

FIOCRUZ

**Universidade Federal da Bahia
Fundação Oswaldo Cruz**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**EFEITO AGUDO DE METAIS PESADOS (Pb^{+2} , Cd^{+2})
SOBRE A REGULAÇÃO CENTRAL DA EXCREÇÃO
RENAL DE ÁGUA, SÓDIO E POTÁSSIO**

CARLA PATRÍCIA NOVAIS LUZ

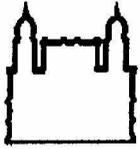
Dissertação de Mestrado

Salvador-Bahia

1997



001809



FIOCRUZ

**Universidade Federal da Bahia
Fundação Oswaldo Cruz**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

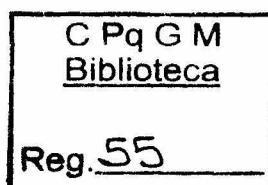
**EFEITO AGUDO DE METAIS PESADOS (Pb^{+2} , Cd^{+2})
SOBRE A REGULAÇÃO CENTRAL DA EXCREÇÃO
RENAL DE ÁGUA, SÓDIO E POTÁSSIO**

CARLA PATRÍCIA NOVAIS LUZ

Prof. Orientador: Josmara Bartolomei Fregoneze

**Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Patologia Experimental**

Salvador - Bahia
1997



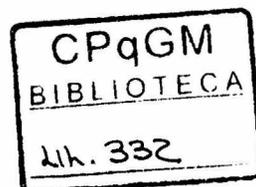
Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro
de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador/Ba

L979e Luz, Carla Patrícia Novais
Efeito agudo de metais pesados (Pb^{+2} , Cd^{+2}) sobre a regulação central da excreção renal de água, sódio e potássio / Carla Patrícia Novais Luz.- Salvador : CPqGM-FIOCRUZ/UFBA, 1997.
68p. il.

Dissertação (Mestrado em Patologia experimental)
- Universidade Federal da Bahia, 1997.

1. Chumbo. 2. Cádmio. 3. Natriurese. 4. Kaliurese.
5. Cálcio. 6. Angiotensina II. 7. Losartan. 8. Gago-
línio. 9. Sistema Nervoso Central. 10. Toxicidade.
I. Título.

CDU 546.3:616.8



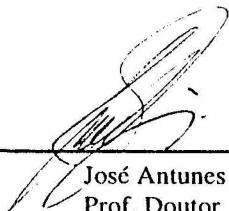
546.3:616.8
L979e

2108

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

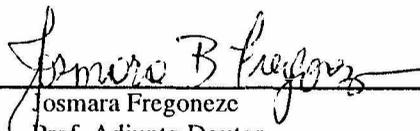
Membros Titulares:



José Antunes Rodrigues
Prof. Doutor
Faculdade de Medicina
Ribeirão Preto - USP



Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador Adjunto Doutor, CPqGM



Josmara Fregoneze
Prof. Adjunto Doutor
Instituto de Biologia-UFBA

Aos meus pais,
aos meus irmãos
e ao meu sobrinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer profundamente a todas as pessoas que colaboraram comigo para o desenvolvimento desta dissertação.

