

O sistema de estresse coordena a resposta adaptativa ao estímulo estressor e desempenha papel importante na manutenção da homeostase frente a condições estressogênicas. A ativação desse sistema leva a alterações comportamentais e periféricas que aumentam a habilidade do organismo de se adaptar e, portanto, aumentam as suas chances de sobrevivência. Respostas inadequadas ou prolongadas aos estressores podem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento e resultar numa grande variedade de desordens de natureza endócrina, metabólica, cardiovascular ou comportamental.

A exposição ao estresse determina respostas adaptativas tanto sobre a reatividade vascular quanto sobre o comportamento de ratos. Ainda, o comportamento de ratos não estressados ou submetidos ao estresse pode sofrer influência de experiências estressogênicas perinatais. Finalmente, a resposta ao estresse pode ser alterada por estados patológicos particulares, como hipertensão, intoxicação por metais pesados como o chumbo (Pb), entre outros fatores.

Os objetivos foram investigar: 1) as alterações na resposta vascular e no comportamento de ratos jovens e adultos submetidos ou não ao estresse agudo e/ou crônico em diferentes fases do desenvolvimento; 2) se a habilidade em gerenciar o estresse difere entre proles submetidas ou não à intoxicação perinatal por Pb e 3) a participação do endotélio na resposta vascular adaptativa ao estresse em ratos intoxicados ou não.

Foram realizadas curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA) em aortas torácicas com (+E) e sem endotélio (-E), de ratos jovens (23 dias) e adultos (70 dias) intoxicados perinatalmente por Pb ou não e submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização (IM, 2h imediatamente antes dos protocolos experimentais) e/ou crônico de separação materna (SM, 4h/dia por 3 semanas consecutivas). O comportamento dos animais foi avaliado através dos testes de campo aberto (CA) e

labirinto em cruz elevado (LCE) em grupos experimentais semelhantes àqueles descritos para avaliação da reatividade vascular.

Em ratos jovens intoxicados por Pb, o estresse agudo de IM ou esta condição associada ao estresse crônico de SM, mas não a exposição à SM isoladamente, determinaram uma diminuição da RM à NA de aorta +E quando comparados aos ratos intoxicados com 23 dias e não submetidos ao estresse.

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração na sensibilidade da aorta à NA de aorta +E em animais de 23 dias de idade.

Os valores de RM à NA de aorta +E de ratos adultos não intoxicados e submetidos ao estresse agudo de IM, e esta condição associada à SM, mas não a exposição à SM isoladamente, foram menores quando comparados aos ratos não intoxicados e não submetidos ao estresse. A exposição perinatal ao Pb determinou, em ratos adultos, aumento significativo da RM à NA da aorta +E, quando comparados ao respectivo grupo não intoxicado.

Em ratos com 70 dias de idade intoxicados por Pb, apenas o estresse agudo de IM, mas não esta condição associada ao estresse crônico de SM ou à SM isoladamente, diminuíram a RM à NA de aorta +E quando comparados aos ratos intoxicados adultos e não submetidos ao estresse.

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração na sensibilidade da aorta com endotélio à NA em animais de 70 dias de idade.

Finalmente, nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração de reatividade (RM e sensibilidade) da aorta à NA em preparações -E de ratos recém-desmamados e adultos. Ainda, a remoção do endotélio determinou aumento de RM e de sensibilidade à NA em aorta de ratos recém-desmamados e adultos submetidos aos diferentes protocolos experimentais, exceto em aorta de

ratos adultos intoxicados e submetidos ou não à SM e esta condição associada ao estresse agudo de IM.

No teste do CA, tanto a SM como a SM associada à IM determinaram um aumento na atividade geral de ratos não intoxicados recém-desmamados, verificado através do parâmetro locomoção, quando comparados aos ratos não estressados e não intoxicados na mesma idade. Ainda, os ratos jovens intoxicados por Pb também aumentaram sua locomoção quando comparados ao respectivo grupo controle.

No parâmetro levantar não houve diferenças entre os diferentes grupos experimentais na idade de 23 dias, exceto no grupo intoxicado e submetido ao estresse agudo que mostrou uma diminuição deste parâmetro.

No parâmetro limpeza, os ratos jovens intoxicados por Pb e submetidos ao estresse de IM apresentaram um aumento deste parâmetro quando comparados aos ratos intoxicados com 23 dias não estressados. Entretanto, os ratos jovens intoxicados não estressados apresentaram uma diminuição deste parâmetro quando comparados aos ratos não intoxicados com 23 dias não estressados.

Na idade adulta, o estresse de SM determinou aumento na locomoção de ratos não intoxicados quando comparado com o grupo não estressado e não intoxicado. Ratos adultos intoxicados e submetidos ao estresse agudo de IM mostraram diminuição do parâmetro levantar em relação aos ratos adultos intoxicados não estressados. Por sua vez, ratos adultos não intoxicados e submetidos ao estresse agudo de IM e esta condição associada à SM mostraram aumento do parâmetro levantar em relação aos ratos adultos não intoxicados não estressados.

A intoxicação perinatal diminuiu o tempo de limpeza em ratos adultos não estressados quando comparados com ratos não intoxicados e não estressados. Uma diminuição deste parâmetro foi ainda observada e ratos adultos não

intoxicados e submetidos ao estresse agudo de IM e esta condição associada à SM quando comparado com ratos adultos não intoxicados e não estressados.

No teste do LCE, ratos de 23 dias de idade intoxicados ou não e submetidos à SM ou esta condição associada ao estresse agudo de IM mostraram aumento dos índices %NA e a %TA quando comparado ao respectivo grupo não estressado. Apenas as diferenças no índice %TA se mantêm na vida adulta.

O presente estudo sugere que a expressão da resposta vascular adaptativa aos diferentes protocolos de estresse foi dependente da idade do animal e tanto a resposta vascular adaptativa ao estresse quanto a hiperreatividade da aorta ao Pb mostraram-se dependentes da integridade da célula endotelial e não envolveram alterações na musculatura lisa vascular.

A exposição ao chumbo: comprometeu, mas não aboliu a expressão da resposta vascular adaptativa ao estresse; determinou hipertensão arterial em ratos recém-desmamados e adultos que esteve associada a hiperreatividade da aorta torácica apenas em ratos adultos; e aumentou o comportamento exploratório de ratos recém-desmamados que não se prolongou na vida adulta.

Na dependência do protocolo utilizado, o estresse aumentou o comportamento exploratório que não foi alterado pela exposição perinatal ao Pb e não se prolongou na vida adulta.

O estresse de separação materna mostrou efeito ansiolítico em ratos, independentemente da idade e da exposição perinatal ao Pb.

The stress response is subserved by the stress system which plays a key role in the maintenance of homeostasis. The human body and mind react to stress by activating a complex repertoire of physiologic and behavioral central nervous system and peripheral adaptive responses, which, if inadequate or excessive and/or prolonged, may affect personality developmental and behavior, and may have adverse consequences on physiologic functions, such as growth, metabolism, circulation and reproduction. The exposure to stressors may induce alterations in the cardiovascular system and behavior, which are related to adaptative processes that can be modified by previous exposure to environmental hazard like plumb or hypertension.

The objective was to investigate: the alterations of both vascular reactivity and behavior of 23 days-old and 70 days-old rats exposed to lead during pregnancy and postnatal period and submitted or not to acute and chronic stress; and if the endothelium of intoxicated rats modulate the vascular adaptative response to stress.

Concentration effect curves to noradrenaline were obtained in aorta, with and without endothelium of weaned and adult rats of rats exposed or not to Pb and submitted or not to acute (immobilization) or chronic stress (maternal separation, for 4h during 3 weeks), or both. The behavior was measured by open-field and elevated plus-maze.

Pb exposed rats showed a decreased vascular reactivity to noradrenaline when submitted to acute stress or acute stress plus chronic one compared with weaned rats exposed to Pb but not to stress conditions.

No reactivity alteration in the sensitivity to noradrenaline was observed in aorta with endothelium from weaned rats exposed to the different protocols.

The exposure of non intoxicated rats to acute stress and chronic plus acute stress determined a decrease in the reactivity to noradrenaline of intact aorta of rats at the age of 70 days compared to non intoxicated and non stressed rats. Perinatal exposure to Pb determined an increase in the reactivity to noradrenaline of intact aorta of rats at the age of 70 days when compared to non intoxicated group.

Adult rats exposed to Pb and submitted to acute stress had a lower maximum response to noradrenaline compared to intoxicated rats.

No reactivity alteration to noradrenaline (maximum response and sensibility) was observed in aorta without endothelium from adult rats and weaned rats exposed to the different protocols.

The weaned rats submitted to maternal separation showed an increase in locomotor activity when tested in open-field compared to non exposed to Pb and non stressed rats. Pb exposed rats increased their locomotor activity compared to non intoxicated rats.

The weaned rats exposed to Pb during perinatal period and submitted to acute stress increased grooming compared to intoxicated rats.

Adult rats non intoxicated and submitted to maternal separation showed an increased locomotor activity compared to non stressed and non intoxicated rats. Rearing was decreased in intoxicated adult rats submitted to acute stress related to respective control group.

Pb exposure decreased grooming in non stressed adult rats related to non intoxicated and non stressed ones.

On elevated plus maze weaned rats exposed or not to Pb and submitted to maternal separation or maternal separation plus acute stress showed an increase on %NA and %TA related to the respective non stressed group. Only differences on %TA were kept until adulthood.

Thus, the present study suggests that vascular adaptative response to stress was dependent of animal age and the integrity of endothelial cell without changes in vascular smooth muscle.

The exposure to Pb compromised but not abolished vascular adaptative response to stress; determined arterial hypertension with increased reactivity of intact aorta to noradrenaline from adult rats; and increased exploratory behavior of weaned rats that didn't remain until adulthood.

Maternal separation seems to be anxyolytic in rats, independently of age or exposure to Pb.

Resumo	
Abstract	
Introdução .....	14
Objetivos .....	26
Material e Métodos .....	27
Resultados.....	35
Discussão .....	53
Conclusões .....	66
Referências Bibliográficas .....	67

## **Chumbo:**

O chumbo (Pb) é um metal pesado encontrado naturalmente na crosta terrestre em concentrações que podem variar entre 10 e 20 mg.Kg<sup>-1</sup> de solo. As maiores fontes naturais de Pb são emissões vulcânicas e intemperismo geoquímico (Budavari *et al.*, 1989; WHO, 1995). Na natureza, existem jazidas de chumbo e o sulfeto de chumbo ou galena (PbS) é o mineral do chumbo mais comumente encontrado, sendo a principal matéria-prima em processos que produzem Pb primário para diversas aplicações.

A mineração de Pb já era conhecida pelos gregos e romanos. Durante a Revolução Industrial e nos princípios do século XX ocorreu um maior incremento da produção e utilização deste metal, particularmente, com o seu uso como aditivo de gasolina e produção de baterias para automóveis. Castelos e catedrais antigas da Europa contêm quantidades consideráveis de chumbo aplicadas em peças decorativas, a exemplo de tetos, tubulações e janelas (Smith, 1998).

A origem ambiental do chumbo está relacionada a diversas fontes de contaminação. Apesar de não ser mais utilizado como antidetonante na gasolina, outras fontes devem ser consideradas do ponto de vista ambiental como: revestimento de metais, tintas, fertilizantes, pigmentos, esmaltes, cerâmicas vitrificadas, soldaduras de embalagens de alimentos, solo contaminado por indústrias emissoras de chumbo, cosméticos, etc. Casas e prédios antigos, que possuam encanamentos de metal e soldas nos canos, podem expor seus moradores à contaminação por chumbo através da água ingerida ou através de poeira no caso de pintura de paredes realizada com tintas à base de chumbo (Freitas, 2001). Emissões industriais, principalmente de indústrias que trabalham com mineração, fundição, refino e manufatura de chumbo poluem a atmosfera. Brinquedos e artigos

de papelaria como lápis de cor, livros coloridos e estojos podem expor as crianças à intoxicação pelo chumbo (Shen *et al.*, 1996). Foi relatada também, contaminação por chumbo em massa de vidraceiro, cimento, drogas ilícitas intravenosas e jóias (Graeme & Pollack, 1998).

