo controle. (N = 11 animais por grupo). (U.A. = unidades arbitrárias).

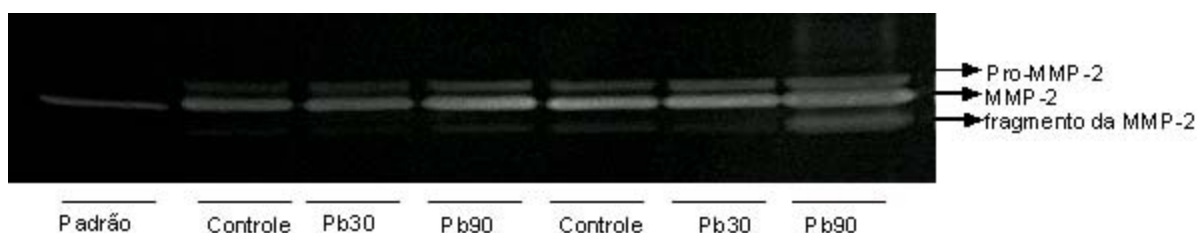
	<b>Controle</b>		<b>Pb30</b>		<b>Pb90</b>	
<b>Pró-MMP-9</b> (U.A)	0,58	0,04	0,64	0,03	0,67	0,05
<b>MMP-9</b> (U.A)	0,33	0,03	0,38	0,01	0,36	0,03
<b>Pró-MMP-2</b> (U.A)	0,47	0,02	0,38	0,03	0,37	0,04
<b>MMP-2</b> (U.A)	1,60	0,09	1,38	0,09	1,33	0,10



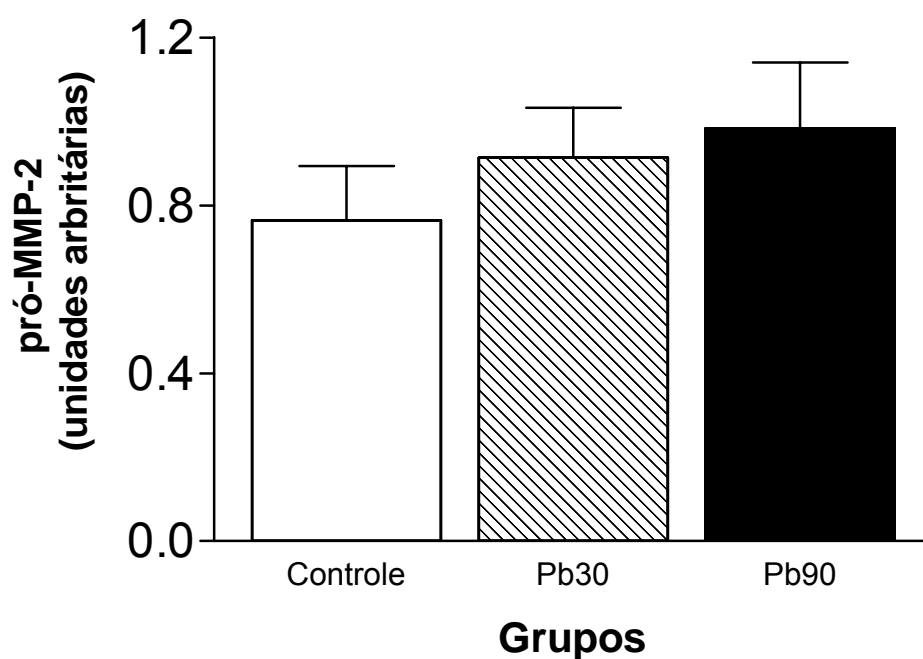
### 5.3.2 - Atividade das metaloproteinases 2 e 9 na aorta :

A figura 7 consiste em um zimograma representativo de extrato de aortas de ratos mostrando as bandas relativas à pró-MMP-2 e MMP-2 ativa. Embora as bandas correspondentes à pró-MMP-2 e MMP-2 ativa tenham sido identificadas no gel de zimografia, as bandas correspondentes à pró-MMP-9 e MMP-9 ativa não foram detectadas. A análise densitométrica das bandas correspondentes à pró-MMP-2 e MMP-2 ativa estão representadas na figura 8 e 9, respectivamente.

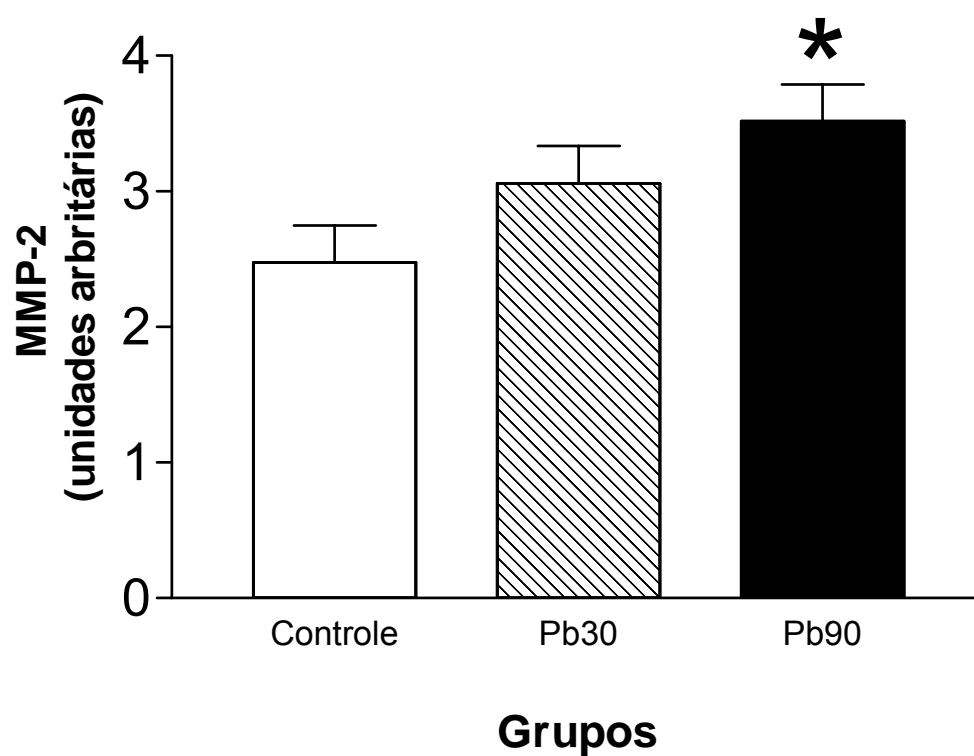
Como mostra a figura 8 e tabela 2 nenhuma diferença significativa foi observada na pró-MMP-2 em aortas de ratos entre os grupos controle e tratados com chumbo 30ppm (Pb30) ou 90ppm de chumbo (Pb90), sendo  $P>0,05$ . Já, em relação à atividade da MMP-2 ativa em extratos de aortas destes animais, mostrados pela figura 9 e tabela 2 ocorreu um aumento significativo entre os grupos controle e Pb90, sendo  $P<0,05$ . Esta diferença não foi observada entre os grupos controle e Pb30 ( $P>0,05$ ).



**Figura 7:** Gel de zimografia representativo da pró-MMP-2 e MMP-2 ativa e em extratos de aorta de ratos controle e tratados com 30 ppm (Pb30) ou 90 ppm de chumbo (Pb90) ao final da oitava semana de tratamento.