- Aos amigos do laboratório, por toda a ajuda dada durante a realização dos experimentos, pois sem vocês hoje, com certeza eu não estaria escrevendo meus agradecimentos. Além disso, eu gostaria que Clarissa, Thaís, Carol, Virna, Pedro, Patrícia, Letícia e Sheila soubessem que ter convivido com vocês foi uma experiência de vida maravilhosa, cheia de altos e baixos, que nos deu maturidade suficiente para montarmos uma equipe imbatível no que se diz respeito a trabalho e amizade. Obrigada, também, por todo gesto de carinho e incentivo, nos momentos em que mais precisei.
- Aos novos que estão chegando ao laboratório, Fernando, Ana, Karina, Daniela, Fábio, Marcelo, Igor, Inês e Larissa, gostaria, não só de agradecer, como também dar boas vindas e dizer que vocês foram peças chave na finalização desta dissertação, principalmente pela responsabilidade e carinho que demonstraram na realização das suas tarefas.
- Ao Sr. Vanilson, que na verdade é o meu amigo Vani, por tudo de bom que tem me ensinado durante esses quatro anos de amizade. Quando o conheci, imaginei " deve ser difícil agradar esse cara! ". Me enganei, pois agora sei que agradá-lo é tão fácil como conquistá-lo. Não vou dizer o quanto você foi importante para a realização desta tese, pois mais do que ninguém você sabe reconhecer o seu valor na vida do laboratório. E por tudo isso, gostaria muito de poder contar com você, por mais alguns anos.
- Ao meu amigo Zé, que esteve presente em todos os momentos com o seu jeito carinhoso e amigo, sempre disposto a ajudar no que fosse necessário. Pelo cuidado com os animais e mais do que isso, eu gostaria de te agradecer por todos os momentos de descontração que você vem me proporcionando.
- Ao meu irmão, que tantas vezes deixou de descansar para atender aos meus pedidos de carona e, muito mais do que isso, que me incentivou a conquistar mais essa etapa da vida.
- Às minhas amigas Telma e Hilda, que mesmo estando longe sempre estiveram ao meu lado me dando força e carinho para a realização da tese.
- À Coordenação do Mestrado em Patologia Experimental, pela excelência com a qual administra o curso e, principalmente, pela oportunidade que me foi dada possibilitando a participação de biólogos, nesse mestrado.

- Aos professores do Mestrado de Patologia Experimental, que tanto colaboraram para o meu conhecimento científico e que sempre demonstraram muito carinho e interesse em transmitir suas experiências.
- Aos meus colegas do Mestrado de Patologia Experimental, que estiveram sempre presentes me incentivando e contribuindo de diversas maneiras para a conclusão deste trabalho.
- A Rosália, pelo interesse e competência com a qual desenvolve os trabalhos burocráticos e, principalmente, por todo carinho a mim dispensado.
- Às bibliotecárias do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pelo interesse com o qual desenvolvem seus trabalhos, e em especial a Ana Christina, pela normalização desta publicação.
- A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Agradecimento Especial

- Gostaria de agradecer a Josmara, por todo carinho e paciência com a qual vem acompanhando a minha caminhada rumo à pesquisa, por todos os ensinamentos e pela excelência no acompanhamento deste trabalho. É impossível dizer com palavras o quanto a minha vida tem mudado desde que a conheci, mas tenho certeza que você, muito mais do que qualquer outra pessoa sabe reconhecer o quanto sou diferente atualmente, e o quanto você foi importante para essa mudança. Além disso, gostaria também de agradecer a chance que tem dado aos estudantes de biologia ao iniciá-los na pesquisa.
- A Emílio, gostaria de agradecer por tudo de bom que tem me ensinado durante esses anos, pela sua amizade e pela maestria com a qual vem acompanhando o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Neurotoxicidade dos metais pesados.....	2
1.1.1 Alterações de vias neurotransmissoras.....	2
1.1.2 Alterações neuroquímicas	4
1.2 Sistema nervoso central e regulação da excreção renal.....	7
1.3 Neurotoxicidade dos metais pesados e balanço hidrossalino	11
2 OBJETIVOS.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Tratamento cirúrgico: implante de cânula guia no 3 ^o Ventrículo.....	14
3.3 Treinamento dos animais.....	15
3.4 Drogas e microinjeções.....	15
3.5 Procedimentos experimentais	16
3.6 Verificação da disposição da cânula	17
3.7 Análise da urina	17
3.8 Análise estatística	18
3.9 Planejamento experimental.....	19
3.9.1 Desenho experimental	20
3.9.2 Grupos experimentais	21
3.9.2.1 Grupo experimental 1.....	21
3.9.2.2 Grupo experimental 2.....	21
3.9.2.3 Grupo experimental 3	21
3.9.2.4 Grupo experimental 4	22
3.9.2.5 Grupo experimental 5	22
3.9.2.6 Grupo experimental 6	22
3.9.2.7 Grupo experimental 7	23
3.9.2.8 Grupo experimental 8	23
3.9.2.9 Grupo experimental 9	24
4 RESULTADOS	25
5 DISCUSSÃO	49