No Brasil, há uma tendência iniciada na década de 90 de substituição do chumbo como pigmento das tintas. Atualmente, as tintas produzidas para uso doméstico são isentas de chumbo. Entretanto, o chumbo ainda é utilizado como anticorrosivo (zarcão) de outros metais em portões de ferro, geladeiras, carros, fogões, bicicletas, etc.

A partir de diversas fontes, o chumbo se deposita no solo e vai alcançando altas concentrações, podendo contaminar a água e a vegetação, além de ser mobilizado pelo vento até as vias respiratórias (Jin *et al.*, 1997). O chumbo é estável, não se dissipa ou biodegrada e, portanto, pode se constituir em fonte de exposição por longos períodos.

A absorção do chumbo pode ocorrer por via digestiva e respiratória (partículas finas). A absorção pela pele só é referida para o acetato de chumbo. Esta absorção é diferencial entre crianças e adultos e aumenta quando há deficiência de ferro, cálcio e zinco. No sangue, a sua duração média é de 25 dias. Em torno de 95% do Pb absorvido deposita-se nos ossos e dentes; e os 5% restantes nos tecidos moles e sangue. Do chumbo no sangue, 1% se encontra no plasma, disponível para os tecidos e 99% associado à hemoglobina nos eritrócitos. A meia-vida do Pb nos tecidos moles é em torno de 40 dias e nos ossos mais de 25 anos.

A intoxicação pelo chumbo, também chamada de saturnismo, é considerada a doença ocupacional mais antiga e pode ser uma fonte potencial de: anorexia, constipação, paralisia, nefropatia, hipertensão, distúrbios do sistema nervoso central,

hematológico e imunológico. Danos no desenvolvimento cognitivo e comportamental em bebês e crianças jovens representam os efeitos de maior relevância. Por essa razão, crianças menores de 3 anos são mais sensíveis aos efeitos prejudiciais do chumbo, já que nessa fase da vida muitos sistemas do organismo ainda estão em processo de maturação, principalmente o sistema nervoso central (Adonaylo & Oteiza, 1999).

As alterações de pressão arterial causadas pelo Pb são devidas, principalmente, à ação desse metal no coração, nos vasos, nos rins e no sistema renina-angiotensina-aldosterona (Zerbino *et al.*, 1990; Novak *et al.*, 1995; Taylor, 1996; Carmignani *et al.*, 1999).

Aumento de reatividade à noradrenalina foi observado em artéria caudal, aorta e leito mesentérico de ratos Wistar (Webb *et al.*, 1981; Skoczynska *et al.*, 1986, Malvezzi & Cordellini, 2001) e artéria coronária de porco intoxicados pelo Pb (Kopp *et al.*, 1988). Entretanto, Khalil-Manesh *et al.* (1994) não observaram qualquer alteração de reatividade em artéria de ratos Sprague-Dawley intoxicados pelo Pb.

Sabe-se que as alterações de reatividade vascular induzidas pelo Pb podem ser determinadas por uma disfunção tanto do músculo liso vascular quanto da célula endotelial ou ainda uma associação de ambas (Malvezzi & Cordellini, 2001). Grizzo e Cordellini (2008) relataram alterações na produção e/ou liberação basal e estimulada de fatores de relaxamento derivados do endotélio e de fatores de contração liberados a partir do metabolismo do ácido araquidônico, como produto da via da ciclooxigenase em animais expostos perinatalmente ao Pb.

O Pb e outros metais como mercúrio e cobalto inibem a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos *in vitro* (Tian & Lawrence, 1995). Inibição da sintase de NO (NOS) pelo Pb foi também descrita em células endoteliais cerebrais (Blazka *et*

*al.* 1994, Mittal *et al.*, 1995) e neurônios (Selvin-Testa *et al.*, 1997). Ainda, o Pb pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio que, além da atividade vasoconstritora, participam na degradação do NO (Gonick *et al.*, 1997, Ding *et al.*, 1998). Ao lado do NO, a célula endotelial produz e libera o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). A exposição crônica ao Pb inibe a hiperpolarização dependente do endotélio induzida pela acetilcolina (ACh) em artéria mesentérica de ratos, sugerindo que esse metal é um inibidor do EDHF (Oishi *et al.*, 1996). Os efeitos do Pb resultam ainda em alterações na síntese e/ou liberação da endotelina, principal fator de contração derivado do endotélio, e distúrbios da síntese de prostaciclina (Stojek & Skoczynska, 2003).

Os efeitos do Pb sobre a reatividade vascular podem ser devidos, ainda, a uma ação direta deste metal sobre o músculo liso vascular. Sabe-se que o Pb interfere em processos regulatórios que envolvem o íon cálcio (Favalli *et al.*, 1977; Piccinini *et al.*, 1977; Webb *et al.*, 1981). O Pb pode: bloquear correntes de  $Ca^{+2}$  sensíveis à voltagem, o que determina um aumento na concentração de  $Ca^{+2}$  intracelular (Kopp *et al.*, 1988; Watts *et al.*, 1995; Carmignani *et al.*, 2000), interagir com a proteína quinase C (Novak & Banks, 1995) e substituir o  $Ca^{+2}$  na ativação da calmodulina (Richardt *et al.*, 1986; Habermann *et al.*, 1993). Ainda, este metal pode inibir o transporte enzimático, Na,K-ATPase (Weiler *et al.*, 1990) (que contém grupo sulfidril que se liga facilmente ao Pb) (Hart & Titus, 1973), prejudicando o transporte de sódio e, secundariamente, a saída de cálcio da célula muscular lisa.

O Pb parece ainda aumentar a atividade simpática por mecanismos centrais, aumentando conseqüentemente os níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina (Carmignani *et al.*, 2000). Ainda, a exposição crônica ao Pb aumenta drasticamente as atividades da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e cininase II e os níveis

de aldosterona (Carmignani *et al.*, 1999; Vaziri, 2002) e acelera a proliferação da célula muscular lisa (Stojek & Skoczynska, 2003).

Atualmente são reconhecidos diversos fatores que podem aumentar o risco de hipertensão arterial, dentre eles a idade, o histórico familiar de hipertensão, o excesso de peso, as dietas ricas em sal, o sedentarismo e, mais recentemente, o estresse. Em estados de gravidez, lactação, doenças crônicas e estresse esse metal pode ser mobilizado dos ossos e se constituir em fonte de elevação de seus níveis sanguíneos (Freitas, 2001).

Dessa maneira, é imprescindível o conhecimento da adaptação circulatória ao estresse em indivíduos com sobrecarga de Pb.

### **Estresse:**

Experimentos de Hans Selye datados do início do século XX auxiliaram na compreensão do termo estresse. Ao pesquisar os efeitos de um extrato químico, o cientista observou o surgimento de úlceras gastrointestinais, atrofia do sistema imune e aumento das glândulas adrenais em ratos. Porém, para sua surpresa, os ratos do grupo controle, que haviam recebido injeções de solução salina, apresentaram alterações semelhantes. Selye concluiu que tais alterações estavam relacionadas à aplicação das repetidas injeções e não aos efeitos do extrato químico. Encontrou os mesmos resultados expondo animais ao frio, patógenos, toxinas ou ruído (Selye, 1936). Com base nestes resultados, Selye (1936) descreveu a Síndrome Geral da Adaptação, que representava uma reação geral e inespecífica do organismo a estímulos aversivos ou a situações desconhecidas que pudessem ameaçar a homeostasia, cuja finalidade seria a adaptação do animal à nova condição (Selye, 1936; Koolhas *et al.*, 1999). Segundo a definição original, proposta

por Selye (1936), estresse representa a resposta do organismo, enquanto que seu agente causador é definido como estímulo ou agente estressor (Pickering, 1981; Pacak *et al.*, 1998).

Esta reação é trifásica: a fase de alarme ou excitação ocorre quando o organismo reconhece o estímulo como estressogênico e caracteriza-se por aumento da capacidade orgânica em responder ao agente agressor. Se o estímulo for mantido, o organismo desenvolve mecanismos adaptativos (fase de resistência). Quando essa adaptação não ocorre, desenvolve-se a fase de exaustão, na qual o organismo torna-se susceptível a patologias, como por exemplo, distúrbios renais, cardiovasculares, gastrintestinais e/ou imunológicos (Selye, 1936).

Porém, a reação de estresse visa à manutenção da homeostase (Pacak, 2000) e tem sido fundamental para a seleção natural, aumentando a capacidade de sobrevivência dos organismos (Nesse & Young, 2000). A finalidade desta reação é a adaptação dos seres vivos frente aos inúmeros estímulos ambientais a que estão constantemente expostos (Chrousos, 1998; Koolhaas *et al.*, 1999).

Embora Hans Selye (1936) tenha descrito a reação de estresse como sendo uma resposta inespecífica, este postulado foi revisto por diferentes autores, segundo os quais, a intensidade das respostas e as estruturas ativadas variam com a qualidade e intensidade do estímulo estressor (Mason, 1968; Pacak *et al.*, 1998).

Frente a um estressor, a alteração fisiológica inicial decorre da decodificação da informação sensorial pelo sistema límbico, em associação com áreas corticais do cérebro (Eliot, 1992). As principais alterações centrais incluem a facilitação de vias neurais relacionadas ao estado de alerta, cognição e inibição de outras como as do comportamento sexual e do crescimento (Tsigos & Chrousos, 2002). Dentre as inúmeras alterações hormonais desencadeadas por estímulos estressores, o que

caracteriza a reação ao estresse é a ativação do sistema de estresse primário, que leva à ativação do sistema nervoso simpático-medula adrenal, resultando em aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas: noradrenalina e adrenalina (Axelrod & Reisine, 1984; Natelson *et al.*, 1988; Chrousos, 1998; Koob, 1999) e simultaneamente há a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), resultando no aumento dos níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e de cortisol, no homem, e de corticosterona, em ratos (Axelrod & Reisine, 1984; Chrousos, 1998; Koob, 1999).

Os agentes estressores podem ser de natureza física, química, social, psicológica ou de ordem interna (metabólica) e podem ser classificados de acordo com suas características, duração e intensidade. Porém esta classificação dos tipos de agentes estressores não indica a presença de um único tipo, apenas estabelece a predominância de um sobre os demais, pois a maioria dos estressores utilizados na pesquisa animal inclui estímulos que apresentam simultaneamente componentes físicos, químicos e emocionais (Pacak & McCarty, 2000).

Diferentes estressores causam uma heterogeneidade das respostas neurais, neuroendócrinas e comportamentais evocadas, pois dependendo do modelo utilizado poderá ocorrer ativação de estruturas cerebrais diferentes em circuitos neuronais distintos (Palkovits, 2000), e as alterações adaptativas que levam ao redirecionamento das fontes de energia e mudanças no padrão de comportamento, durante a exposição ao estímulo estressor, dependem das estruturas cerebrais e vias neurais ativadas.

Um dos modelos de estresse muito utilizado é a imobilização, sendo que a duração e a frequência do estímulo variam conforme os diversos protocolos

experimentais. A imobilização é um estressor complexo e apresenta componentes físicos e psicológicos.

A separação materna, como modelo de estresse crônico, quando imposta logo na primeira semana pós-natal pode afetar diferencialmente a taxa de crescimento, o padrão de resposta do eixo HPA e o ritmo circadiano dos animais na idade adulta (Yamazaki *et al.*, 2005).

Com relação à duração, os estímulos estressores podem ser agudos ou crônicos. As respostas adaptativas a um estressor agudo incluem processos fisiológicos e comportamentais que são essenciais para restabelecer a homeostasia. Durante uma resposta ao estresse agudo, os processos fisiológicos são importantes para inibir ou estimular a mobilização e redirecionamento das reservas energéticas entre os vários órgãos (Pacak & McCarty, 2000). Nakashima *et al.* (2002) submeteram animais a sessão única de imobilização e observaram aumento nos níveis de ACTH até seis dias após o estresse.

Outro fator que pode influenciar a resposta orgânica aos estímulos estressores é a idade e a literatura relata a complexa interação entre estresse e envelhecimento através de uma maior e mais prolongada liberação de glicocorticóides em indivíduos velhos em relação a jovens. Esta diferença na responsividade cortical está relacionada à diminuição da atividade do sistema de controle da secreção de glicocorticóides em ratos velhos (McEwen, 2007).