**Figura 8:** Análise densitométrica da pró-MMP-2 em extratos de aorta de ratos controle e tratados com 30 ppm (Pb30) ou 90 ppm de chumbo (Pb90) por 8 semanas. Os valores são mostrados como média E.P.M.  $P > 0,05$  quando comparado com grupo controle. (N = 11 animais por grupo)



**Figura 9:** Análise densitométrica da MMP-2 ativa em extratos de aorta de ratos controle e tratados com 30 ppm (Pb30) e 90 ppm de chumbo (Pb90) por dois meses. Os valores são mostrados como média E.P.M.  $P < 0,05$  quando comparado com grupo controle. (N = 11 animais por grupo)

**Tabela 2:** Valores médios obtidos da análise densitométrica das bandas da pró-MMP-2 e MMP-2 ativa na aorta de ratos controle e tratados com chumbo 30 ppm (Pb30) ou 90 ppm (Pb90) de chumbo ao final da oitava semana de tratamento. Os valores são mostrados como média E.P.M. \* $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle. (N = 11 animais por grupo). (U.A. = unidades arbitrárias).

	<b>Controle</b>		<b>Pb30</b>		<b>Pb90</b>	
<b>Pró-MMP-2</b> (U.A)	0,76	0,13	0,91	0,12	0,98	0,15
<b>MMP-2</b> (U.A)	2,47	0,27	3,01	0,28	3,5	0,27*

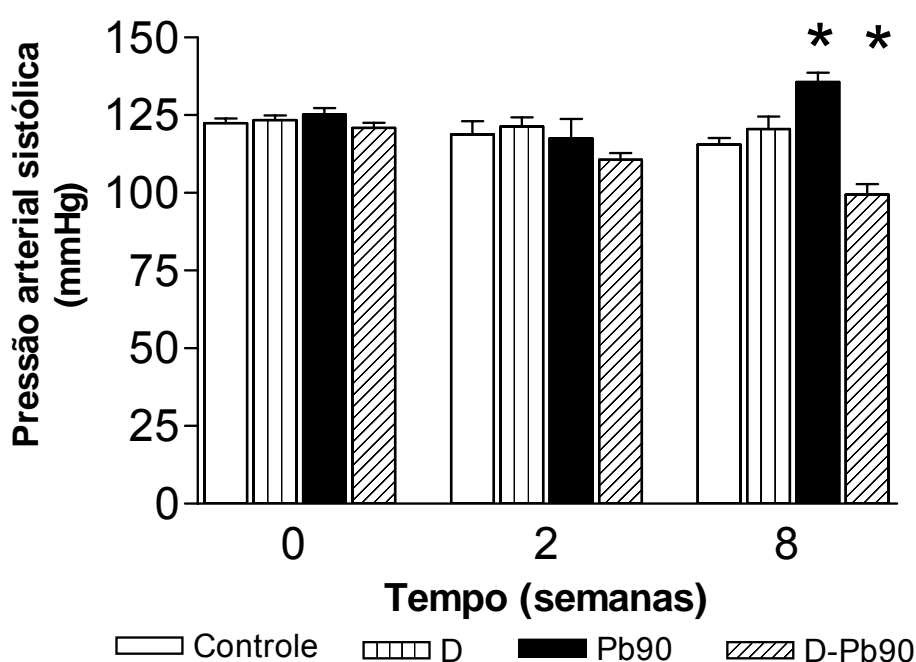
#### **5.4 - Efeito da doxíciclina sobre o aumento da pressão arterial sistólica induzida pelo tratamento crônico com 90ppm de chumbo:**

Devido ao aumento da pressão arterial sistólica e aumento da atividade da MMP-2 em aortas de ratos associado à exposição crônica a 90ppm de chumbo, foi verificado a participação das MMPs neste aumento de pressão arterial observado, através de um co-tratamento com inibidor (inespecífico) de MMPs, a doxíciclina. Assim, foi realizado tratamento com quatro grupos de animais, tratados por 8 semanas com (1) água (controle) , (2) água e doxíciclina por gavagem (D), (3) 90 ppm de chumbo (Pb90) e (4) Pb90 co-tratados com doxíciclina por gavagem (D-Pb90).

Conforme observa-se na figura 10, o tratamento crônico com 90ppm de chumbo novamente induziu aumento significativo na pressão arterial sistólica ao final da oitava semana de tratamento, sendo o valor médio de pressão arterial sistólica basal de 125,1 ± 2,1 para 135,6 ± 3,1 mmHg ao final da oitava semana de tratamento;  $P < 0,05$ . Nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores médios de pressão arterial sistólica dos grupos controle e doxíciclina (D), sendo o valor de  $P > 0,05$  e o valor de pressão arterial sistólica basal para o grupo controle foi de 122,4 ± 1,5 para 115,6 ± 2,1 mmHg, ao final da oitava semana de tratamento ( $P > 0,05$ ) e o valor de pressão arterial sistólica basal para o D foi de 123,4 ± 1,6 para 120,6 ± 3,9 ao final da oitava semana de tratamento ( $P > 0,05$ ). Contudo, o co-tratamento com inibidor de MMPs não permitiu o aumento da pressão arterial sistólica associado a exposição a 90 ppm de chumbo. Assim, o grupo Pb90 que recebeu co-tratamento com doxíciclina (grupo D-Pb90) não demonstrou aumento na pressão arterial. Ao contrário e curiosamente foi observada uma redução da pressão arterial sistólica ao final da oitava semana de tratamento, sendo que o valor de

pressão arterial sistólica basal foi de 118,9 ± 1,6 para 99,4 ± 3,4 mmHg ao final da oitava semana de tratamento ( $P < 0,05$ ). (Figura 10).

Nenhuma diferença estatística significativa foi observada em relação ao peso corporal dos animais ao final da oitava semana de tratamento, sendo obtido os seguintes valores médios (em gramas): 538 ± 15; 541 ± 10; 555 ± 33 e 548 ± 25 para os grupos controle, Pb90, D e D-Pb90, respectivamente.



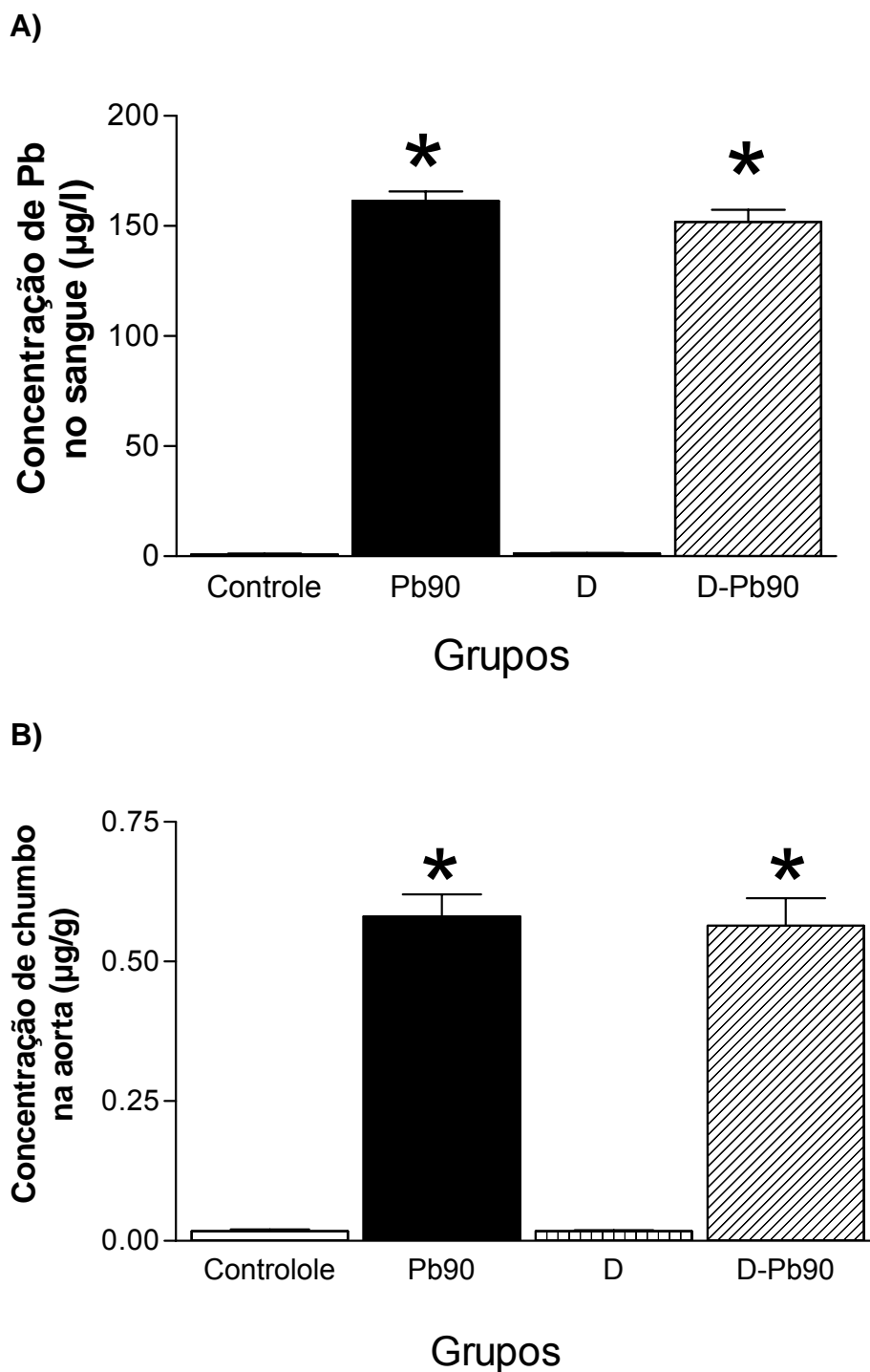
**Figura 10:** Variações da pressão arterial sistólica de ratos controle e controle tratados com doxiciclina (D) por gavagem e ratos tratados 90ppm de chumbo na água de beber (Pb90) e Pb90 co-tratados com doxiciclina (D-Pb90). Todos os grupos iniciaram o tratamento na água de beber ou por gavagem, na semana considerada basal que perdurou por oito semanas. A pressão arterial sistólica foi aferida uma semana antes do início do tratamento (tempo zero (0)), duas semanas após início de tratamento (tempo dois (2)) e ao final da oitava semana de tratamento (tempo oito (8)). Os valores são mostrados como média ± E.P.M. \*  $P < 0,05$  quando comparado com valor basal respectivo de cada grupo, sendo n igual a 8 animais por grupo.