6 CONCLUSÃO	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3°V	Terceiro Ventrículo
5HT	5-hidroxi-triptamina
8-OH-DPAT	(±)-8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (agonista dos receptores 5HT _{1A})
ANGII	Angiotensina II
ANP	Peptide natriurético atrial
AT ₁	Receptores angiotensinérgicos
AVP	Arginina vasopressina
Ca ⁺²	Íon Cálcio
CaM	Calmodulina
Cd ⁺²	Íon Cádmio
CdCl ₂	Cloreto de Cádmio
GABA	Ácido-γ-aminobutírico
Gd ⁺³	Íon Gadolínio
GdCl ₃	Cloreto de gadolínio
ICV	Intracerebroventricular
MK212	6-cloro-2-(1-piperazinil)-pirazine (agonista dos receptores 5HT ₂ /5HT ₁)
NaAc	Acetato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NMDA	Receptor glutamatérgico
Pb ⁺²	Íon Chumbo
PbAc	Acetato de Chumbo
RP 62203	Antagonista 5HT ₂
SNC	Sistema Nervoso Central
W7	Antagonista da calmodulina
Zn	Zinco

RESUMO

Trabalho realizado com o objetivo de estudar os possíveis efeitos da injeção intracerebroventricular aguda de chumbo e cádmio sobre a função renal. Ratos Wistar machos receberam duas sobrecargas hídrica oral de 5% do peso corporal com intervalo de 60 minutos. Vinte minutos após a segunda sobrecarga hídrica os animais receberam injeções de PbAc e CdCl₂ no terceiro ventrículo em três diferentes doses (0.03, 0.3, 3.0 nmol/rato), sendo comparados ao grupo tratado com salina. Ambos os metais induziram um aumento significativo na excreção de sódio e potássio, sem nenhuma modificação no fluxo urinário. O pré-tratamento com losartan, um antagonista seletivo dos receptores angiotensinérgicos AT1 (10,8 nmol/rato no terceiro ventrículo 10 minutos antes da injeção central dos metais), inibiu o efeito natriurético e kaliurético induzido pelo chumbo. Quanto ao cádmio o losartan foi capaz apenas de inibir o efeito natriurético, não interferindo na kaliurese. O pré-tratamento com gadolínio, um bloqueador dos canais de cálcio voltagem-dependentes (0.3 nmol/rato no terceiro ventrículo 20 minutos antes da injeção central dos metais), reverteu o aumento na excreção de sódio e potássio induzido pela administração central de PbAc e CdCl₂. Esses dados indicam que o aumento na natriurese e kaliurese é um efeito agudo da injeção central de cádmio e chumbo. A natriurese observada nos animais tratados com esses metais parece depender da integridade funcional das vias angiotensinérgicas centrais já que esta foi revertida pelo losartan. Entretanto, a resposta kaliurética observada nos animais tratados com cádmio não é dependente do componente angiotensinérgico central, já que o losartan não foi capaz de reverter a kaliurese observada nos animais tratados com cádmio. O Gadolínio, um bloqueador dos canais de cálcio voltagem-dependentes, é capaz de reverter o efeito natriurético e kaliurético induzido pelo cádmio e chumbo. Isso sugere, que as ações do chumbo e do cádmio dependem da integridade funcional dos canais de cálcio. Nos animais que receberam apenas a injeção central de gadolínio não foi observado nenhum efeito na excreção de sódio e potássio. Assim, sugerimos que os metais entram na célula através dos canais de cálcio e, uma vez dentro da célula, interagem com alguns passos bioquímicos dependentes de cálcio levando a alterações na neurotransmissão que induzem a resposta aqui observada.