Muitos fatores individuais, tais como características genéticas (Marple *et al.*, 1972, King *et al.*, 1999) e sexo (McEwen, 2000), também influenciam a reação de estresse. Entretanto, o fator mais importante parece ser a percepção que o indivíduo tem do estímulo que lhe é apresentado. Esta percepção depende das experiências

previamente vivenciadas pelo mesmo ou filogeneticamente adquiridas pela espécie, e da novidade ou previsibilidade do estímulo (Griffin, 1989; Vogel & Jehsh, 1998).

A intensidade de reação ao estresse é determinada pela inter-relação entre a ativação do sistema de estresse pelo organismo em resposta ao estímulo estressor e a ativação de "sistemas limitantes de estresse", nos quais o NO faz parte (Malyshev & Manukhina, 1998). Ainda, diferentes estímulos estressores resultam em respostas diferenciadas, estando o NO envolvido não apenas no sistema protetor do organismo, mas também em mecanismos de danos específicos durante o estresse. Dependendo da natureza do fator estressante, o dano pode estar relacionado com uma hipo ou hiperprodução de NO (Malyshev & Manukhina, 1998).

O eixo HPA, que é o centro para integração das respostas comportamentais e endócrinas do indivíduo ao estresse, parece altamente sensível à exposição ao excesso de glicocorticóides durante o desenvolvimento. Da mesma forma, Rots *et al.* (1996) mostraram que a separação materna de ratos neonatos determina alterações na regulação do eixo HPA não apenas imediatamente após a separação, mas também na fase jovem-adulto. Ratos expostos ao estresse de manipulação nos estágios iniciais da vida pós-natal apresentam, na vida adulta, um aumento na capacidade de lidar com o novo, o que reflete um menor grau de ansiedade (Biagini *et al.*, 1998). Alterações na fase precoce do desenvolvimento podem, ainda, ser a causa de certas desordens psiquiátricas como: esquizofrenia e depressão (Lapiz *et al.*, 2001).

O curso das respostas orgânicas ao estresse é prontamente influenciado pelas condições do meio e pelos estímulos aos quais os animais devem adaptar-se previamente. Assim, não é tanto a dose na qual o estímulo é dado que o faz

estressogênico, mas a condição do animal no momento em que o estímulo é aplicado.

O sistema nervoso apresenta períodos de vulnerabilidade durante o desenvolvimento, que são sensíveis às agressões do meio. Numerosas evidências demonstram que o desenvolvimento neural se estende do período embrionário até o período pós-natal. Os roedores têm um desenvolvimento mais considerável do sistema nervoso no período pós-natal, enquanto que os humanos têm considerável maturação do seu sistema nervoso no período pré-natal de modo que o desenvolvimento cerebral de ratos neonatos corresponde aos estágios fetais em humanos (Seidler *et al.*, 1995).

A co-ocorrência de sobrecarga de Pb com níveis elevados de estresse aumenta a possibilidade de interações entre os fatores de risco. Tal possibilidade é ainda sustentada pelo fato de ambos, exposição ao Pb e estímulo estressogênico (através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal) atuarem sobre os sistemas mesocorticolímbicos dopaminérgico/glutamatérgico (Pokora *et al.*, 1996, Rouge-Pont *et al.*, 1998; Cory-Slechta *et al.*, 2004). Este efeito comum pode ser responsável pelo fato do Pb e do estresse determinarem prejuízo das funções comportamentais mediadas por estes sistemas (Schwartz, 1994; Anderson & Armstead, 1995). Em 2005, Virgolini *et al.* mostraram que tais interações incluem: 1) modificação das respostas ao estresse pelo Pb; 2) modificação dos efeitos do Pb pela exposição ao estresse; bem como 3) potencialização de efeitos.

Alterações neuroendócrinas relacionadas ao estresse têm sido intensamente estudadas (Shedlowski *et al.*, 1992), entretanto, há poucas informações relacionadas a outras modificações fisiológicas, como a reatividade vascular durante condições de estresse. Entre as respostas adaptativas ao estresse são descritas: diminuição de

reatividade à noradrenalina (Lapshin *et al.*, 1991; Manukhina *et al.*, 1991; Cordellini & Vassilieff, 1998), aumento de reatividade à acetilcolina (Webb *et al.*, 1981; Cordellini & Vassilieff, 1998), diminuição dos níveis de L-arginina plasmáticos (Milakofsky *et al.*, 1993), subsensibilidade aos efeitos cronotrópico e pressor das catecolaminas (Capaz & De Moraes, 1988), diminuição de sensibilidade aos efeitos pressores e cronotrópicos das catecolaminas em ratos submetidos a estresse de imobilização (Moura & De Moares, 1994). Aumento da resposta adaptativa induzida por exposição prévia ao estresse foi demonstrado para os níveis de catecolaminas e corticosterona e respostas vasoconstritoras em animais submetidos a uma variedade de estímulos estressogênicos (Konarska *et al.*, 1990; Pitman *et al.*, 1990; Cordellini & Vassilieff, 1998). Contrariamente, Meerson *et al.* (1991) relataram prevenção de alterações da função contrátil cardíaca durante estresse prolongado devido à adaptação preliminar ao estresse de curta duração.

Trabalhos anteriores em nosso laboratório mostraram que a hiporreatividade à noradrenalina induzida pelo estresse envolve aumento na atividade do sistema NO endotelial (Cordellini & Vassilieff, 1994; 1998). A participação do NO em respostas adaptativas ao estresse foi, também, sugerida por outros autores que mostraram um aumento da atividade do sistema NO em cultura de células endoteliais submetidas a tensões de cisalhamento (Hecker *et al.*, 1994). Ainda, aumento do RNAm para a NOS foi descrito no núcleo paraventricular e no córtex da adrenal de ratos estressados (Calzà *et al.*, 1993; Tsuchiya *et al.*, 1997).

Pelo exposto fica claro que, embora haja alguns relatos sobre alterações comportamentais e de reatividade vascular em condições de estresse e de exposição ao Pb, isoladamente, o conhecimento da habilidade em gerenciar o

estresse em indivíduos com sobrecarga de Pb é imprescindível na avaliação de risco cardiovascular nesta condição de exposição.

*Objetivo geral*

Examinar a hipótese de que o estresse e o Pb, os quais co-ocorrem como fator de risco ambiental e compartilham alvos comuns no sistema nervoso central, poderiam interagir de modo que os efeitos dos fatores de riscos individuais pudessem diferir quando na presença do outro.

*Objetivos específicos*

Investigar as alterações na resposta vascular e no comportamento de ratos jovens e adultos submetidos ou não ao estresse agudo e/ou crônico em diferentes fases do desenvolvimento.

Avaliar se a habilidade em gerenciar o estresse difere entre proles submetidas ou não à intoxicação perinatal por Pb.

Verificar a participação do endotélio na resposta vascular adaptativa ao estresse de ratos intoxicados ou não.

### *Animais*

Ratos Wistar machos e fêmeas foram obtidos do Biotério do ICB-USP/SP e usados para o acasalamento. Somente filhotes machos com 23 dias (recém-desmamados) ou 70 dias (adultos) de idade foram utilizados. Como a ninhada é considerada a unidade experimental, irmãos não foram usados dentro de um mesmo grupo.

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

### *Acasalamento*

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

### *Regime de Exposição*

As ratas começaram, então, a receber na água de beber, 500 ppm de Pb na forma de acetato de Pb ou acetato de sódio. A concentração de acetato de sódio foi calculada de modo a fornecer para as ratas controles o mesmo número de

moléculas de acetato. A exposição foi realizada durante toda a prenhez e a amamentação.

### *Desmame*

O desmame dos filhotes foi realizado no 22º dia de vida pós-natal. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais/gaiola) até sua utilização nos experimentos.

### *Indução do Estresse*

*Imobilização:* animais com 23 dias e 70 dias de idade foram submetidos ao estresse agudo de imobilização. Os animais foram contidos, individualmente, em tubos metálicos à temperatura ambiente de 25°C. A exposição ao estresse foi realizada entre 10 e 14 h. Nesta condição há uma intensa restrição dos movimentos do animal, permanecendo somente os movimentos respiratórios. Os animais foram submetidos ao estresse agudo por 2 horas e imediatamente após a indução ao estresse, os animais seguiram para a realização dos protocolos experimentais de reatividade vascular. Para a avaliação comportamental aguardou-se 30 minutos após o término da exposição ao estresse. Durante a sessão de estresse, os animais controles permaneceram em suas gaiolas à temperatura ambiente de 25°C.

*Separação materna:* ratos recém-nascidos expostos ou não ao Pb foram submetidos ao estresse crônico de separação materna por 4h, diariamente, durante 3 semanas consecutivas a partir do 2º dia pós-natal. Completados 23 e 70 dias de idade, foram submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização por 2h e seguiram para a realização dos protocolos experimentais de reatividade vascular e avaliação comportamental.

### *Evolução do Peso Corpóreo*

Cada filhote foi pesado semanalmente do nascimento ao 70º dia. No dia do nascimento, denominado dia pós-natal zero (PND 0), o número de filhotes em cada ninhada foi reduzido para oito, mantendo-se o maior número possível de filhotes machos. Filhotes fêmeas foram mantidas somente para se completar a ninhada.

Ninhadas com número de filhotes inferior a oito foram descartadas. Os filhotes foram desmamados no PND 22 e passaram a receber água filtrada (protocolo de 70 dias).

### *Análise Quantitativa de Pb*

Os níveis de Pb no sangue foram quantificados em ratos de 23 e 70 dias de idade.

Os animais foram anestesiados com uretano (1,25 g/kg, i.p.), e após toracotomia, amostras de sangue foram recolhidas do ventrículo esquerdo para dosagem de Pb. Após este procedimento, os animais seguiram para os estudos de reatividade vascular.

Para a quali-quantificação do Pb, as amostras foram mineralizadas em forno de microondas (DGT-100 Plus, Provecto, Brasil) seguindo o seguinte protocolo: 1,0-2,0 g de sangue + 3ml de ácido nítrico 65% (filhotes de 23 dias) e 3,0-4,0 g de sangue + 6 ml de ácido nítrico 65% (mães e filhotes de 70 dias). As amostras foram levadas ao microondas a 400 W por 5 min e a 790W por 5 min, a 790W por 2 min e a 0W por mais 5 min, para resfriar as amostras. O material mineralizado foi diluído com água ultrapura (Mili Q) para um volume final de 10 ml.

A concentração de Pb foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica GBC AA 932 (EEA-Chama) nos laboratórios do Centro de Assistência Toxicológica-CEATOX-IB, UNESP-Botucatu. Para a determinação, foi usada a

metodologia de adição de padrão na concentração de 5 µg/dl para a construção da curva de calibração, a fim de se minimizar o efeito-matriz. O limite de detecção foi 3,0 µg/dl. As amostras foram analisadas em triplicata.

#### *Determinação da Pressão Arterial*

A pressão arterial (PA) sistólica caudal do animal não anestesiado foi verificada, através de um eletroesfigmomanômetro (Narco Bio-Systems), no 22º dia de idade e, no protocolo de 70 dias, semanalmente a partir do 22º dia. O valor da PA foi a média de três registros consecutivos obtidos a intervalos de 2 minutos.

#### *Reatividade Vascular*

Após a coleta de sangue, procedeu-se, então, ao isolamento da aorta torácica que, livre de tecido conectivo, gordura e sangue, foi dividida em dois anéis de aproximadamente 4 mm. Indistintamente, um dos anéis teve o seu endotélio removido mecanicamente. Os anéis foram suspensos, em cubas para órgão isolado, contendo solução de Krebs-Henseleit modificado (composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,1; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; glicose 11,0 e ácido ascórbico 0,1). A solução nutriente foi mantida a 37,0 ± 0,5°C e saturada com carbogênio (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Os anéis foram conectados a transdutores de força isométrica (F-60 Narco Bio-Systems), acoplados a um fisiógrafo (Narco Bio-Systems). O tempo de estabilização das preparações foi de 1 h, sob uma tensão inicial de 1,5 g mantida ao longo de todo o experimento. Anéis de aorta com (+E) e sem (-E) endotélio, dos diferentes grupos, foram estudados em paralelo.