### 5.5 - Avaliação da concentração de chumbo no sangue e aorta:

Para verificar as concentrações de chumbo no sangue e aorta de ratos dos grupos experimentais e também se a doxiciclina poderia alterar estas concentrações de chumbo, os animais foram decapitados ao final da oitava semana e o sangue e aorta destes animais foram coletados em tubos ausentes da contaminação por metais.

Como mostra a figura 11, o tratamento com 90ppm de chumbo aumentou significativamente a concentração de chumbo no sangue e aorta dos ratos tratados quando comparados com o grupo controle, sendo o valor de  $P < 0,0001$ .

O tratamento com doxiciclina não alterou as concentrações de chumbo no sangue e aorta dos ratos tratados com 90ppm de chumbo ( $P > 0,05$ ). Assim, as concentrações médias deste metal no sangue dos animais foram: 0,09 ± 0,02 µg/dL para o grupo controle, 16,14 ± 0,44 µg/dL para o grupo tratado com 90 ppm de chumbo (Pb90), 0,12 ± 0,03 µg/dL para o grupo tratado com doxiciclina e 15,19 ± 0,56 µg/dL para o grupo Pb90 co-tratado com doxiciclina. Na aorta dos animais os valores médios encontrados foram de 0,017 ± 0,004 µg/g para o grupo controle, de 0,581 ± 0,039 µg/g para o grupo tratado com 90ppm de chumbo (Pb90), 0,017 ± 0,002 µg/g para o grupo tratado com doxiciclina e 0,564 ± 0,049 µg/g para o grupo Pb90 co-tratado com doxiciclina.



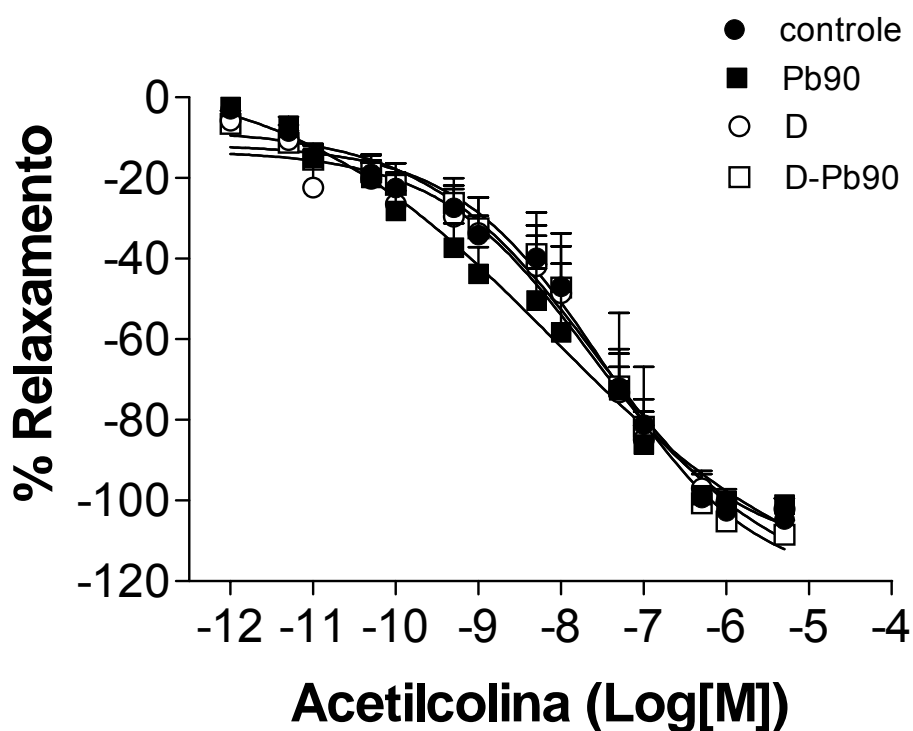
**Figura 11:** Concentração de chumbo no sangue (A) e aorta (B) dos ratos controle, tratados com 90ppm de chumbo (Pb90), controle tratados com doxiciclina (D) e Pb90 tratados com doxiciclina por 8 semanas. Os valores são mostrados como média EPM \* $P < 0,0001$  quando comparado com grupo controle respectivo de cada grupo. (N = 5 animais por grupo)



### **5.6 - Efeito do tratamento crônico com 90ppm de chumbo na presença e ausência do tratamento crônico com doxiciclina sobre a reatividade vascular:**

Como exposto na introdução, um aumento na pressão arterial e aumento na atividade das MMPs têm sido associados à disfunção endotelial. Assim sendo, foram investigadas alterações vasculares em aortas de ratos tratados cronicamente com chumbo e doxiciclina em relação a drogas vasodilatadoras dependentes de endotélio (como a acetilcolina) e independentes do endotélio (como o e nitroprussiato de sódio).