PALAVRAS-CHAVE: Chumbo, Cádmio, Natriurese; Kaliurese; Angiotensina II; Losartan; Cálcio; Gadolínio; Sistema Nervoso Central; Toxicidade.

ABSTRACT

In the present work we studied the effects of acute intracerebroventricular injections of lead and cadmium on the central control of kidney function. Wistar, adult, male rats received an oral water load equivalent to 10% of their body weight. Twenty minutes after the water load experimental animals received third ventricle injections of PbAc or CdCl₂ in three different doses (0.03, 0.3 and 3.0 nmol/rat) being compared to saline-treated controls. The injection of both metals induced a significant increase in renal sodium and potassium excretion. Urine flow was not affected by the injections of the metals. Central pretreatment with losartan, a specific angiotensin II AT1 receptor antagonist (10.8 nmol/rat into the third ventricle, 10 minutes before the injection of the metals) inhibited both natriuretic and kaliuretic effects of lead administration. Losartan pretreatment was able to block the natriuretic effect of cadmium injections being unable to modify the kaliuretic effect of this metal. On the other hand, third ventricle injections of gadolinium, a voltage-dependent calcium channels blocker (0.3 nmol/rat 20 minutes before the central injection of the metals) reversed the increase in both natriuretic and kaliuretic response evoked by lead and cadmium administration. These data indicate that natriuresis and kaliuresis enhancement is an acute effect of central injections of both lead and cadmium. The increased renal sodium excretion observed in animals receiving both metals seems to rely on a central angiotensin II-dependent mechanism since it is reversed by losartan. However, the kaliuretic response observed in cadmium-treated animals is not dependent on this central angiotensinergic component, since losartan is unable to reverse the increased renal potassium excretion observed in animals treated with cadmium. Gadolinium, a voltage-dependent calcium channels blocker, is able to reverse the metal-induced kaliuretic and natriuretic effects here observed. Thus, we think that the present actions of lead and cadmium seem to require the functional integrity of calcium channels. The central injection of gadolinium in animals free of metals is devoid of any effect on renal sodium and potassium excretion. It is suggested that the metals enter the brain cell via calcium channels and, once inside the cells, interact with some calcium-related biochemical step leading to an altered neurotransmission state that induces the responses here observed.

Key – words: Lead; Cadmium,; Natriuresis; Kaliuresis; Angiotensin II; Losartan; Calcium – channels, Calcium; Gadolinium; Central System Nervous; Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O uso industrial de metais pesados como o chumbo e o cádmio vem se tornando cada vez mais elevado desde a revolução industrial. Os compostos inorgânicos destes metais são largamente utilizados na manufatura de diversos produtos tais como: derivados do petróleo, baterias, tintas, cosméticos e outros (2). Diversos estudos têm mostrado que a exposição ambiental ou ocupacional ao chumbo e ao cádmio leva a sério comprometimento da saúde humana. A gravidade da intoxicação depende da carga e do tempo de exposição ao metal, da sua distribuição corporal, bem como de sua taxa de eliminação ou retenção. As principais vias de contaminação por chumbo e cádmio são a inalação, o contato direto com a derme ou a ingestão de alimentos e água contaminados. Entretanto, a intoxicação pela via respiratória talvez seja a mais intensa (17,71). Na intoxicação por metais pesados, as principais alterações patológicas observadas são nefropatia, disfunções cardiocirculatórias e distúrbios neurológicos.

O efeito tóxico dos metais pesados em crianças pode ser mais grave desde que essas são mais susceptíveis do que os adultos, especialmente no que concerne ao SNC. Devido a isso, muito do que se sabe sobre o efeito neurotóxico dos metais pesados para a saúde humana, é decorrente de estudos que analisaram seus efeitos patológicos, durante o crescimento e desenvolvimento na infância (10).