Curvas concentrações-efeito (CCE) cumulativas à NA foram obtidas em anéis de aorta, +E e -E. Ao final das CCE, concentrações únicas de acetilcolina (10<sup>-6</sup> M) e

nitroprussiato de sódio ( $10^{-4}$  M) foram usadas para testar a integridade da célula endotelial e da camada muscular lisa, respectivamente.

A reatividade vascular foi avaliada através das alterações da resposta máxima (g de tensão) e potência (concentração eficaz 50% - CE50) do tecido à NA, em experimentos individuais. A CE50 é definida como a concentração molar do agonista responsável pela obtenção de um efeito igual a 50% do efeito máximo.

As CE50s foram medidas por determinação gráfica e as médias apresentadas como antilogaritmo da média aritmética dos log CE50 de cada experimento, com os respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%.

### *Estudo do comportamento*

#### *Teste do Campo Aberto*

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio da observação direta no campo aberto e consiste na mensuração de comportamentos eliciados num espaço aberto e desconhecido, do qual o animal não pode escapar, construído conforme especificações modificadas por Broadhurst (1960). O campo aberto consiste de uma arena circular de madeira, com 87 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, sendo o chão dividido por meio de três círculos concêntricos e segmentos de reta, em dezenove partes semelhantes. A arena dista 48 cm do chão e tem uma cortina na sua parte frontal, que permite ao observador visão geral do animal, e dificulta, a este, a visão do experimentador. Na parte superior, e distando 74 cm da arena, há 4 lâmpadas vermelhas de 40W.

Os animais exibem uma tendência de se movimentar, mesmo na ausência de estímulos.

Os animais permaneceram no campo aberto por 5 minutos e ao final de cada sessão, o aparelho foi limpo com álcool etílico 5%, v/v.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

Locomoção: número de vezes em que o animal invade com as quatro patas um dos campos da arena;

Levantar: número de vezes em que o animal se apóia nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto;

Limpeza: tempo em segundos de execução de movimentos com as patas anteriores em direção à boca ou à cabeça, podendo haver continuidade destes em direção aos pavilhões auriculares e/ou movimento de lambeo dirigidos principalmente às porções laterais do corpo e à região genital;

#### *Labirinto em Cruz Elevado*

O aparato do labirinto em cruz elevado consiste numa plataforma com dois braços abertos (50x10x2cm) e dois braços fechados (50x10x40cm), perpendiculares. A altura do labirinto em relação ao chão é de 50 cm.

O animal foi colocado no centro do labirinto, denominado de espaço morto, com a cabeça voltada para o espaço aberto, sendo-lhe permitido explorar livremente o aparelho por 5 minutos. Durante este período, foram registrados o número de entradas nos braços abertos (NA), o tempo de permanência nos braços abertos (TA), bem como o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados (NF e TF, respectivamente).

O labirinto em cruz elevado é um modelo experimental para mensuração de ansiedade de roedores (Pellow & File, 1986). Foram calculados os índices de ansiedade (%NA e %TA):

- % NA, dada pela fórmula: 
$$\frac{NA}{NA + NF} \times 100$$

- % TA, dada pela fórmula: 
$$\frac{TA}{TA + TF} \times 100$$

Estes índices são diretamente proporcionais ao efeito ansiolítico.

Ao final de cada sessão, o aparelho foi limpo com álcool etílico 5%, v/v.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (COBEA), protocolo nº: 25/05.

### *Análise Estatística*

As análises estatísticas utilizadas foram as seguintes:

- Teste de Mann Whitney: utilizado para a análise do nível de Pb no sangue.
- Análise de variância multifatorial, com teste a posteriori de Tukey-Kramer, ou teste t-Student, quando apropriado.

Os resultados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou intervalo de confiança (IC), ainda que os dados referentes ao nível de Pb tenham sido analisados através de um teste não paramétrico.

Em todos os experimentos,  $P < 0,05$  foi considerada estatisticamente significativa.

### *Drogas e Soluções*

As seguintes drogas foram utilizadas:

- acetato de chumbo (Sigma Chemical Co.)
- acetato de sódio (Sigma Chemical Co.)
- cloridrato de acetilcolina (Sigma Chemical Co.)
- nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Co.)
- bitartarato de noradrenalina (Sigma Chemical Co.)
- uretano (Sigma Chemical Co.)

O acetato de Pb foi diluído em água filtrada. Para prevenir a precipitação do Pb foi adicionado 0,5 ml de ácido acético em cada litro de solução de acetato de Pb e também na de sódio. As demais soluções foram preparadas utilizando-se solução Krebs-Henseleit e as concentrações foram expressas em molar.

### *Peso corpóreo*

O peso corpóreo dos filhotes após o nascimento não diferiu entre os ratos controles e aqueles expostos ao Pb durante a prenhez e amamentação. No entanto, a separação materna determinou uma diminuição no ganho de peso corpóreo de ratos não intoxicados em relação aos ratos controles (Figura 1).

### *Determinação dos níveis de chumbo*

As concentrações de Pb no sangue, avaliadas no 23º e 70º dias de idade, mostraram-se significativamente aumentadas em ratos intoxicados durante a prenhez e amamentação, quando comparadas aos respectivos grupos controles [concentração de Pb ( $\mu\text{g/dl}$ ): 23 dias: controle  $< 3,0$  e Pb  $30,3 \pm 3,2^*$   $\mu\text{g/dl}$ ; 70 dias: controle  $< 3,0$  e Pb  $17,6 \pm 1,3^*$   $\mu\text{g/dl}$ , \* $P < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle;  $n=8$ ].

### *Pressão arterial*

A pressão arterial sistólica caudal, mensurada nos diferentes grupos experimentais a partir do desmame até o 70º dia de idade, mostrou aumento gradativo durante o desenvolvimento pós-natal. A exposição perinatal ao Pb determinou aumento significativo da pressão arterial em relação aos valores alcançados por animais não intoxicados. Os valores pressóricos observados em ratos não intoxicados submetidos ao estresse crônico de separação materna foram significativamente maiores, em algumas fases do desenvolvimento, quando comparados ao respectivo grupo controle (Figura 2). O estresse de separação materna em ratos intoxicados pelo Pb não modificou significativamente a resposta pressórica em relação ao grupo intoxicado (figura 2).





### *Reatividade Vascular*

Os valores de resposta máxima à noradrenalina de aorta com endotélio de ratos com 23 dias, não intoxicados e submetidos ou não aos diferentes protocolos de estresse não diferiram significativamente entre si.

A exposição perinatal ao Pb não determinou, em ratos com 23 dias de idade, alteração de resposta máxima à noradrenalina da aorta com endotélio quando comparados ao respectivo grupo não intoxicado (figura 3 e tabela 1).

Em ratos com 23 dias de idade intoxicados perinatalmente pelo Pb, a exposição ao estresse agudo de imobilização ou esta condição associada ao estresse crônico de separação materna, mas não a exposição à separação materna isoladamente, determinaram uma diminuição estatisticamente significativa da resposta máxima à noradrenalina de aorta com endotélio quando comparados aos ratos intoxicados recém-desmamados e não submetidos a condições estressogênicas (figura 3 e tabela 1).

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração na sensibilidade da aorta com endotélio à noradrenalina em animais de 23 dias de idade (figura 3 e tabela 2).







Os valores de resposta máxima à noradrenalina de aorta com endotélio de ratos com 70 dias não intoxicados e submetidos aos protocolos de estresse agudo de imobilização e esta condição associada à separação materna, mas não à exposição à separação materna isoladamente, foram significativamente menores quando comparados aos ratos não intoxicados e não submetidos ao estresse (figura 4 e tabela 3).

A exposição perinatal ao Pb determinou, em ratos com 70 dias de idade, aumento significativo da resposta máxima à noradrenalina da aorta com endotélio quando comparados ao respectivo grupo não intoxicado (figura 4 e tabela 3).

Em ratos com 70 dias de idade intoxicados perinatalmente pelo Pb, apenas a exposição ao estresse agudo de imobilização, mas não esta condição associada ao estresse crônico de separação materna ou a separação materna isoladamente, determinou uma diminuição estatisticamente significativa da resposta máxima à noradrenalina de aorta com endotélio quando comparados aos ratos intoxicados adultos e não submetidos a condições estressogênicas (figura 4 e tabela 3).

Nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração na sensibilidade da aorta com endotélio à noradrenalina em animais de 70 dias de idade (figura 4 e tabela 4).

Finalmente, nenhum dos protocolos experimentais determinou qualquer alteração de reatividade (resposta máxima e EC50) da aorta à noradrenalina em preparações sem endotélio de ratos recém-desmamados e adultos (figura 3 e 4 e tabelas 1-4). Ainda, a remoção do endotélio determinou aumento de resposta máxima e de sensibilidade à noradrenalina em aorta de ratos recém-desmamados e adultos submetidos aos diferentes protocolos experimentais, exceto em aorta de

ratos adultos intoxicados e submetidos ou não à separação materna e esta condição associada ao estresse agudo de imobilização (figuras 3 e 4 e tabelas 1 e 3).







### *Estudo do comportamento*

No teste do campo aberto, tanto as condições estressogênicas de separação materna como as de separação materna associada à imobilização determinaram um aumento significativo na atividade geral de ratos não intoxicados recém-desmamados, verificado através do parâmetro locomoção, quando comparados aos ratos não estressados e não intoxicados na mesma idade (tabela 5). Ainda, os ratos com 23 dias intoxicados perinatalmente por Pb também apresentaram um aumento na locomoção quando comparados ao respectivo grupo controle (tabela 5).

No parâmetro levantar não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais na idade de 23 dias, exceto no grupo intoxicado e submetido ao estresse agudo que mostrou uma diminuição deste parâmetro (tabela 5).

No parâmetro limpeza, os ratos recém-desmamados intoxicados por Pb e submetidos ao estresse de imobilização apresentaram um aumento significativo deste parâmetro quando comparados aos ratos intoxicados com 23 dias não estressados (tabela 5). Entretanto, os ratos recém-desmamados intoxicados não estressados apresentaram uma diminuição deste parâmetro quando comparados aos ratos não intoxicados com 23 dias não estressados (tabela 5).

Na idade adulta, o estresse de separação materna determinou aumento significativo na locomoção de ratos não intoxicados quando comparado com o grupo não estressado e não intoxicado (tabela 6). Ratos adultos intoxicados e submetidos ao estresse agudo de imobilização mostraram diminuição do parâmetro levantar em relação aos ratos adultos intoxicados não estressados (tabela 6). Por sua vez, ratos de 70 dias de idade não intoxicados e submetidos ao estresse agudo de imobilização e esta condição associada à separação materna mostraram aumento

do parâmetro levantar em relação aos ratos adultos não intoxicados não estressados (tabela 6).

A intoxicação perinatal determinou uma diminuição significativa no tempo de limpeza em ratos adultos não estressados quando comparados com ratos não intoxicados e não estressados (tabela 6). Uma diminuição deste parâmetro foi ainda observada e ratos de 70 dias de idade não intoxicados e submetidos ao estresse agudo de imobilização e esta condição associada à separação materna quando comparado com ratos adultos não intoxicados e não estressados.

No teste do labirinto em cruz elevado ratos de 23 dias de idade intoxicados ou não e submetidos à separação materna ou esta condição associada ao estresse agudo de imobilização mostraram aumento significativo dos índices %NA e a %TA quando comparado ao respectivo grupo não estressado (tabela 7). Apenas as diferenças no índice %TA se mantêm na vida adulta (tabela 8).









O estresse está presente na nossa vida diária e o SNC é o principal sítio de ativação das respostas comportamentais e fisiológicas aos agentes estressores. Porém, é também alvo da ativação neural e dos sistemas hormonais do estresse, assim como os sistemas: cardiovascular, metabólico e imunológico. As respostas neuroendócrinas têm um papel essencial na mediação tanto das respostas adaptativas, como mal-adaptativas, agindo em aspectos específicos da fisiologia de cada tecido (McEwen, 2000; Stam *et al.*, 2000). Embora a reação de estresse possa resultar em doenças, é ela que torna possível a sobrevivência e adaptação dos seres vivos aos inúmeros estímulos ambientais a que estão constantemente expostos (Chrousos & Gold, 1998).