As curvas de relaxamento concentração-efeito promovida pela acetilcolina, em anéis de aorta dos ratos controle, tratados com 90ppm de chumbo (Pb90), com doxiciclina (D) e Pb90 co-tratados com doxiciclina (D-Pb90), foram muito semelhantes, não sendo observada nenhuma diferença estatística entre estes grupos citados, com relação ao relaxamento vascular induzido pela acetilcolina (figura 12). Assim sendo, os valores de efeito máximo e pD2 ( $-\log EC_{50}$ ) não apresentaram diferença estatística no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina entre os anéis de aorta de todos os grupos em estudo. (Tabela 3)



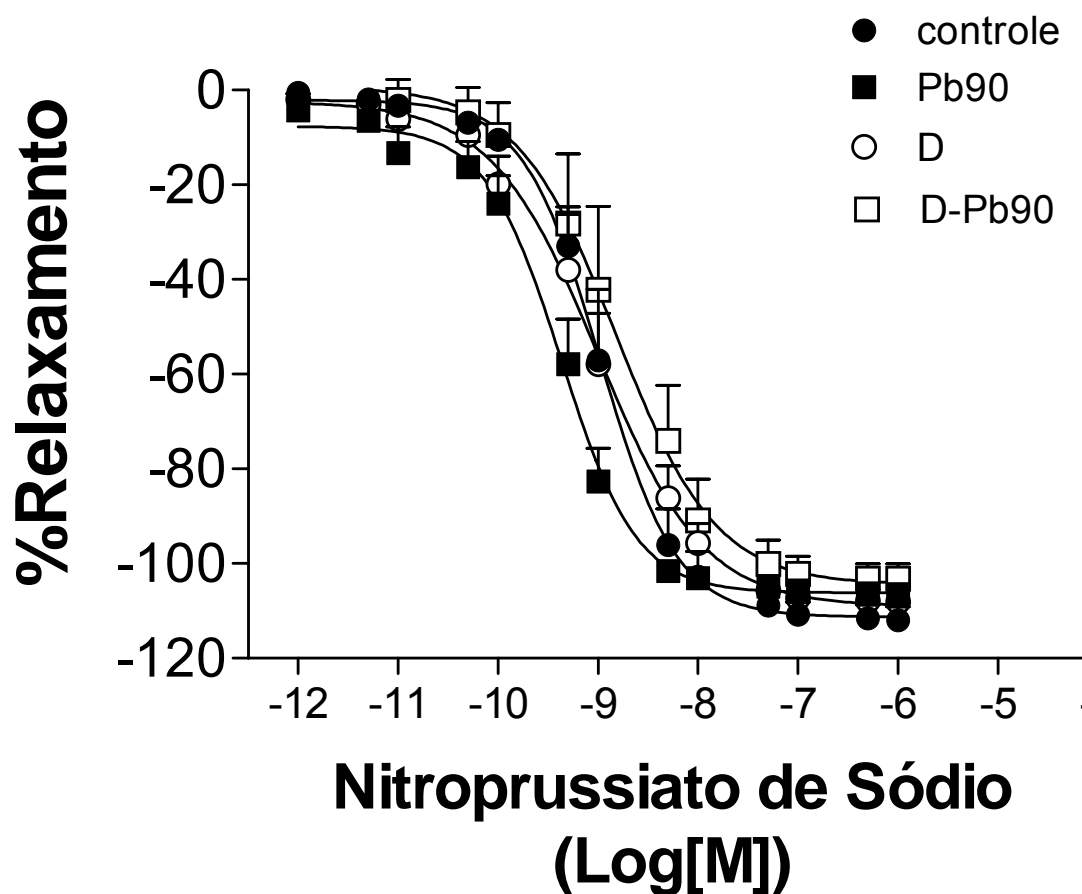
**Figura 12:** Relaxamento vascular produzido pela acetilcolina nos anéis de aorta de ratos. Curvas concentração-efeito para acetilcolina foram construídas em anéis de aorta de ratos, pré-contraídos com fenilefrina sendo os grupos: controle (C), tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 co-tratados com doxiciclina (D-Pb90). Os pontos representam valores de  $pD_2$  E.P.M.  $P > 0,05$  para todos os grupos (N = 5 animais por grupo)

**Tabela 3:** Média e erro padrão da média dos valores de efeito máximo (Emax) e pD2 das curvas de relaxamento concentração-dependente da acetilcolina nos anéis de dos ratos. Estes valores foram obtidos dos anéis de aorta dos ratos controles, tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 co-tratados com doxiciclina (D-Pb90).  $P > 0,05$  para todos os grupos (N = 5 animais por grupo).

Ach	Controle		Pb90		D		D-Pb90	
<b>Emax (%)</b>	104,6	2,3	100,9	0,8	102,0	2,6	108,5	3,6
<b>pD2</b>	7,6	0,2	8,3	0,4	7,7	0,2	7,1	0,7

O relaxamento em resposta ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta pré-contráídos com fenilefrina está representado pela figura 13. Assim, as curvas de relaxamento concentração-efeito promovidas pelo nitroprussiato de sódio, em anéis de aorta dos ratos controle, tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 co-tratados com doxiciclina (D-Pb90) foram muito semelhantes, não sendo observado nenhuma diferença estatística entre estes grupos citados, com relação a este parâmetro. Assim sendo, entre os valores de efeito máximo e pD2 (Tabela 4) também não foi observado diferença estatística no relaxamento vascular induzido pelo nitroprussiato de sódio entre os anéis de aorta de todos os grupos em estudo.

.



**Figura 13:** Relaxamento vascular produzido pelo nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de ratos. Curvas concentração-efeito para o nitroprussiato de sódio foram construídas em anéis de aorta contraídos com fenilefrina de ratos dos grupos controle, tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 co-tratados com doxiciclina (D-Pb90). Os pontos representam valores de pD<sub>2</sub> E.P.M.  $P > 0,05$  para todos os grupos (N = 5 animais por grupo)

**Tabela 4:** Média e erro padrão da média dos valores do efeito máximo (Emax) e pD2 da curva de relaxamento concentração-dependente do Nitroprussiato de sódio nos anéis dos ratos. Estes valores foram obtidos dos anéis de aorta dos ratos controles, tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 co-tratados com doxiciclina (D-Pb90).  $P>0,05$  para todos os grupos (N = 5 animais por grupo).

NPS	Controle		Pb90		D		D-Pb90	
Emax (%)	123,2	11,4	106,5	1,2	108,1	2,2	103,1	3,1
pD2	9,0	0,1	9,4	0,1	9,0	0,2	8,8	0,2

### **5.7 - Avaliação de alterações morfológicas induzidas pelo tratamento crônico com 90ppm de chumbo e co-tratamento crônico com doxiciclina:**

Com o objetivo de verificar se a exposição crônica ao chumbo poderia promover alterações na morfologia vascular e se as metaloproteinases poderiam ter participação nestas alterações analisamos, em aorta de ratos controle ou tratados com 90 ppm de chumbo na vigência ou não de co-tratamento com doxiciclina: a área da seção transversal (AST), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE), média (Média) e razão entre a média e diâmetro interno (RM/DI).

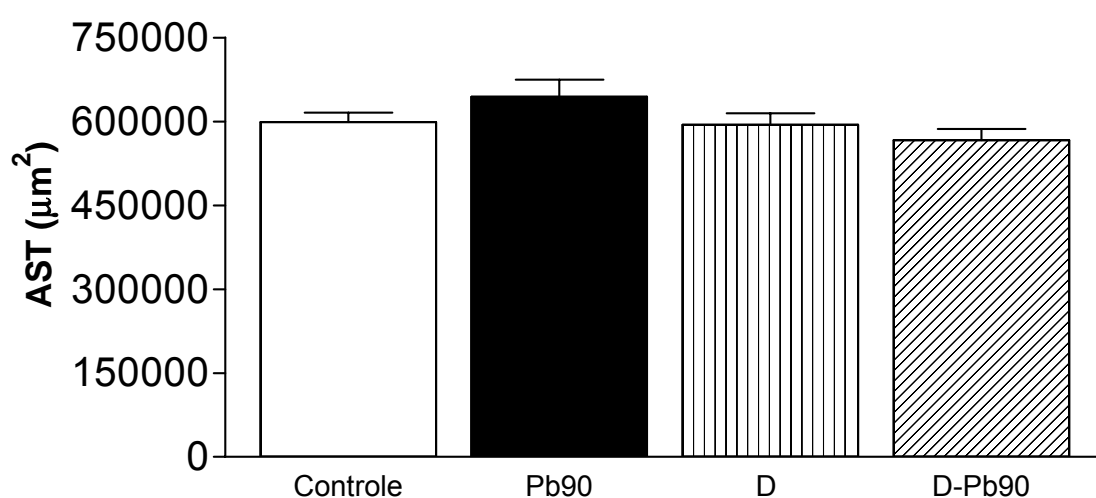
Como mostra a tabela 5, nenhuma diferença foi observada entre os grupos de ratos controle, controle tratados com doxiciclina, tratados com 90 ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 co-tratados com doxiciclina, em relação aos seguintes parâmetros: espessura da camada média da aorta (Média), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo da aorta (DE) e razão entre Média e diâmetro interno da aorta (RMDI).