1.1 Neurotoxicidade dos metais pesados

1.1.1 Alterações de vias neurotransmissoras

A neurotoxicidade ao chumbo e ao cádmio é caracterizada, entre outros achados, por hiperatividade, distúrbios do aprendizado e deficiência auditiva e visual. O sistema nervoso central é parcialmente protegido contra a entrada de metais pesados pela barreira hematoencefálica, que faz com que a acumulação desses metais, no SNC, seja mais lenta do que em outros tecidos (53). As células endoteliais dos capilares cerebrais, um dos constituintes da barreira hematoencefálica (BHE), impedem a entrada de moléculas polares e ligadas a proteínas no cérebro. Além da BHE, o organismo dispõe das metalotioneínas, que são proteínas intracelulares com alta afinidade para metais pesados como cádmio e chumbo. As metalotioneínas são capazes de sequestrar os metais das organelas celulares, tornando-os menos tóxicos. A diminuição da quantidade desses metais nas organelas, protege o organismo contra sua neurotoxicidade (20,50). As manifestações neurotóxicas do chumbo são mais frequentes em crianças e idosos, onde a barreira hematoencefálica apresenta-se deficiente (9,22). Em adultos, o acesso dos metais ao sistema nervoso central pode ocorrer através dos locais onde a barreira hematoencefálica é menos eficiente, tais como: órgão subfornical, órgão vascular da lâmina terminal e área postrema. Entretanto, estudos recentes têm mostrado que o chumbo livre ou em forma de $PbOH^+$, penetra passivamente, tanto no cérebro em desenvolvimento, quanto no adulto, mesmo com a barreira íntegra (13). Os metais pesados também podem se acumular no sistema nervoso central através do transporte neuronal retrógrado. Dados recentes, têm descrito a acumulação de chumbo e cádmio no núcleo

hipoglosso e bulbo olfatório após a injeção do metal na língua ou após inalação (4,24). No SNC, o chumbo distribui-se homoganeamente, podendo acumular-se em neurônios e células gliais (13,85). Os distúrbios neurofisiológicos encontrados na intoxicação por chumbo e cádmio ocorrem mesmo na ausência de danos celulares e estão relacionados com modificações na atividade de diversas vias neurotransmissoras centrais. Na exposição ao chumbo, observou-se alterações nas vias colinérgicas, com inibição da neurotransmissão muscarínica no septo, e modificação da função dos receptores nicotínicos e muscarínicos (12,52).

Em contraste com a diminuição da atividade das vias colinérgicas, verificou-se alterações regionais nos níveis das aminas biogênicas e do ácido- γ -aminobutírico (GABA), no cérebro de ratos expostos cronicamente ao chumbo. Os níveis de noradrenalina encontravam-se elevados no hipocampo, cerebelo, hipotálamo, tronco cerebral e na área entre o núcleo acumbente e o sistema estriatal. A dopamina apresentava-se com níveis aumentados no hipotálamo e diminuídos no tronco cerebral, enquanto que os níveis de serotonina (5-HT) estavam significativamente aumentados no hipocampo, tronco cerebral e córtex motor. Os níveis de GABA mostravam-se diminuídos no cerebelo e com tendência a aumento no hipotálamo (68).

Outro efeito do chumbo sobre a neurotransmissão, é a alteração da resposta antinociceptiva da morfina (43). Verificou-se também mudanças na ligação com os receptores opióides no cérebro de ratos (46). Além disso, a exposição ao chumbo leva a aumento da expressão gênica da pró-opiomelanocortina no hipotálamo (64).

A exposição ao cádmio também pode levar a distúrbios da neurotransmissão central. Um exemplo disso, é que os níveis de norepinefrina e dopamina estão aumentados em animais expostos ao cádmio. A serotonina e a acetilcolina podem ser aumentadas ou diminuídas dependendo da idade, dose, duração da exposição e região do cérebro analisada. A redução

dos níveis de GABA, pelo cádmio parece ser devido à capacidade desse metal em reduzir uma enzima dependente de Zn que é essencial para a síntese deste neurotransmissor (50). Outros estudos mostram que o cádmio também pode aumentar a atividade biossintética das aminas biogênicas, provavelmente por interferir com a atividade das enzimas de síntese, como a tirosina-hidroxilase e triptófano-hidroxilase, que são dependentes do sistema cálcio-calmodulina (59,75).