Os dados do presente trabalho mostram que os ratos não intoxicados que passaram pelo protocolo de estresse crônico de separação materna apresentaram menor ganho de peso corpóreo demonstrando a real condição de estresse a que os animais foram submetidos, já que uma diminuição no peso corpóreo reflete o efetivo estabelecimento da condição estressogênica crônica. Esses achados corroboram relatos anteriores da literatura que mostram diminuição de peso de ratos recém-desmamados isolados perinatalmente do contato com a mãe (Lehmann & Feldon, 2000), bem como em ratos adultos submetidos à mesma condição (Zimmerberg & Shartrand, 1992; McIntosh *et al.*, 1999; Sloten *et al.*, 2006).

A exposição continuada a um estímulo estressor e a ativação prolongada do eixo HPA elevam os níveis de glicocorticóides e induzem mudança no metabolismo em direção a um estado catabólico generalizado, envolvendo gliconeogênese e degradação protéica em diversos tecidos, como músculo, osso e pele, levando a uma diminuição da massa magra (Kyrou & Tsigos, 2007). Em adição aos seus efeitos catabólicos diretos, os glicocorticóides também interferem no eixo do

crescimento levando à supressão da secreção do hormônio do crescimento e inibição da somatomedina C em seus tecidos-alvo (Burguera *et al.*, 1990; Kacsóh *et al.*, 1990). Tais efeitos dos glicocorticóides poderiam parcialmente explicar a diminuição de peso corpóreo observado em ratos submetidos à separação materna. Ainda, a alteração de peso corpóreo observada ao longo do desenvolvimento reforça a importância de eventos estressogênicos no período inicial da vida sobre processos fisiológicos e fisiopatológicos na vida adulta.

A modulação do sistema cardiovascular por meio de aumento da frequência cardíaca e pressão arterial e vasodilatação em alguns leitos e, em oposição a vasoconstrição em outros, permite o redirecionamento adequado dos substratos energéticos em situações de estresse (Chrousos, 1998, Ottenweller, 2000; Pacak & McCarty, 2000).

Os glicocorticóides desempenham importante papel na manutenção hemodinâmica frente a situações estressogênicas através de aumento da resposta simpato-neural/simpato-adrenal ao estressor em níveis central, adrenal e da vasculatura. Na adrenal, os glicocorticóides têm a função de estimular as células cromafins da medula a sintetizar adrenalina a partir da noradrenalina (Kvetnansky *et al.*, 1995; Bornstein *et al.*, 1999). Na vasculatura periférica, os glicocorticóides podem agir diretamente através de seus receptores tipo 2 localizados no músculo liso vascular e assim aumentar a resistência periférica (Horwitz, 1982; Moura & Worcel, 1984), o que poderia explicar os picos hipertensivos que os animais recém-desmamados submetidos ao estresse crônico apresentaram ao longo do seu desenvolvimento. Ainda, dados anteriores do nosso laboratório mostraram aumento da pressão arterial de ratos expostos ao estresse agudo de imobilização por 2 horas (Vinha, 1999).

Semelhantemente ao estresse, a intoxicação perinatal pelo Pb determinou aumento significativo de pressão arterial sistólica a partir do 22º dia pós-natal. O aumento sustentado da pressão arterial de ratos intoxicados por Pb confirmou relatos anteriores da literatura que mostraram hipertensão arterial associada ao saturnismo (Lal *et al.*, 1991; Nowack *et al.*, 1993; Purdy *et al.*, 1997; Vaziri, 2002). O estresse de separação materna não alterou de modo significativo a modulação da pressão arterial dos animais intoxicados previamente pelo Pb, já que estes animais permaneceram com níveis de pressóricos semelhantes aos animais intoxicados e não estressados. Entretanto, este ponto merece investigações futuras.

Em relação a alterações no sistema cardiovascular induzidas pelo estresse, são descritos: redução persistente na sensibilidade à NA no córtex cerebral de ratos expostos ao choque crônico na pata (Stone, 1981); diminuição de sensibilidade aos efeitos pressores e cronotrópicos das catecolaminas em ratos submetidos ao estresse de imobilização (Torda *et al.*, 1981; Capaz & De Moraes, 1988; Moura & De Moares, 1994); aumento do efeito inibitório do endotélio sobre as contrações induzidas por NA em aorta de ratos submetidos a diferentes condições de estresse (Lapshin *et al.*, 1991; Vassilieff & Cordellini, 1992; Cordellini & Vassilieff, 1994). Ainda, o aumento do efeito inibitório do endotélio após o estresse parece estar associado a um aumento na atividade do sistema óxido nítrico endotelial (Cordellini & Vassilieff, 1998).

A intensidade da resposta cardiovascular induzida pelo estresse pode variar de acordo com a qualidade e a intensidade do agente estressor e com as condições de exposições ambientais prévias as que o indivíduo esteve submetido. A resposta adaptativa ao estresse é ainda dependente da idade do animal no momento da exposição ao agente estressor. Assim, as concentrações plasmáticas de

glicocorticóides tendem a aumentar em indivíduos idosos, pois o processo de envelhecimento contribui, em parte, para promover uma *downregulation* dos receptores de corticosteróides no hipocampo e hipotálamo. Como consequência, ocorre uma resistência do eixo HPA para as ações de retroalimentação negativa promovidas pelos próprios glicocorticóides (Buckingham, 2000; Rich & Romero, 2005). No presente estudo, ratos de 23 dias de idade mostraram-se mais resistentes a alterações de reatividade vascular frente aos diferentes protocolos de estresse quando comparados aos ratos adultos (70 dias de idade).

A exposição ao estresse agudo de imobilização e esta condição precedida do estresse crônico de separação materna determinaram resposta vascular adaptativa de mesma magnitude em ratos adultos, caracterizada por um decréscimo da reatividade da aorta à noradrenalina conseqüente a uma hiperatividade da célula endotelial. Esses achados confirmam relatos anteriores da literatura mostrando hiperatividade do endotélio após exposição ao estresse (Cordellini & Vassilief, 1998; Manuhkina, *et al.*, 1991). Entretanto, o estresse de separação materna *per se* não determinou qualquer alteração de reatividade da aorta à noradrenalina, mostrando que a resposta vascular adaptativa ao estresse depende do protocolo de estresse utilizado.

Contrariamente, exposições prévias ao estresse crônico podem diminuir a resposta adaptativa ao estresse agudo. Uma diminuição da resposta adaptativa foi observada para níveis hormonais, contração auricular, níveis de arginina e lesões gástricas depois da exposição a diferentes condições de estresse (Meerson *et al.*, 1983; Milakofsky *et al.*, 1993). Ainda, em relação à célula endotelial foi descrito que a exposição crônica ao estresse pode impedir a hiperatividade endotelial induzida pelo estresse agudo e afetar de modo benéfico o decurso temporal da pressão

arterial pós-infarto (Lapshin *et al.*, 1991; Manuhkina, *et al.*, 1991) ou potencializar este efeito (Cordellini & Vassilieff, 1998), diferentemente do observado no presente estudo.

A concentração máxima sangüínea de Pb estabelecida para a proteção de trabalhadores contra os efeitos desse metal à saúde é de 30 µg/dl, e em crianças e mães em idade fértil é de 10 µg/dl (ACGIH – American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 1998) (ACGIH, 2002). Níveis sangüíneos de Pb entre 10-20 µg/dl foram responsáveis por alterações comportamentais em ratos com 23 dias e déficit cognitivo em crianças (Davis *et al.*, 1990; Davidson, 1994; Moreira *et al.*, 2001). Níveis de Pb acima de 37 µg/dl, no homem, e maiores do que 12 µg/dl, em ratos adultos, determinaram hipertensão arterial (Pocock *et al.*, 1984; Gonick *et al.*, 1997; Carmignani *et al.*, 2000; Malvezzi *et al.*, 2001). Dessa forma, os níveis sangüíneos de Pb alcançados no presente trabalho representariam níveis associados a efeitos adversos à saúde. Ainda, o Sistema de Informação de Avaliação de Risco considera intoxicação baixa, média ou elevada, no homem, para níveis sangüíneos menores do que 20 µg/dl, entre 21-40 µg/dl, ou maiores do que 41 µg/dl, respectivamente (Davidson, 1994).

Embora sejam observados efeitos semelhantes no homem e na criança, esta é mais susceptível à exposição pelo Pb do que o indivíduo adulto. Os efeitos mais críticos da intoxicação pelo Pb ocorrem em crianças expostas durante o desenvolvimento fetal, pós-natal ou ambos. Danos irreversíveis são observados com níveis sangüíneos maiores ou iguais a 100 µg/dl em adultos e entre 80-100 µg/dl em crianças; morte pode ocorrer nas mesmas doses sangüíneas de Pb em crianças. Aquelas que sobrevivem a estes níveis elevados de exposição mostram retardo mental severo e permanente. Estudos em crianças têm mostrado déficit de QI

(quociente de inteligência) de 05 pontos com níveis sanguíneos de 50-70 µg/dl, 04 pontos com níveis de 30-50 µg/dl e 02 pontos com 15-30 µg/dl (Davidson, 1994). Em 1981, Carmichael *et al.* sugeriram o regime de exposição pelo Pb nas doses de 300, 600 e 1000 ppm durante a prenhez e a amamentação como modelo para se investigar os efeitos deste metal no desenvolvimento do sistema nervoso em ratos. Este protocolo determinou valores de aproximadamente 39, 54 e 85 µg/dl, respectivamente, de Pb no sangue de filhotes de 21 dias.

Em adultos, o sistema cardiovascular representa um alvo particularmente sensível ao Pb. Popcock *et al.* (1984) mostraram que pressão sistólica maior que 160 mmHg e diastólica maior que 100 mmHg estão associadas a níveis sanguíneos de Pb maiores que 37 µg/dl. Ainda, hipertrofia ventricular esquerda também se associa positivamente aos níveis plasmáticos de Pb (Schwartz, 1991). Distúrbios da atividade elétrica, mecânica e bioquímica cardíaca, sinais de degeneração vascular, anormalidade da função do músculo liso vascular, alteração da complacência dos vasos têm sido descritos em humanos expostos crônica e agudamente a níveis tóxicos de Pb. Complicações cardiovasculares semelhantes foram também detectadas após exposição excessiva a este metal em animais de experimentação (Kopp *et al.*, 1988). Entretanto, a literatura ainda é falha sobre as alterações cardiovasculares e de reatividade vascular na intoxicação pelo Pb, tanto no adulto como na criança, principalmente em exposição perinatal.

No presente estudo, a intoxicação perinatal pelo Pb determinou aumento significativo de pressão arterial sistólica a partir do 22º dia pós-natal. O aumento sustentado na pressão arterial de ratos intoxicados por Pb confirmou relatos anteriores da literatura que mostraram hipertensão arterial associada ao saturnismo (Lal *et al.*, 1991; Nowack *et al.*, 1993; Purdy *et al.*, 1997; Vaziri, 2002).

A exposição ao Pb durante a prenhez e a lactação determinou um aumento de reatividade à noradrenalina em aorta de ratos adultos. Entretanto, nos filhotes de 23 dias de idade, a exposição perinatal ao Pb determinou hipertensão arterial não associada a alterações significativas de reatividade vascular. Nesta condição, a hipertensão arterial poderia estar sendo mantida pela presença de fator(es) circulante(s) e alterações hemodinâmicas.

O Pb pode alterar a capacidade de contração dos vasos por atuar diretamente sobre o músculo liso vascular (Tomera & Harakal, 1986) e/ou indiretamente alterando a síntese e/ou liberação de fatores humorais vasoativos, tanto da célula endotelial quanto das células presentes em outros órgãos (Goodfriend *et al.*, 1995; Oishi *et al.*, 1996; Gonick *et al.*, 1997; Carmignani *et al.*, 1999; Vaziri *et al.*, 1999).