**Tabela 5** – Morfometria de aorta: Valores médio obtidos EPM de ratos dos grupos controle, tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 também tratados com doxiciclina (D-Pb90). (N = 6-9 por grupo). RMDI consiste na razão entre a Média e DI, em porcentagem, sendo a espessura da camada média, o diâmetro interno e externo da aorta representados por Média, DI e DE, respectivamente. A média consiste na metade da diferença entre DE e DI.

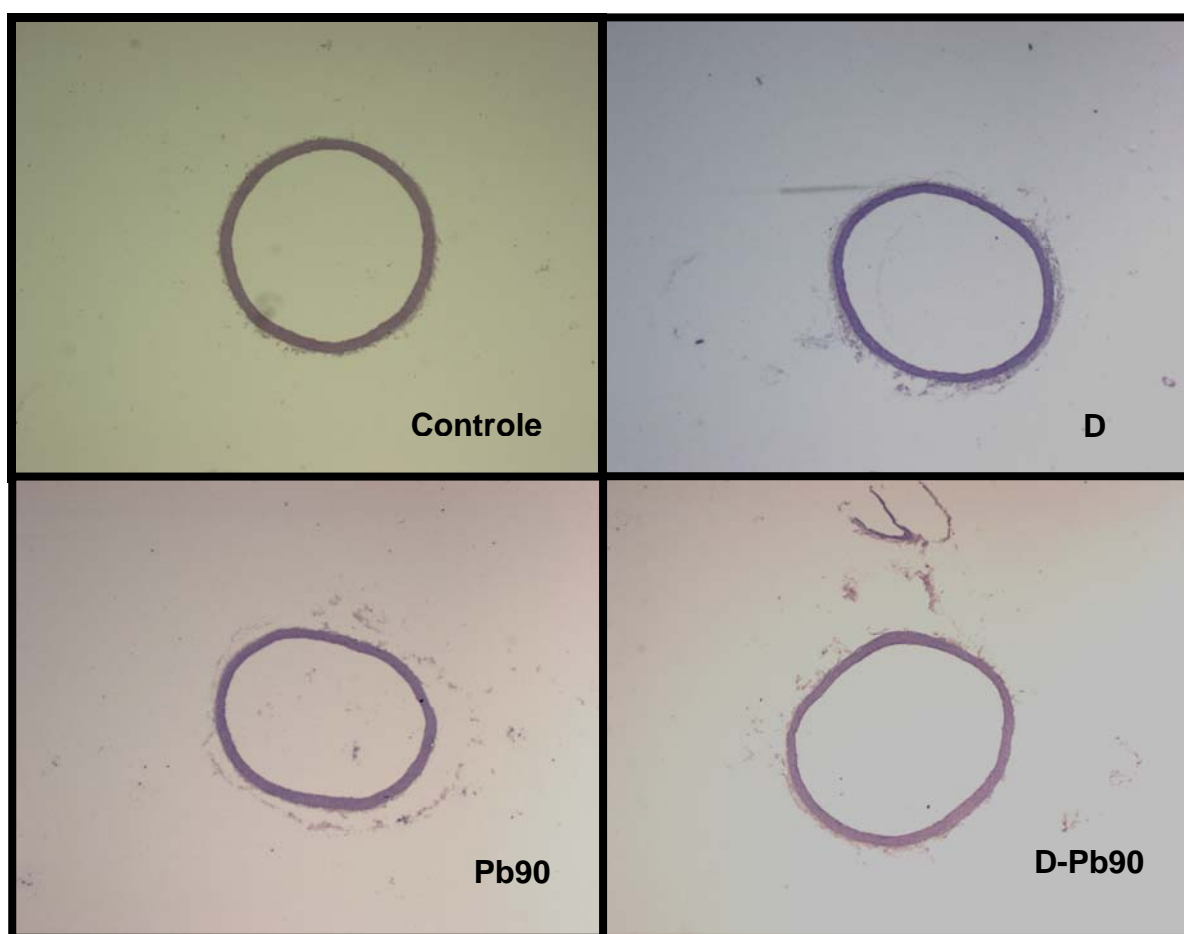
	<b>Controle</b>		<b>Pb90</b>		<b>D</b>		<b>DPb90</b>	
<b>N</b>	7		6		9		8	
<b>AST ( <math>\mu\text{m}^2 \cdot 10^3</math> )</b>	599,0	16,9	643,9	30,6	594,2	20,3	566,7	20,1
<b>RMDI (%)</b>	13,3	0,7	14,1	0,8	12,6	0,4	12,4	0,2
<b>Média ( <math>\mu\text{m}</math> )</b>	108,8	4,2	116,2	5,6	105,8	2,7	102,7	2,2
<b>DI ( <math>\mu\text{m}</math> )</b>	1650	43	1650	35	1681	30	1653	33
<b>DE ( <math>\mu\text{m}</math> )</b>	1868	37	1893	31	1883	33	1858	36



Além disso, foi analisada a área da secção transversal (AST) das aortas dos grupos controles, tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 tratados com doxiciclina (D-Pb90) e nenhuma diferença estatística foi observada com relação a este parâmetro analisado. (Figura 14)



**Figura 14:** Valores da área da seção transversal (AST) de aortas de ratos dos grupos controle, tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 também tratados com doxiciclina (D-Pb90). Valores médio obtidos . EPM. (N = 6-9 animais por grupo)



**Figura 15:** Imagens (2,5X) de aortas de ratos dos grupos controle, tratados com doxiciclina (D), tratados com 90ppm de chumbo (Pb90) e Pb90 co-tratados com doxiciclina (D-Pb90) para determinação dos valores da área da seção transversal de aorta (AST). Sendo o AST determinado como a diferença entre a área externa (AE) e área interna (AI) da aorta dos ratos.

## *DISCUSSÃO*

---

## 6 - Discussão:

Neste estudo, foi observado que a exposição crônica a baixas concentrações de chumbo está associada a um aumento na pressão arterial sistólica e na quantidade de MMP-2 ativa em aorta de ratos, sugerindo que as metaloproteinases estão envolvidas no aumento de pressão arterial sistólica associado à exposição a baixas concentrações de chumbo. O co-tratamento com um inibidor (inespecífico) de MMPs impediu o aumento na pressão arterial sistólica.

Muitos trabalhos demonstraram que tratamento crônico com chumbo (de 1 a 10 meses com 100ppm de chumbo) provoca um aumento na pressão arterial sistólica de ratos [25,85]. Assim, nossos resultados confirmam estes trabalhos e ainda concordam com outro estudo demonstrando que exposição a uma concentração de 30 ppm de chumbo não promove aumento na pressão arterial sistólica [86].

Além disso, a concentração sanguínea de chumbo encontrada nos ratos tratados com 90ppm de chumbo foi de 19,3 µg/dL, semelhante à concentração no sangue relatada em estudos que mostraram associação entre esta concentração de chumbo no sangue com aumento na pressão arterial em ratos expostos a este metal [25,40,86].

O presente estudo, ao nosso conhecimento, é o primeiro a verificar um aumento da atividade da MMP-2 em aorta de ratos expostos ao chumbo. Utilizamos técnica de zimografia para verificar a atividade das MMPs 2 e 9 no plasma e aorta de ratos. Esta técnica é amplamente utilizada para quantificar ambas as formas, latente e ativa, das metaloproteinases 2 e 9 [73,87].