1.1.2 Alterações neuroquímicas

Os mecanismos da neurotoxicidade induzida pelos metais pesados têm sido relacionados com a interferência destes com o metabolismo intracelular do Ca^{++} e com proteínas quinases dependentes de cálcio que participam do processo de liberação de neurotransmissores (80).

Tanto o chumbo como o cádmio, que possuem a mesma carga elétrica e um raio atômico bastante similar ao do cálcio, podem mimetizar os efeitos deste íon em vários processos celulares, alterando as funções neuronais sem produzir danos ou morte celular (19,78).

Vários estudos têm sido realizados a fim de demonstrar o papel do cálcio como segundo mensageiro nos processos de neurotransmissão central, desde que o aumento deste íon pode ativar enzimas e transportadores importantes na neurotransmissão (1,29). O aumento no nível de cálcio intracelular pode ser devido à ativação de primeiros mensageiros na superfície celular, que irão estimular a liberação de cálcio dos sítios de estocagem e levar à ativação dos processos sensíveis ao cálcio.

Os metais pesados podem interferir com a atividade do cálcio em diferentes níveis, tanto

na ligação aos canais de membrana, como nos sítios intracelulares de ligação. A maioria dos estudos mostram que o chumbo atua principalmente a nível dos canais de membrana, enquanto que o cádmio atua preferencialmente nos sítios intracelulares de ligação do cálcio (1,6,25,70,78).

O chumbo é capaz de diminuir o fluxo de corrente elétrica nos canais de cálcio de forma diversa, de acordo com os diferentes tipos de canais, bem como, com os diferentes tipos de células. Sugeriu-se assim, que os efeitos do chumbo nos canais de cálcio, em neurônios de vertebrados, variam tanto para os tipos celulares, quanto para os subtipos de canais (6).

Em um estudo, *in vitro*, verificou-se que o chumbo em doses de 1 a 3 μmol é capaz de alterar a atividade dos canais de cálcio do tipo P, enquanto que doses maiores podem suprimir a atividade de todos os tipos de canais. Entretanto, o chumbo em níveis maiores do que 4 μmol leva a sérios danos da barreira hematoencefálica, que poderia ser a causa das manifestações neurológicas e não a simples alteração do metabolismo do cálcio (80).

A neurotoxicidade observada em baixas doses de chumbo pode ser explicada pelo bloqueio dos canais de cálcio do tipo P, que levariam a supressão da transmissão sináptica, embora alguns estudos mostrem que o chumbo pode mimetizar ou competir com o cálcio, na ligação com as proteínas quinases dependentes de cálcio.

No mecanismo de liberação de neurotransmissores, o chumbo pode agir de diferentes maneiras: inibindo a entrada do cálcio através dos canais de cálcio; ou ele próprio entrando nos terminais nervosos e interagindo diretamente com os processos de neurosecreção dependente de cálcio; ou ainda interferindo com a homeostase do cálcio e aumentando a sua concentração intracelular. A inibição da entrada de cálcio no neurônio pode levar a diminuição da neurosecreção, enquanto que a alteração da homeostase intracelular do cálcio pode induzir

a liberação espontânea de neurotransmissores ou estimular a secreção basal. Observou-se também que o chumbo em doses elevadas pode levar a uma inibição da adenilato ciclase, enquanto que a proteína quinase C, mesmo em doses picomolares de chumbo, tinha a sua atividade estimulada (70).

Como foi dito anteriormente em relação aos mecanismos neurotóxicos do cádmio, este metal parece atuar, preferencialmente, na homeostase do cálcio e nos seus sítios de ligação intracelular.