A alteração de reatividade vascular observada no presente estudo após exposição ao Pb, caracterizou-se por um aumento da resposta máxima à noradrenalina em aorta com endotélio. Entretanto, nenhuma alteração de reatividade a este agente foi observada em aorta sem endotélio de ratos intoxicados. Isto sugere, uma disfunção da célula endotelial como responsável pelas alterações de reatividade vascular induzidas pelo Pb que não comprometeu o músculo liso vascular. Tais observações corroboram dados anteriores da literatura que reportaram um aumento na reatividade da artéria caudal e dos vasos mesentéricos a agonistas adrenérgicos em animais cronicamente expostos ao Pb (Webb *et al.*, 1981; Skozynska *et al.*, 1986; Chai & Webb, 1988). Por outro lado, Purdy *et al.* (1997) não observaram qualquer alteração de reatividade à noradrenalina, fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio em aorta de ratos intoxicados pelo Pb na vida adulta. Uma disfunção da célula endotelial induzida pelo Pb foi anteriormente descrita por Pirkle *et al.* (1985) que observaram uma inibição na

geração de NO em alguns casos de hipertensão arterial associada à intoxicação por este metal. O Pb inibe a produção de NO em células endoteliais cerebrais (Blaska *et al.*, 1994; Mittal *et al.*, 1995), macrófagos (Tian & Lawrence, 1995), e células endoteliais de aorta (Kaji *et al.*, 1995). Ainda, alterações no balanço entre fatores de contração e de relaxamento derivados do endotélio podem contribuir para a hipertensão associada ao saturnismo. Desta forma, uma diminuição no componente vasodilatador, NO e/ou fator hiperpolarizante derivado do endotélio, e um aumento no componente vasoconstritor, endotelina-3 e espécies reativas de oxigênio, têm sido sugeridos como responsáveis pela hipertensão arterial induzida pelo Pb (Khalil-Manesh *et al.*, 1993; Oishi *et al.*, 1996; Gonick *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1998; Vaziri *et al.* 1999; Ding *et al.*, 2000).

Embora a exposição perinatal ao Pb não tenha determinado qualquer alteração da reatividade da aorta à noradrenalina em ratos de 23 dias de idade, este procedimento tornou o animal recém-desmamado susceptível ao estresse, uma vez que tanto o estresse agudo de imobilização quanto esta condição precedida a separação materna determinaram hiporreatividade da aorta à noradrenalina dependente da integridade da célula endotelial, efeito não observado no rato recém-desmamado não intoxicado. Esses dados corroboram a literatura que relata que a exposição da mãe ao Pb pode alterar permanentemente a função do eixo HPA e a resposta a desafios estressogênicos nos filhotes. Assim, Virgolini *et al.* (2005) mostraram que ratos expostos ao Pb, mas não ratos controles, exibem significativa elevação dos níveis de corticosterona em resposta ao estresse de frio subsequente.

Ainda que a exposição perinatal ao Pb tenha determinado hiperreatividade da aorta à noradrenalina em ratos adultos, este procedimento não impediu a resposta vascular adaptativa ao estresse agudo de imobilização. Entretanto, ratos intoxicados

de 70 dias de idade mostraram-se menos susceptível ao estresse em relação aos ratos recém-desmamados expostos ao Pb durante a prenhez e a amamentação, já que a hiporreatividade à noradrenalina observada em ratos adultos não intoxicados submetidos ao estresse agudo de imobilização precedido de separação materna foi abolida pela exposição perinatal ao Pb.

Sabe-se que a resposta vascular adaptativa ao estresse envolve um aumento na produção e/ou liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (Solodkov & Bozhko, 1994; Cordellini & Vassilieff, 1998, enquanto que a exposição ao Pb determina uma diminuição dos fatores de relaxamento derivados do endotélio e/ou aumento dos fatores de contração derivados do endotélio (Grizzo *et al.*, 2008, Vaziri, 2008). Assim, uma oposição na produção de fatores de relaxamento e contração durante o efeito combinado de exposição ao estresse e intoxicação ao Pb poderia justificar a perda da resposta vascular adaptativa ao estresse de separação materna associado ao estresse agudo em ratos intoxicados adultos em relação aos ratos não intoxicados na mesma idade.

### *Comportamento*

À semelhança do sistema cardiovascular, o sistema nervoso central também se mostra vulnerável à exposição ao estresse e metais pesados. Assim, a literatura relata alterações no comportamento de ratos submetidos a uma diversidade de condições estressogênicas, durante diferentes etapas do desenvolvimento pré e pós-natal ou na vida adulta (Vinogradova, 1999; Ordyan & Pivina, 2003; Louvart *et al.*, 2005; Cory-Slechta, *et al.*, 2008). Ainda, a exposição prévia a um agente estressor pode modular as respostas adaptativas relacionadas a um estresse subsequente (Young & Cook, 2004).

De modo geral, o comportamento de ratos é investigado através da observação em campo aberto que avalia a atividade geral do animal e do teste de labirinto em cruz elevado que avalia a ansiedade do animal.

No presente estudo, o teste de campo aberto mostrou um aumento significativo na locomoção de ratos recém-desmamados e adultos não intoxicados e expostos à separação materna no período perinatal, corroborando achados da literatura que relatam aumento da atividade exploratória de ratos isolados cronicamente da mãe e expostos a um ambiente novo, como acontece no campo aberto (Slotten *et al.*, 2006). Entretanto, o estresse agudo de imobilização por 2 horas não foi capaz de alterar a locomoção de ratos recém-desmamados e adultos expostos ou não ao Pb no período perinatal. Esse dado sugere que a qualidade, a frequência e/ou a intensidade do agente estressor seja definitiva para a resposta comportamental adaptativa ao estresse.

A literatura também relata que a exposição prévia ao estresse crônico pode modificar ou não alterar a resposta ao estresse agudo (Pol *et al.*, 1995; Cordellini & Vassilieff, 1998). No presente estudo, a locomoção em campo aberto observada após exposição ao estresse agudo não foi modificada pela exposição prévia ao estresse de separação materna.

Poluentes ambientais como o Pb podem agir como agentes estressores induzindo alterações comportamentais e fisiológicas. A exposição ao Pb durante o período perinatal determinou aumento na locomoção de ratos recém-desmamados que não se prolongou na vida adulta, à semelhança do observado tanto para o estresse de separação materna quanto esta condição associada ao estresse de imobilização. Aumento na atividade locomotora foi anteriormente descrita em ratos e

camundongos expostos ao Pb no período perinatal (DeLuca *et al.*, 1989; Rodrigues *et al.*, 1996).

O eixo HPA e o sistema simpato-adrenal representam o ramo periférico do sistema de estresse. Sabe-se que a exposição pré-natal ao Pb afeta a função do eixo HPA, aumentando os níveis basais de corticosterona em filhotes e conseqüentemente alterando a habilidade de gerenciar condições estressogênicas futuras, como mostra a diminuição nos níveis de corticosterona após desafios subseqüentes (Cory-Slechta *et al.*, 2004; Virgollini *et al.*, 2004; Virgollini *et al.*, 2006). Assim, a não potencialização da atividade locomotora após exposição simultânea a ambas condições, estresse e intoxicação, sugerem uma habituação do ramo periférico do estresse após exposição ao Pb.

A diminuição da atividade vertical, representada pelo levantar, observada em ratos intoxicados recém-desmamados e adultos após exposição ao estresse agudo poderia ser explicada pelo aumento significativo do tempo gasto na limpeza. Por sua vez, o aumento do levantar apenas em ratos não intoxicados adultos submetidos aos estresses de separação materna e imobilização aguda mostra que a capacidade de gerenciar o estresse agudo na vida adulta sofre influências de eventos estressogênicos ocorridos no início da vida e mostra-se sensível à exposição ao Pb.

A limpeza é um comportamento que ocorre primariamente após várias atividades e estressores estando, portanto, relacionada ao estado de relaxamento, pelo menos nos mamíferos (Spruijt *et al.*, 1992). Quando nenhum desafio do meio é percebido, justificando a manutenção do estado de alerta, o comportamento de limpeza pode ser desinibido (Spruijt *et al.*, 1992). A exposição perinatal ao Pb determinou diminuição da limpeza em ratos recém-desmamados não estressados que se perpetuou na vida adulta, mostrando que a exposição ao Pb determina

aumento da percepção e reatividade ao estresse. Resultado semelhante foi observado em ratos adultos não intoxicados expostos à separação materna associada ao estresse agudo de imobilização, sugerindo que a experiência estressogênica durante estágios iniciais da vida pode comprometer a percepção ao estresse na vida adulta.

O teste de labirinto em cruz elevada é um modelo utilizado para acessar o grau de ansiedade de animais de laboratório (Pellow *et al.*, 1985), o qual avalia o padrão das respostas não-condicionadas do animal a situações potencialmente perigosas do meio, ou seja, o quanto o animal evita lugares abertos e novos, onde a porcentagem de tempo gasto no braço aberto é inversamente proporcional à ansiedade do animal (Pellow *et al.*, 1985; Cruz *et al.*, 1997). Independentemente da intoxicação, a separação materna, mas não o estresse agudo de imobilização, determinou um aumento nos índices de entrada nos braços abertos (%NA) e do tempo de permanência nestes braços (%TA) de animais recém-desmamados. Esses dados sugerem uma diminuição dos níveis de ansiedade induzida pelo estresse que não é afetada pela exposição ao Pb. Ainda, o efeito ansiolítico do estresse mantém-se ao longo da vida, como mostra o persistente aumento na %TA em ratos com 70 dias de idade. Independentemente da idade ou da exposição ao Pb, a experiência prévia ao estresse de separação materna não afetou o comportamento no labirinto em cruz elevado induzido pelo estresse agudo.

Finalmente, o aumento do comportamento exploratório observado no campo aberto vem confirmar o efeito ansiolítico observado no labirinto em cruz elevado dos protocolos de estresse utilizados no presente estudo, ainda que a literatura relate diminuição da ansiedade em condições de estresse. Tal divergência de resultados

poderia ser atribuída a diferenças na espécie animal, no período de vida durante a exposição ao estresse, na qualidade, frequência e/ou duração do estresse, entre outros (Pacak *et al.*, 1998; McEwen, 2007).

Em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que o sistema cardiovascular e o sistema nervoso central, avaliado através dos estudos de comportamento, são afetados de modo diferencial pela exposição ao Pb e pelo estresse, uma vez que observou-se interação entre Pb e estresse apenas para a resposta vascular e não para a resposta comportamental.

1. A expressão da resposta vascular adaptativa aos diferentes protocolos de estresse foi dependente da idade do animal.
2. A exposição perinatal ao Pb determinou hipertensão arterial em ratos recém-desmamados e adultos que esteve associada a hiperreatividade da aorta torácica apenas em ratos adultos.
3. Tanto a resposta vascular adaptativa ao estresse quanto a hiperreatividade da aorta ao Pb mostraram-se dependentes da integridade da célula endotelial e não envolveram alterações na musculatura lisa vascular.
4. A exposição ao chumbo comprometeu, mas não aboliu a expressão da resposta vascular adaptativa ao estresse.
5. A exposição perinatal ao Pb aumentou o comportamento exploratório de ratos recém-desmamados que não se prolongou na vida adulta.
6. Na dependência do protocolo utilizado, o estresse aumentou o comportamento exploratório que não foi alterado pela exposição perinatal ao Pb e não se prolongou na vida adulta.
7. O estresse de separação materna mostrou efeito ansiolítico em ratos, independentemente da idade e da exposição perinatal ao Pb.

- ACGIH-AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENIST. *TLVs e BELs: Limites de Exposição para Substâncias Químicas e Agentes Físicos e Índices Biológicos de Exposição (BEIs)*. Trad. Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. Campinas: ABHO, p.87 e 94, 2002.
- ADONAYLO, V.N., OTEIZA, P.I. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicol.*, v.135, p.77-85, 1999.
- ANDERSON, N. B., ARMSTEAD, C.A. Toward understanding the association of socioeconomic status and health: A new challenge for the biopsychosocial approach. *Psychosom. Med.*, v.57, p.213-25, 1995.
- AXELROD J., REISINE, T.D. Stress Hormones: Their interaction and regulation. *Science*, v.224, p.452-9, 1984.
- BIAGINI, G., PICH, E. M., CARANI, C., MARRAMA, P., AGNATI, L. F. Postnatal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 16, p.187-97, 1998.
- BLAZKA, M.E., HARRY, G.J., LUSTER, M.I. Effect of lead acetate on nitrite production by murine brain endothelial cell cultures. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, v.126, p.191-4, 1994.
- BORNSTEIN, S.R., CHROUSOS, G.P. Adrenocorticotropin (ACTH) and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, v.84, p.1729-36, 1999.
- BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics and in personality. *Fortschr. Psychosom. Med.*, p.31-61, 1960.
- BUCKINGHAM, J.C. Effects of stress on glucocorticoids. *Em: Fink, G., ed. Encyclopedia of Stress. Nova York*, v.2, p.229-38, 2000.