As metaloproteinases são sintetizadas em sua pró-forma, também chamada zimógeno, e ativadas através de vários mecanismos, especialmente através de espécies reativas de oxigênio [48,51,73]. Embora não tenhamos estudado a formação de espécies reativas de oxigênio neste estudo, outros trabalhos têm sugerido que exposição ao chumbo promove um aumento na atividade das enzimas responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) tanto em cultura de células endoteliais e da musculatura vascular lisa coronarianas como em cultura de células endoteliais de aorta e no sangue (eritrócitos e plasma) [88-91].

O aumento de espécies reativas de oxigênio pode promover um aumento da expressão e da atividade das MMPs 2 e 9 [51,73]. Assim, é possível que o aumento do estresse oxidativo em ratos expostos ao chumbo, pode ser o responsável pelo aumento na atividade das metaloproteinases 2 e 9. Apoiando esta hipótese, encontramos um aumento na atividade das MMP-2 em aorta de ratos expostos a 90 ppm de chumbo. Contudo, não foi observado nenhum aumento significativo na atividade das MMP-2 e 9 no plasma destes animais.

As concentrações de chumbo encontradas na aorta dos ratos expostos a este metal foram maiores que as concentrações de chumbo no plasma destes animais, mostrando que o chumbo pode depositar-se na aorta. Assim, este metal poderia interferir diretamente na atividade da MMP-2 em aortas, sem promover alterações nas MMPs no plasma.

Existem trabalhos mostrando que metais divalentes como, chumbo, zinco e cobre, dentre outros, podem atuar inibindo proteinases [92-94]. Assim sendo, o chumbo poderia atuar inibindo as metaloproteinases e assim, induzir um mecanismo de autocompensação das metaloproteinases, que poderia ser observado por um provável aumento na atividade das MMP-2.

Neste sentido, foram feitos ensaios zimográficos, em nosso laboratório, incubando estas metaloproteinases com concentrações de chumbo semelhante às concentrações deste metal encontradas no sangue e aorta dos animais (dados não mostrados). Nestes ensaios zimográficos, o chumbo não promoveu inibição da MMP-2 nas concentrações utilizadas (que variaram entre 0,15  $\mu$ M e 5  $\mu$ M), sendo estas concentrações inferiores às concentrações utilizadas em outros estudos [92-94]. Portanto, sugerimos que o aumento da MMP-2 associada à exposição crônica ao chumbo não foi devido à inibição direta desta enzima.

O resultado mais interessante deste trabalho foi o efeito do inibidor (inespecífico) de metaloproteinases, a doxíciclina, sobre o aumento de pressão arterial sistólica associado à exposição ao chumbo. A doxíciclina impediu o aumento na pressão arterial sistólica de ratos associado à exposição ao chumbo e curiosamente, até diminuiu a pressão arterial dos ratos expostos ao chumbo co-tratados com este inibidor.

Dados na literatura sugerem que a MMP-2 pode estar envolvida em processos de disfunção vascular. Foi descrito que as metaloproteinases do tipo 2 podem diminuir a atividade de peptídeos vasodilatadores como CGRP [80] e adrenomedulina [81] e ainda aumentar a atividade de peptídeos vasoconstrictores como endotelina [79]. No presente estudo, não foi determinada a concentração destes peptídeos em ratos tratados com chumbo e/ou tratados com doxíciclina. Contudo, foi observado um aumento na atividade da MMP-2 em aorta de ratos expostos ao chumbo, e a doxíciclina pode atuar inibindo tanto a atividade quanto a expressão das metaloproteinases [95]. Dessa maneira, a doxíciclina poderia diminuir a atividade da MMP-2 e, conseqüentemente, diminuir um processo de disfunção vascular promovido por esta endopeptidase. Este poderia ser um provável

mecanismo pelo qual a doxicilina impediu o aumento na pressão arterial associado à exposição ao chumbo. Além disso, doxicilina, sendo um inibidor inespecífico de metaloproteinases, poderia atuar inibindo outras metaloproteinases possivelmente envolvidas no controle do tônus vascular. Por exemplo, a doxicilina poder ter inibido também a MMP-7, que recentemente foi sugerida como tendo um papel no controle do tônus vascular [96].

É importante ressaltar que nossos resultados não são suficientes para afirmar que a doxicilina impediu o aumento da pressão arterial por inibir as metaloproteinases, sendo que seria interessante mostrar por zimografia, a inibição das MMPs por doxicilina. Contudo, existe uma limitação quanto a este método de análise para verificar uma provável inibição das MMPs pela doxicilina. Para determinação da quantidade de metaloproteinases por zimografia é necessária a ativação das enzimas presentes nas amostras. Dessa maneira, no processo de ativação das MMPs, a doxicilina ligada a MMP, poderia ser liberada da enzima deixando-a livre para degradar seu substrato presente no gel para zimografia, impedindo a visualização da inibição pela doxicilina.

Como a exposição ao chumbo promoveu um aumento na pressão arterial sistólica dos ratos expostos a este metal e o co-tratamento com doxicilina impediu este aumento na pressão arterial, o chumbo poderia promover alterações na reatividade vascular e também, alterações na morfologia vascular que seriam revertidas pelo co-tratamento com doxicilina. Assim, estudamos as respostas vasculares a agentes vasodilatadores dependentes (acetilcolina) e independentes de endotélio (nitroprussiato de sódio). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos controle e tratados com chumbo na vigência ou não de tratamento com doxicilina.

A acetilcolina promove relaxamento vascular em anéis de aorta, por mecanismos dependentes do endotélio e da síntese do óxido nítrico. Assim sendo, parece que o chumbo não promove alterações na reatividade de anéis de aorta pelos mecanismos de relaxamento induzidos pela acetilcolina. Entretanto, os estudos encontrados na literatura, relativos à reatividade vascular de ratos expostos cronicamente a baixas doses de chumbo, são conflitantes.

Marques e colaboradores mostraram que a resposta a vasodilatadores dependentes do endotélio como a acetilcolina em anéis de aorta de ratos pré-contráídos com fenilefrina, parece estar diminuída para ratos expostos ao chumbo por aproximadamente 1 mês [40,41]. Por outro lado, nosso estudo está de acordo com os resultados de Purdy e colaboradores que não encontraram diferenças na resposta vasodilatadora a acetilcolina em ratos expostos ao chumbo por 3 meses [39,97].

Além disso, outros trabalhos descreveram resultados conflitantes, relativos à reatividade vascular de aortas de ratos expostos ao chumbo em resposta a drogas vasoconstrictoras agonistas de receptores alfa-1 adrenérgicos [37,39,40]. Webb e colaboradores mostraram que a exposição crônica ao chumbo parece aumentar a resposta de contração a agonistas alfa adrenérgicos em aorta de ratos tratados por 7 meses com chumbo [37]. Por outro lado, outros trabalhos não encontraram diferenças significativas na resposta contrátil a agonistas alfa adrenérgicos em aorta de ratos expostos cronicamente ao chumbo por 28 dias e 3 meses [39,40].

Estes trabalhos sobre a reatividade vascular em ratos expostos ao chumbo diferem no tempo de tratamento que varia de semanas a meses de tratamento e a concentração de chumbo administrada, que varia de 5 a 100 ppm, o que poderia explicar as inconsistências encontradas.



Contudo, nós observamos um aumento na pressão arterial induzido pela exposição ao chumbo, que parece não estar relacionado com alterações de reatividade vascular a acetilcolina.

Um aumento na pressão arterial pode levar ao remodelamento vascular como uma resposta adaptativa à elevação da pressão arterial, com objetivo de normalizar a tensão exercida na parede dos vasos [55]. Neste processo de remodelamento pode ocorrer hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa vascular, bem como um aumento na degradação de colágeno e conseqüente reorganização da matrix extracelular [55-57].