Em situações de intoxicação por cádmio, este pode se ligar à calmodulina (CaM) levando a um prolongamento da atividade deste importante sítio de ligação do cálcio intracelular, cuja atividade é normalmente regulada pelo fluxo citosólico da concentração de cálcio (16,78). Em trabalho realizado com o objetivo de comparar a ativação da CaM por cádmio e cálcio, observou-se que tanto o cádmio, como o cálcio podem ativar funções celulares dependentes da CaM. O cádmio se liga a todos os sítios de ligação do cálcio na CaM e induz mudanças conformacionais. Um antagonista da calmodulina, o W-7, também inibe a ativação da calmodulina, tanto por cálcio, como por cádmio. Esses resultados sugerem que o cádmio se liga indiscriminadamente à CaM, e que a subsequente ativação ou modulação das funções dependentes de CaM são perturbadas (1,16,78).

A administração intracerebroventricular de cádmio foi capaz de aumentar os níveis de dopamina no neostriado e núcleo acumbente em 30%. Esse efeito foi abolido pela administração de W-7 reforçando, assim, a idéia de que o organismo não é capaz de distinguir o cádmio do cálcio, permitindo que este se ligue aos sítios do cálcio na CaM. Deste modo, o cádmio pode interferir com importantes processos biológicos, como por exemplo a síntese de catecolaminas (76).

No SNC, o complexo cálcio-calmodulina ativa enzimas sintetizadoras de aminas biogênicas através de ativação da proteína quinase. Em alguns sistemas, tanto o cádmio, como o cálcio, estimulam as atividades dependentes de CaM. Entre estas, observa-se o aumento da atividade da fosfodiesterase (1,78). Além disso, verificou-se que a alteração do tempo de sono induzido por etanol em camundongos, e o aumento dos níveis de catecolaminas são induzidos por CaM (77). Isso sugere que a intoxicação por cádmio confunde a ativação das enzimas sintetizadoras de catecolaminas e outras vias calmodulina-dependentes, levando ao distúrbio da neurotransmissão central e das funções coordenadas por estas vias (1).

As modificações na atividade das vias neurotransmissoras, em diversas áreas do sistema nervoso central, observadas na intoxicação por metais pesados, podem levar a diferentes respostas funcionais e comportamentais. Entretanto, poucos estudos, *in vivo*, mostram correlação entre alterações neuroquímicas e/ou neurotransmissoras e as conseqüências funcionais da intoxicação por metais pesados. O hipotálamo, importante área no controle da homeostasia hidrossalina, apresenta alterações nas atividades dos neurotransmissores na intoxicação por chumbo e cádmio, podendo levar a sérias perturbações do equilíbrio hidroeletrolítico. Além disso, a disfunção renal observada nesta forma de intoxicação pode agravar os distúrbios do metabolismo hidrossalino.

1. 2 Sistema nervoso central e regulação da excreção renal

É amplamente conhecida a participação do sistema nervoso central, principalmente do hipotálamo, na regulação do equilíbrio hidrossalino. Observa-se que a ativação de algumas vias neurotransmissoras centrais, tais como: colinérgica, angiotensinérgica e α -adrenérgica, leva ao aumento da excreção renal de sódio e potássio. Por outro lado, a ativação de outras

vias neurotransmissoras centrais, como: opiatérgica, β -adrenérgica e serotoninérgica induz a inibição da excreção de eletrólitos.

A administração intracerebroventricular (ICV), ou em núcleos hipotalâmicos específicos de carbacol, um agonista colinérgico do tipo muscarínico induz aumento da natriurese, kaliurese e diminuição transitória da diurese. Estudos com lesão eletrolítica de núcleos hipotalâmicos e com administração central de carbacol sugerem que os mecanismos de controle da natriurese e da diurese são independentes (21,23,26,66).