- BUDAVARI, S., O'NEIL, M.J., SMITH, A., HECKELMAN, P.E. (Ed.) The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 11ed. *Rahway: Merck & Co. Inc*, p.851, 1989.
- BURGUERA, B., MURUAIS, C., PENALVA, A., DIEGUEZ, C., CASANUEVA, F. Dual and selective action of glucocorticoids upon basal and stimulated growth hormone release in man. *Neuroendocrinology*, v.51, p.51-8, 1990.
- CALZÁ, L.; GIARDINO, L.; CECCATELLI, S. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *Neuroendocrinol.* ,v.4, p.627-30, 1993.
- CAPAZ, F.R., DE MORAES, S., Reduction by acute restraint stress of noradrenaline sensitivity in the isolated pacemaker of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, v.147, p.295-8, 1988.
- CARMICHAEL N.G., WINDER, C., LEWIS, P.D. Dose response relationship during perinatal lead administration in the rat: a model for the study of lead effects on brain development. *Toxicology*, v.21, p.117-128, 1981.
- CARMIGNANI, M., BOSCOLO, P., POMA, A., VOLPE, A.R. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacol.*, v.44, p.105-10, 1999.
- CARMIGNANI, M., VOLPE, AR., BOSCOLO, P., QIAO, N., DI GIOACCHINO, M., GRILLI, A., FELACO, M. Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci.*, v.68, p.401-15, 2000.
- CHAI, S.S., WEBB, R.C. Effects of lead on vascular reactivity. *Environ. Health Perspect.*, v.78, p.85-9, 1988.

- CHROUSOS, G.P. Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptative response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.851, p.311-35, 1998.
- CORDELLINI, S. & VASSILIEFF, V. S. Nitric oxide release is responsible for the subsensitivity to noradrenaline in aorta isolated from chronic stressed rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.72, p.472, 1994.
- CORDELLINI, S. & VASSILIEFF, V. S. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction in acute stressed rats is potentiated by previous chronic stress. *Nitric Oxide Involvement. Gen. Pharmacol.*, v.30 , p.79-83, 1998.
- CORY-SLECHTA, D.A., VIRGOLINI, M.B., ROSSI-GEORGE, A., THIRUCHELVAM M., LISEK, R., WESTON, D. Lifetime consequences of combined maternal lead and stress. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.102, p.218-27, 2008.
- CORY-SLECHTA, D.A., VIRGOLINI, M.B., THIRUCHELVAM, M. Maternal stress modulates the effects of developmental lead exposure. *Environ. Health Perspect.*, v.112, p.717-30, 2004.
- CRUZ, A.P.M., FREI, F., GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.49, p.171-6, 1997.
- DAVIDSON, A.K. The risk assessment information system,1994. Disponível em: <http://risk.isd.ornl.gov/tox/profiles/lead.shtml>. Acesso em: 28 maio 2008.
- DAVIS, J.M., OTTO, D., WEIL, D.E., GRANT, L.D. The comparative developmental neurotoxicity of lead in humans and animals. *Neurotoxicol. Teratol.*, v.12, p.215-229, 1990.
- DeLUCA, J., BURRIGHT, R.G., DONOVICK, P.J. Genotypic influences on lead-induced hyperactivity in mice. *Behav. Genet.*, v.19, p.171-81, 1989.

- DING, Y., VAZIRI, N.D., GONICK, H.C. Lead-induced hypertension II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ. Res.*, v.76, p.107-13, 1998.
- DING, Y., GONICK, H.C., VAZIRI, N.D. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am. J. Hypertens.*, v.13, p.552-5, 2000.
- ELIOT, R.S. Stress and the heart. Mechanisms, measurement and management. *Postgrad. Med.*, v.92, p.237-42, 1992.
- FAVALLI, L., CHIARI, M.C., PICCININI, F., ROZZA, A. Experimental investigations on the contraction induced by lead in arterial smooth muscle. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, v.41, p.412-20, 1977.
- FREITAS, C. U. Estratégias de abordagem para exposição ambiental ao chumbo no estado de São Paulo. Acessado em maio de 2008. Disponível em: [www.cve.saude.sp.gov.br/doma/chumbo.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/doma/chumbo.htm).
- GOODFRIEND, T.L., BALL, D.L., ELLIOTT, M.E., SHACKLETON, C. Lead increases aldosterone production by rat adrenal cells. *Hypertension*, v.25, p.785-789, 1995.
- GONICK, H.C., DING, Y., BONDY, S.C., VAZIRI, N.D. Lead-induced hypertension I. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. *Hypertension*, v.30, p.1487-92, 1997.
- GRAEME, K. A., POLLACK, C.J. Heavy metal toxicity, part II: lead and metal fume fever. *J. Emerg. Med*, v.16, p.171-77, 1998.
- GRIFFIN. J.F.T. Stress and imunity: a unifying concept. *Vet. Immunopathol.*, v.20, p.263-312, 1989.

- GRIZZO, L.T., CORDELLINI, S. Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicol. Sci.*, v.103, p.207-14, 2008.
- HABERMANN, E., CROWELL, K., JANICKI, P. Lead and other metals can substitute for Ca<sup>2+</sup> in calmodulin. *Arch. Toxicol.*, v.54, p.61-70, 1993.
- HART, W.M., TITUS, E.O. Sulfhydryl groups of sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, v.248, p.4674-81, 1973.
- HECKER, M., MULSCH, A., BASSENGE, E., FORSTERMANN, U., BUSSE, R. Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. *Biochem. J.*, v.299, p.247-52, 1994.
- HORWITZ, K.B. & HORWITZ, L.D. Canine vascular tissues are targets for androgens, estrogens, progestins and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.*, v.69, p.750-8, 1982.
- JIN, A., TESCHKE, K., COPES, R. The relationship of lead in soil to lead in blood and implications for standard setting. *Sci Total Environ.*, v.208, p.23-40, 1997.
- KACSOH, B., MEYERS, J.S., CROWLEY, W.R., GROSVENOR, C.E. Maternal modulation of growth hormone secretion in the neonatal rat: involvement of mother-infant interactions. *J. Endocrinol.*, v.40, p.224-33, 1990.
- KAJI, T., FUJIWARA, Y., HOSHINO, M., YAMAMOTO, C., SAKAMOTO, M., KOZUKA, H. Inhibitory effect of lead on the proliferation of cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*, v.95, p.87-92, 1995.
- KHALIL-MANESH, F., GONICK, H.C., WEILER, E.W.J., WEBER, M.A., PURDY, R.E. Lead-induced hypertension: possible role of endothelial factors. *Am. J. Hypertens.*, v.6, p.723-9, 1993.

- KHALIL-MANESH, F., GONICK, H.C., WEILER, E.W.J., WEBER, M.A., PURDY, R.E. REN, Q. Effects of chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA) on lead-related blood pressure changes. *Environ. Res.*, v.65, p.86-99, 1994.
- KING, J.A., EDWARDS, E. Early stress and genetic influences on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in adulthood. *Horm. Behav.*, v.36, p.79-85, 1999.
- KOOLHAAS, J.M., KORTE, S.M., DE BOER, S.F., VAN DER VEGT, B.J., VAN REENEN, C.G., DE JONG, I.C., RUIS, M.A., BLOKHUIS, H.J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.23, p.925-35, 1999.
- KOOB, G.F. Corticotrophin-releasing factor, norepinephrine and stress. *Biol. Psychiatry*, v.46, p.1167-80, 1999.
- KOPP, S.J., BARRON, J.T., TOW, J.P. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: A review. *Environ. Health Perspect.*, v.78, p.91-9, 1988.
- KYROU, I., TSIGOS, C. Stress mechanisms and metabolic complications. *Horm Metab Res.*, v.39, p.430-8, 2007.
- KVETNANSKY, R., PACAK, K., FUKUHARA, K., VISKUPIC, E., HIREMAGALUR, B., NANKOVA, B., GOLDSTEIN, D.S., SABBAN, E.L., KOPIN, I.J. Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.771, p.131-58, 1995.
- LAL, B., MURTHY, R.C., ANAND, M., CHANDRA, S.V., KUMAR, R., TRIPATHI, O., SRIMAL, R.C. Cardiotoxicity and hypertension in rats after oral lead exposure. *Drug. Chem. Toxicol.*, v.14, p.305-18, 1991.
- LAPIZ, M. D., FULFORD, A., MUCHIMAPURA, S., PARKER, T., MARSDEN, C. A. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development,

- conditioned behavior and neurotransmission. *Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova*. v.87, p.730-51, 2001.
- LAPSHIN, A.V., MANUKHIMA, E.D., MEERSON, F.Z. Adaptation to short stress exposures prevents the enhancement of the endothelium-dependent reactions of the aorta in myocardial infarct. *Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova*, v.77, p.70-8, 1991.
- LEHMANN, J., FELDON, J. Long-term behavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev. Neurosci.*, v.11, p.338-408, 2000.
- LOUVART, H., MACCARI, S., DARNAUDÉRY, M. Prenatal stress affects behavioral reactivity to an intense stress in adult female rats. *Brain Res.*, v.1031, p.67-73, 2005.
- MALVEZZI, C.K., MOREIRA, E.G., VASSILIEFF, I., VASSILIEFF, V.S., CORDELLINI, S. Effects of L-arginine, DMSA and blood pressure level in plumbism. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.34, p.1341-6, 2001.
- MALYSHEV, Y. & MANUKHINA, E. B. Stress, Adaptation, and Nitric Oxide. *Biochemistry* v.63, p.840-53, 1998.
- MANUKHINA, E.B., LAPSHIN, A.V., MEERSON, T.Z., Effect of adaptation to periodic hypoxia on post-infarction fall of blood pressure and hyperactivation of the endothelium. *Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova*, v.37, p.98-105, 1991.
- MARPLE, D.N., ABERLE, E.D., FORREST, J.C., BLAKE, W.H., JUDGE, M.D. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *J. Anim. Sci.*, v.35, p.576-9, 1972.
- MASON J.W. A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. *Psychosom. Med.*, v.30, p.631-53, 1968.
- McEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.*, v.886, p.172-89, 2000

- McEWEN, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.*, v.87, p.873-904, 2007.
- McINTOSH, J., ANISMAN, H., MERALI, Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Dev. Brain res.*, v.113. p.97-106, 1999.
- MEERSON, F.Z., MANUKHINA, E.B., LAPSHIN, A.V. Adaptation to short-term stress prevents post-infarction hyperactivation of the endothelium and decrease in blood pressure in rats. *Biomed. Sci.* v.2, p.623-8, 1991.
- MILAKOFSKY, L; HARRIS, N.; VOGEL, W.H. Effects of repeated stress on plasma arginine levels in young and old rats. *Physiol. Behav.*, v.54, p.725-8, 1993.
- MITTAL, C.K., HARRELL, W.B., MEHTA, C.S. Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase. *Mol. Cell Biochem.*, v.149, p.263-5, 1995.
- MOREIRA, G. E., VASSILIEFF, I., VASSILIEFF, S. V. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicol. Teratol.*, v.23, p. 489-495, 2001.
- MOURA, M. J., DE MORAES, S. Forced swim stress: supersensitivity of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of isoprenaline and the role of corticosterone. *Gen. Pharmacol.*, v.25, p.1341-7, 1994.
- MOURA, A.M. & WORCEL, M. Direct action of aldosterone on Na efflux from arterial smooth muscle: rapid and delayed effects. *Hypertension*, v.6, p.425-30, 1984.
- NAKASHIMA, T., NOGUCHI, T., FURUKAWA, T., YAMASAKI, M., MAKINO, S., MIYATA, S., KIYOHARA, T. Brain oxytocin augments stress-induced long-lasting plasma adrenocorticotrophic hormone elevation in rats. *Neuroscience*, v.321, p.161-4, 2002.