Na hipertensão essencial, remodelamento em artérias de condutância é caracterizado por um aumento na espessura da camada média vascular, seguido ou não por uma diminuição no diâmetro vascular interno (RMDI) e um aumento na área de seção transversal (AST) [57,98].

As metaloproteinases são responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular e parecem participar do remodelamento de artérias de condutância durante arteriosclerose [78,99]. Foi observado que, principalmente, a MMP-2 e 9 participam da migração de células da musculatura lisa vascular [66]. Dessa maneira as metaloproteinases estão intimamente relacionadas com o remodelamento vascular hipertrófico.

Como observamos um aumento na atividade da MMP-2, imaginamos que exposição ao chumbo poderia estar relacionada com alterações morfológicas associadas ao aumento da pressão arterial causado pela exposição ao chumbo. Assim, analisamos os seguintes parâmetros: área da seção transversal (AST), espessura da camada média (Média), diâmetro interno (DI) e externo (DE) e a razão entre a Média e DI. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos

deste estudo em relação a estes parâmetros, mostrando que o aumento na pressão arterial sistólica associado à exposição ao chumbo não foi devido a alterações na estrutura da aorta e nem promoveu alterações neste vaso.

Uma limitação importante do nosso estudo consiste no tempo de tratamento escolhido. O aumento na pressão arterial foi observado somente na última semana de tratamento. É possível que um período de exposição mais longo poderia resultar em alterações vasculares em resposta ao aumento de pressão arterial induzido pelo chumbo.

Conjuntamente, nossos dados são compatíveis com a hipótese de que o aumento da pressão arterial sistólica associada à exposição à baixa concentração de chumbo pode envolver a participação das metaloproteinases, sem apresentar alterações vasculares na aorta de ratos no período de tempo estudado.

## *CONCLUSÕES*

---

## **7 - CONCLUSÕES**

- 1- A exposição a baixas doses de chumbo aumenta a atividade da enzima metaloproteinase-2 na aorta de ratos;
- 2- A administração conjunta do inibidor (inespecífico) de metaloproteinases doxíciclina impediu o aumento da pressão arterial sistólica associada à exposição a baixas doses de chumbo;
- 3- Exposição a baixas doses de chumbo parece não alterar a reatividade vascular da aorta aos vasodilatadores acetilcolina e nitroprussiato de sódio;
- 4- Exposição a baixas doses de chumbo em um período de 2 meses não produziram alterações histológicas.

## *REFERÊNCIAS*

---

## REFERÊNCIAS

- [1] Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev* 2006;11 (1):2-22.
- [2] Tong S, von Schirnding YE, Prapamontol T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull World Health Organ* 2000;78 (9):1068-77.
- [3] Gidlow DA. Lead toxicity. *Occup Med (Lond)* 2004;54 (2):76-81.
- [4] Brody DJ, Pirkle JL, Kramer RA, Flegal KM, Matte TD, Gunter EW, Paschal DC. Blood lead levels in the US population. Phase 1 of the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1988 to 1991). *Jama* 1994;272 (4):277-83.
- [5] Levin SM, Goldberg M, Doucette JT. The effect of the OSHA lead exposure in construction standard on blood lead levels among iron workers employed in bridge rehabilitation. *Am J Ind Med* 1997;31 (3):303-9.
- [6] Tepper A, Mueller C, Singal M, Sagar K. Blood pressure, left ventricular mass, and lead exposure in battery manufacturing workers. *Am J Ind Med* 2001;40 (1):63-72.
- [7] World Health Organization. Working group on Inorganic Air Pollutants. Geneva 1994.
- [8] Rabinowitz MB. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect* 1991;91:33-7.
- [9] Fulton M, Raab G, Thomson G, Laxen D, Hunter R, Hepburn W. Influence of blood lead on the ability and attainment of children in Edinburgh. *Lancet* 1987;1 (8544):1221-6.

- 
- [10] Stewart WF, Schwartz BS, Davatzikos C, Shen D, Liu D, Wu X, Todd AC, Shi W, Bassett S, Youssef D. Past adult lead exposure is linked to neurodegeneration measured by brain MRI. *Neurology* 2006;66 (10):1476-84.
- [11] Wang X, Yang Y, Xu S. The effect of occupational exposure to metals on the nervous system function in welders. *J Occup Health* 2006;48 (2):100-6.
- [12] Goyer RA. Lead toxicity: current concerns. *Environ Health Perspect* 1993;100:177-87.
- [13] Schwartz J, Angle C, Pitcher H. Relationship between childhood blood lead levels and stature. *Pediatrics* 1986;77 (3):281-8.
- [14] Winneke G, Altmann L, Kramer U, Turfeld M, Behler R, Gutsmuths FJ, Mangold M. Neurobehavioral and neurophysiological observations in six year old children with low lead levels in East and West Germany. *Neurotoxicology* 1994;15 (3):705-13. Write to the Help Desk NCBI | NLM | NIH Department of Health & Human Services Privacy Statement | Freedom of Information Act | Disclaimer.
- [15] Hogstedt C, Hane M, Agrell A, Bodin L. Neuropsychological test results and symptoms among workers with well-defined long-term exposure to lead. *Br J Ind Med* 1983;40 (1):99-105.
- [16] Prentice RC, Kopp SJ. Cardiotoxicity of lead at various perfusate calcium concentrations: functional and metabolic responses of the perfused rat heart. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;81 (3 Pt 1):491-501.
- [17] 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 (5):594-9.

- 
- [18] Selevan SG, Landrigan PJ, Stern FB, Jones JH. Mortality of lead smelter workers. *Am J Epidemiol* 1985;122 (4):673-83.
- [19] Neuberger JS, Mulhall M, Pomatto MC, Sheverbush J, Hassanein RS. Health problems in Galena, Kansas: a heavy metal mining Superfund site. *Sci Total Environ* 1990;94 (3):261-72.
- [20] Lustberg M, Silbergeld E. Blood lead levels and mortality. *Arch Intern Med* 2002;162 (21):2443-9.
- [21] Martin D, Glass TA, Bandeen-Roche K, Todd AC, Shi W, Schwartz BS. Association of blood lead and tibia lead with blood pressure and hypertension in a community sample of older adults. *Am J Epidemiol* 2006;163 (5):467-78.
- [22] Apostoli P, Corulli A, Carta P, Soleo L, DiLorenzo L, Abritti G, Cabassi A, DePalma G, Ganzi A, DeiCas L, Mutti A. [Lead and blood pressure]. *G Ital Med Lav Ergon* 2005;27 Suppl 1:22-32.
- [23] Kasperczyk S, Dziwisz M, Kasperczyk A, Birkner E. [Influence of lead exposure on arterial hypertension]. *Wiad Lek* 2002;55 Suppl 1:230-4.
- [24] Tsao DA, Yu HS, Cheng JT, Ho CK, Chang HR. The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;164 (2):127-33.
- [25] Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, Qiao N, Di Gioacchino M, Grilli A, Felaco M. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci* 2000;68 (4):401-15.
- [26] 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. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298 (2):679-85.



- 
- [27] 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 (2):185-92.
- [28] Chai SS, Webb RC. Effects of lead on vascular reactivity. *Environ Health Perspect* 1988;78:85-9.
- [29] Markovac J, Goldstein GW. Lead activates protein kinase C in immature rat brain microvessels. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;96 (1):14-23.
- [30] Long GJ, Rosen JF, Schanne FA. Lead activation of protein kinase C from rat brain. Determination of free calcium, lead, and zinc by  $^{19}\text{F}$  NMR. *J Biol Chem* 1994;269 (2):834-7.
- [31] Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N, Larijani B, Khoshbaten A. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. *Toxicol Lett* 2004;153 (2):233-8.
- [32] Carmignani M, Boscolo P, Poma A, Volpe AR. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacology* 1999;44 (1-2):105-10.
- [33] Khalil-Manesh F, Gonick HC, Weiler EW, Prins B, Weber MA, Purdy RE. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am J Hypertens* 1993;6 (9):723-9.
- [34] 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 (4):1042-6.