- NATELSON, B.H., OTTENWELLER, J.E., COOK, J.A., PITMAN, D., MCCARTY, R., TAPP, W.N. Effect of Stressor Intensity on Habituation of the Adrenocortical Stress Response. *Physiol. Behav.*, v.43, p.41-6, 1988.
- NESSE, R.M., YOUNG, E.A. Evolutionary origins and function of the stress response. Em: Fink, G. (Ed.) *Encyclopedia of Stress.*, v.1, p.532-9, 2000.
- NOWACK, R., WIECEK, A., EXNER, B., GRETZ, N., RITZ, E. Chronic lead exposure in rats: effects on blood pressure. *Eur. J. Clin. Invest.*, v.23, p.433-43, 1993.
- NOVAK, J., BANKS, R.O. Lead and nickel alter the cardirenal actions of endothelin in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.208, p.191-8, 1995.
- OISHI, H., NAKASHIMA, M., TOTOKI, T., TOMOKUNI, K. Chronic lead exposure may inhibit endothelium-dependent hyperpolarizing factor in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.28, p.558-63, 1996.
- ORDYAN, N.E., PIVINA, S.G. Anxiety levels and neurosteroid synthesis in the brain of prenatally stressed male rats. *Neurosci. Behav. Physiol.*, v.33, p.899-903, 2003.
- OTTENWELLER, J.E. Animals models (nonprimate) for human stress. Em: FINK, G., ed. *Encyclopedia of stress.*, v.1, p.8-17, 2000.
- PACAK, K., PALKOVITS, M., YADID, G., KVETNANSKY, R., KOPIN, I.J. Heterogenous neurochemical responses to different stressors: a test of Seyle's doctrine of nonspecific. *Am. J. Physiol.*, v.275, p.1247-55, 1998.
- PACAK, K., MCCARTY, R. Acute stress response: experimental. Em: FINK, G., ed. *Encyclopedia of stress*, v.1, p.8-17, 2000.

- PALKOVITZ, M. Stress-induced expression of co-localized neuropeptides in hypothalamic and amygdaloid neurons. *Europ. J. Pharmacol.*, v.405, p.161-6, 2000.
- PELLOW, S., FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in a elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.24, p.525-9, 1986.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Method* v.14, p.149- 67, 1985.
- PICCININI, F., FAVALLI, L., CHIARI, M.C. Experimental investigations on the contraction induced by lead in arterial smooth muscle. *Toxicology*, v.8, p.43-51, 1977.
- PICKERING, A.D. The concept of biological stress. Em: *Stress and fish*, v.1, p.225-55, 1981.
- PIRKLE, J.L., SHWARTZ, J., LANDIS, J.R., HARLAN, W.R. The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. *Am. J. Epidemiol.*, v.121, p.246-58, 1985.
- PITMAN, D.L., OTTENWELLER, J.E., NATELSON, B.H. Effects of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. *Behav. Neurosci.*, v.104, p.28-36, 1990.
- POCOCK, S.J., SHAPER, A.G., ASHBY, D., DELVES, T., WHITEHEAD, T.P. Blood lead concentration, blood pressure, and renal function. *Br. Med. J.*, v.289, p.872-874, 1984.
- POKORA, M.J., RICHFIELD, E.K., CORY-SLECHTA, D.A. Preferential vulnerability of nucleus accumbens dopamine binding sites to low-level lead exposure: time

- course of effects and interactions with chronic dopamine treatments *J. Neurochem.*, v.67, p.1540-50, 1996.
- POL, O., CAMPMANY, L., ARMARIO, A. Inhibition of catecholamine synthesis with alpha-methyl-p-tyrosine apparently increases brain serotonergic activity in the rat: no influence of previous chronic immobilization stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.52, p.107-12, 1995.
- PURDY, R.E., SMITH, Y., DING, F., VAZIRI, N.D., GONICK, H.C. Lead- induced hypertension is not associated with altered vascular reactivity in vitro. *Am. J. Hypertension*, v.10, p.997-1003, 1997.
- RICH, E.L., ROMERO, L.M. Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.288, p.1628-36, 2005.
- RICHARDT, G., FEDEROLF, G., GABERMANN, E. Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca<sup>+2</sup> binding proteins. *Biochem. Pharmacol.*, v.35, p.1331-5, 1986.
- RODRIGUES, A.L., ROCHA, J.B., MELLO, C.F., SOUZA, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. Toxicol.*, v.79, p.150-6, 1996.
- ROTS, N. Y., DE JONG, J., WORKEL, J. O., LEVINE, S., COOLS, A. R., DE KLOET, E. R. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J. Neuroendocrinol.*, v.8, p.501-6, 1996.
- ROUGE-PONT, F., DEROCHE, V., LE MOAL, M., PIAZZA, P.V. Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *Eur. J. Neurosci.*, v.10, p.3903-7, 1998.

- SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S.(Ed.). *Zanini. Oga: Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, p.161 e 446, 1996.
- SCHWARTZ, J. Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men and women. *Environ. Health Perspect.*, v.91, p.71-75, 1991.
- SCHWARTZ, J., Low-level exposure and children's IQ: A meta-analysis and search for a threshold. *Environ. Res.*, v.65, p.42-55, 1994.
- SEIDLER, F.J., TEMPLE, S.W., MCCOOK, E. C., SLOTKIN, T.A. Cocaine inhibits central noradrenergic and dopaminergic activity during the critical developmental period in which catecholamines influence cell development. *Res. Dev. Brain. Res.*, v.85, p.48-53, 1995.
- SELVIN TESTA, A., CAPANI, F., LOIDL, C. F., PECCI SAAVEDRA, J. The nitric oxide synthase expression of rat cortical and hippocampal neurons changes after early lead exposure. *Neurosc. Letters*, v.236, p.75-8, 1997.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, v.138, p.32, 1936.
- SHEDLOWSKI, M., WIECHERT, D., WAGNER, T.F., TEWES, U. Acute psychological stress increases plasma levels of cortisol, prolactin and TSH. *Life Sci.* v.50, p.1201-5, 1992.
- SHEN, X., ROSENN, J.F., GUO, D., WU, S. Childhood lead poisoning in China. *Sci. Total Environ.*, v.181, p.101-9, 1996.
- SKOCZYNSKA, A., JUZWA, W., SMOLIK, R., SZECHINSKI, J., BEGAL, F.J. Response of the cardiovascular system to catecholamines in rats given small doses of lead. *Toxicology*, v.39, p.275-89, 1986.

- SOLODKOV, A.P., BOZHKO, A.P. Changes in the endotheliocyte activity of the coronary vessels under the influence of stress. *Fiziol. Zh. Im. M.*, v.8, p.65 -71, 1994.
- SLOTTEN, H.A., KALINICHEV, M., HAGAN, J.J., MARSDEN, C.A., FONE, K.C.F. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects, v.1097, p.123-32, 2006.
- SMITH, G. R. Lead recycling in United States in 1998. Flow studies for recycling metal commodities in the United States, USEPA, 1998.
- SPRUIJT, B.M, van HOOFF, J.A., GISPEN, W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol. Rev.*, v.72, p.825-52, 1992.
- STAM, R., BRUIJNZEEL, A.W., WIEGANT, V.M. Long-lasting stress sensitization. *Eur. J. Pharmacol.*, v.405, p.2017-24, 2000.
- STOJEK, E., SKOCZYNSKA, A. Lead effect on vascular endothelium. *Med. Pr.*, v.1, p.87-93, 2003.
- STONE, E.A. Mechanism of stress-induced subsensitivity to norepinephrine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.14, p. 719-23, 1981.
- TAYLOR, A.E. Cardiovascular effects of environmental chemicals. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v.114, p.209-11,1996.
- TIAN, L., LAWRENCE, D.A. Lead inhibits nitric oxide production in vitro by murine splenic macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.132, p.156-63, 1995.
- TOMERA, J.F., HAKAKAL, C. Mercury and lead induced contraction of aortic smooth muscle in vitro. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, v.283, p.295-302, 1986.

- TORDA, T., YAMAGUCHI, I., HIRATA, F., KOPIN IJ, AXELROD J. Quinacrine-blocked desensitization of adrenoceptors after immobilization stress or repeated injection of isoproterenol in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 216, p.224-8, 1981.
- TSIGOS, C., CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychos. Res.*, v.53, p.865-71, 2002.
- TSUCHIYA, T., KISHIMOTO, J., KOYAMA, J. OZAWA, T. Modulatory effect of L-NAME, a specific nitric oxide synthase inhibitor, on stress-induced changes in plasma adrenocorticotrophic hormone and corticosterone levels in rats: physiological significance of stress-induced NOS activation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res.*, v.21, p.68-71, 1997.
- VAZIRI, N.D. Pathogenesis of lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *J. Hypertens.*, v.3, p.15-20, 2002.
- VAZIRI, N., Mechanisms of Lead-Induced Hypertension and Cardiovascular Disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v.1, p.158, 2008.
- VAZIRI, N.D., DING, Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int.*, v.56, p.1492-8, 1999.
- VAZIRI, N.D., DING, Y., NI, Z. Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. *Hypertension*, v.34, p.558-62, 1999.
- VINHA, DEBORAH SOARES DA, *Efeito do estresse e da associação do estresse e da inibição do sistema óxido nítrico in vivo sobre a reatividade vascular e resposta pressora de ratos*, 1999. Dissertação de Mestrado (Mestrado-Farmacologia), Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.
- VINOGRADOVA, E.P. The effect of different stages of the sex cycle on rat behavior in a plus maze. *Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pav.*, v.49, p.1039-45, 1999.

- VIRGOLINI, M.B., VOLOSIN, M., FULGINITI, A.S., CANCELA, L.M. Amphetamine and stress responses in developmentally lead-exposed rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, v.26, p.291-303, 2004.
- VIRGOLINI, M.B., KEVIN, C., WESTON, D.D., BAUTER, M.R., CORY-SLECHTA, D.A., Interactions of chronic lead exposure and intermittent stress: consequences for brain catecholamine systems and associated behaviors and HPA axis function. *Toxic. Scienc.*, v.87, p.469-82, 2005.
- VIRGOLINI, M.B., BAUTER, M.R., WESTON, D.D., CORY-SLECHTA, D.A. Permanent alterations in stress responsivity in female offspring subjected to combined maternal lead exposure and/or stress. *Neurotoxicol.*, v.27, p.11-21, 2006.
- VOGEL, W.H., JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosc. Lett.*, v.87, p.183-8,1988.
- WATTS, S.W., CHAI, S., WEBB, R.C. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. *Toxicology*, v.99, p.55-65, 1995.
- WEBB, R.C., WINQUIST, R.J., VICTERY, W., VANDER, A.J. *In vivo* and *in vitro* effects of lead on vascular reactivity in rats. *Am. J. Physiol.*, v.241, p.211-6, 1981.
- WEILER, E., KHALIL-MANESH, F., GONICK, H. Effects of lead and low molecular weight endogenous plasma inhibitor on the kinetics of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and potassium-activated paranitrophenylphosphatase (K-pNPPase). *Clin. Sci.*, v.79, p.185-92, 1990.
- WHO (World Health Organization). Environmental health criteria 165 – inorganic lead – environmental aspects. *IPCS*. Genebra, 1995.

- YAMAZAKI, A., OHTSUKI, Y., YOSHIHARA, T., HONM, S., HONMA, K. Maternal deprivation in neonatal rats of different conditions affects growth rate, circadian clock and stress responsiveness differentially. *Phys. & Beh.*, v.86, p.136-44, 2005.
- YOUNG, B.J., COOK, C.J. Stress-induced modification of anxiety in rats is dependent on reproductive status. *Physiol. Behav.*, v.80, p.569-575, 2004.
- ZERBINO, D.D., POSPISHILIU, A. The chronic action of lead on the vascular system: the problem of ecological pathology. *Arkh-Patol.*, v.52, p.70-3, 1990.
- ZIMMERBERG, B., SHARTRAND, A.M. Temperature-dependent effects of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat. *Dev. Psychobiol.*, v.25, p.213-26, 1992.