- 
- [35] Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am J Hypertens* 2000;13 (5 Pt 1):552-5.
- [36] Vaziri ND, Ding Y. Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells : role of superoxide. *Hypertension* 2001;37 (2):223-6.
- [37] Webb RC, Winkquist RJ, Victory W, Vander AJ. In vivo and in vitro effects of lead on vascular reactivity in rats. *Am J Physiol* 1981;241 (2):H211-6.
- [38] Skoczynska A, Wrobel J, Andrzejak R. Lead-cadmium interaction effect on the responsiveness of rat mesenteric vessels to norepinephrine and angiotensin II. *Toxicology* 2001;162 (3):157-70.
- [39] Purdy RE, Smith JR, Ding Y, Oveisi F, Vaziri ND, Gonick HC. Lead-induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. *Am J Hypertens* 1997;10 (9 Pt 1):997-1003.
- [40] 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 (1):31-7.
- [41] Marques M, Millas I, Jimenez A, Garcia-Colis E, Rodriguez-Feo JA, Velasco S, Barrientos A, Casado S, Lopez-Farre A. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertension in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001;12 (12):2594-600.
- [42] Shelkovnikov SA, Gonick HC. Influence of lead on rat thoracic aorta contraction and relaxation. *Am J Hypertens* 2001;14 (9 Pt 1):873-8.

- 
- [43] Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2002;3 (4):409-21.
- [44] Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3 (3):207-14.
- [45] Donnelly R, Collinson DJ, Manning G. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J Hypertens* 2003;21 (9):1627-30.
- [46] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92 (8):827-39.
- [47] Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC, Jr. Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 2004;9 (1):53-61.
- [48] Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* 2004;37 (6):768-84.
- [49] Farias E, Ranuncolo S, Cresta C, Specterman S, Armanasco E, Varela M, Lastiri J, Pallotta MG, Bal de Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int J Cancer* 2000;89 (4):389-94.
- [50] Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274 (31):21491-4.
- [51] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90 (3):251-62.
- [52] Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003;170 (2):191-203.

- 
- [53] Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, Gareth Beevers D, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens* 2004;17 (9):764-9.
- [54] Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90 (5):520-30.
- [55] Lehoux S, Tedgui A. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension* 1998;32 (2):338-45.
- [56] Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 2005;45 (3):432-7. Epub 2005 Jan 17.
- [57] Dao HH, Lemay J, de Champlain J, deBlois D, Moreau P. Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J Hypertens* 2001;19 (11):1965-73.
- [58] Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. *Hypertension* 1996;28 (3):505-6.
- [59] Zervoudaki A, Economou E, Stefanadis C, Pitsavos C, Tsioufis K, Aggeli C, Vasiliadou K, Toutouza M, Toutouzas P. Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. *J Hum Hypertens* 2003;17 (2):119-24.
- [60] Luscher TF, Vanhoutte PM, Raij L. Antihypertensive treatment normalizes decreased endothelium-dependent relaxations in rats with salt-induced hypertension. *Hypertension* 1987;9 (6 Pt 2):III193-7.

- 
- [61] Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;323 (1):22-7.
- [62] Morishita R, Higaki J, Miyazaki M, Ogihara T. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 1992;19 (2 Suppl):II62-7.
- [63] Yamada E, Hazama F, Amano S, Sasahara M, Kataoka H. Elastase, collagenase, and cathepsin D activities in the aortas of spontaneously hypertensive and renal hypertensive rats. *Exp Mol Pathol* 1986;44 (2):147-56.
- [64] Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Spallarossa P, Olivotti L, Rossettin P, Barsotti A, Ghigliotti G. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003;33 (8):648-56.
- [65] Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 2004;35 (1):57-63.
- [66] Johnson C, Galis ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24 (1):54-60. Epub 2003 Oct 9.
- [67] Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, Stetler-Stevenson WG, Froehlich J, Lakatta EG. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1996;148 (1):121-8.
- [68] Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res* 1994;75 (3):539-45.

- 
- [69] Yasmin, Wallace S, McEniery CM, Dakham Z, Pusalkar P, Maki-Petaja KAshby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25 (2):372.
- [70] Mujumdar VS, Tyagi SC. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J Hypertens* 1999;17 (2):261-70.
- [71] Camp TM, Smiley LM, Hayden MR, Tyagi SC. Mechanism of matrix accumulation and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2003;21 (9):1719-27.
- [72] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94 (6):2493-503.
- [73] Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;37 (6):375-536.
- [74] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107 (12):1579-85.
- [75] Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003;106 (5):745-51.

- 
- [76] Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47 (1):117-22.
- [77] Carome MA, Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, Yang CW, Stetler-Stevenson WG, Reponen P, Tryggvason K, Striker GE. Assessment of 72-kilodalton gelatinase and TIMP-1 gene expression in normal and sclerotic murine glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 1994;5 (6):1391-9.
- [78] Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, Gluzband Y, Ryu WS, Li Z, Stetler-Stevenson W, Nater C, Froehlich JP, Lakatta EG, Cheng L. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* 1998;97 (1):82-90.
- [79] Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999;85 (10):906-11.
- [80] Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000;87 (8):670-6.
- [81] Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, Cuttitta F. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 2004;383 (Pt. 3):413-8.

- 
- [82] Zhou Y, Zanao RA, Barbosa F, Parsons PJ, Krug FJ. Investigations on a W-Rh permanent modifier for the detection of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta part B* 2002;57:1291-300.
- [83] Lima EC, Barbosa F, Jr., Krug FJ. Lead determination in slurries of biological materials by ETAAS using a W-Rh permanent modifier. *Fresenius J Anal Chem* 2001;369 (6):496-501.
- [84] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193 (1):265-75.
- [85] Ding Y, Vaziri ND, Gonick HC. Lead-induced hypertension. II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ Res* 1998;76 (2):107-13.
- [86] Boscolo P, Carmignani M. Neurohumoral blood pressure regulation in lead exposure. *Environ Health Perspect* 1988;78:101-6.
- [87] Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218 (2):325-9.
- [88] Jin Y, Liao Y, Lu C, Li G, Yu F, Zhi X, Xu J, Liu S, Liu M, Yang J. Health effects in children aged 3-6 years induced by environmental lead exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006;63 (2):313-7.
- [89] Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* 2000;29 (10):927-45.
- [90] 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 (6):2329-36.
- [91] Vaziri ND, Sica DA. Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *Curr Hypertens Rep* 2004;6 (4):314-20.



- 
- [92] de Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* 2000;16 (2):103-8. 17: Laemmli UK. Cleavage of structural protei...[PMID:5432063]Related Articles, Links.
- [93] Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials* 2001;22 (14):2025-30.
- [94] Gerlach RF, de Souza AP, Cury JA, Line SR. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *Eur J Oral Sci* 2000;108 (4):327-34.
- [95] Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS, Golub LM, Greenwald RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* 2001;8 (3):305-16.
- [96] Hao L, Nishimura T, Wo H, Fernandez-Patron C. Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26 (4):819-25.
- [97] Oishi H, Nakashima M, Totoki T, Tomokuni K. Chronic lead exposure may inhibit endothelium-dependent hyperpolarizing factor in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28 (4):558-63.
- [98] Laurent S, Vanhoutte P, Caverio I, Chabrier PE, Dupuis B, Elghozi JL, Hamon G, Janiak P, Juillet Y, Kher A, Koen R, Madonna O, Maffrand JP, Pruneau D, Thuillez C. The arterial wall: a new pharmacological and therapeutic target. *Fundam Clin Pharmacol* 1996;10 (3):243-57.

- [99] Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 2000;102 (23):2861-6.