O papel do sistema renina-angiotensina no controle da homeostasia dos fluidos corporais têm sido demonstrado extensivamente. Os efeitos periféricos da angiotensina II (ANGII) incluem estímulo da secreção da aldosterona e da vasopressina, aumento da ingestão de água e sal e diminuição da perda urinária de água e sódio. A ativação do sistema renina-angiotensina do sistema nervoso central também induz aumento da secreção de vasopressina, da sede e do apetite ao sódio e, ao contrário do efeito periférico, a ANGI central leva à diminuição da secreção de aldosterona e ao aumento da natriurese (67). O aumento da ingestão de água e sal, após a injeção central de ANGI, parece ser secundário à natriurese e pode contrabalançar a perda urinária de sódio (14,81). A integração dos mecanismos periféricos e centrais da ANGI, na regulação do balanço hidrossalino, é organizada em um complexo sistema de retroalimentação de múltiplos níveis de controle (56). Embora o mecanismo pelo qual a ANGI central induz a natriurese ainda não seja conhecido, alguns estudos sugerem a participação da vasopressina. Em primeiro lugar, devido a liberação de vasopressina induzida pela injeção central de ANGI (37,87) e, em segundo, porque a própria vasopressina induz natriurese em baixas doses, menores do que o limiar que leva a aumento da pressão arterial ou da ingestão de água (57).

A participação das vias adrenérgicas na regulação do equilíbrio hidrossalino envolve mecanismos complexos, diferindo de acordo com o tipo de receptor ativado. Em relação a excreção renal, observa-se que as vias α -adrenérgicas são estimulantes, induzindo natriurese e kaliurese, enquanto que as vias β -adrenérgicas são inibitórias, levando a antinatriurese e antikaliurese. A administração ICV de isoproterenol, um agonista β -adrenérgico, provoca antinatriurese e antikaliurese, efeito este bloqueado pelo antagonista propranolol (30,48). Por outro lado, a administração central de agonistas α -adrenérgicos induz natriurese e kaliurese (30,69). Além disto, a administração central de um antagonista α -adrenérgico, a fentolamina, abole a resposta natriurética induzida por injeção ICV de outros agentes como salina hipertônica e carbacol (62). Assim, o sistema adrenérgico central parece ser organizado em vias β -adrenérgicas que aumentam a concentração de íons e de volume dos líquidos corporais, por induzir a sede e diminuição da excreção de sódio e potássio, e em vias α -adrenérgicas que diminuem a concentração de íons e volume dos líquidos corporais, devido a inibição da ingestão hídrica e aumento da natriurese e kaliurese.

O sistema opiatérgico central parece, também, desempenhar um papel modulador no equilíbrio hidroeletrólítico. A administração central de opióides inibe a ingestão de água induzida por ANGII (54,74). Na função renal os opióides apresentam efeito inibitório, com diminuição da excreção de água, sódio e potássio. Inicialmente foi sugerido que estes efeitos eram decorrentes da secreção de vasopressina. Entretanto, os dados de dosagens plasmáticas por radioimunoensaio foram conflitantes, sendo que alguns autores observaram aumento da secreção de vasopressina (8,39), outros diminuição (33,35) e outros ainda, não observaram qualquer alteração (73). Além disso, o efeito da vasopressina sobre a excreção de eletrólitos é oposto ao dos opióides. Estudos realizados em ratos Brattleboro, portadores de deficiência

congenita da secreção de vasopressina, e em ratos hipofisectomizados ou com lesão da eminência mediana, apresentaram resposta antidiurética, antinatriurética e antikaliurética à administração de opióides (27,38). Os mecanismos pelos quais os opióides influenciam a atividade renal ainda não são claros e, se a vasopressina participa deste processo, esta parecer apenas papel secundário.

Nos últimos anos, tem-se demonstrado a participação das vias serotoninérgicas centrais no balanço hidrossalino. Estudos utilizando técnicas de lesão eletrolítica e de administração de drogas mostram um papel inibitório das vias serotoninérgicas centrais sobre a ingestão hídrica (79,82). Há evidências do envolvimento das vias serotoninérgicas na regulação da função renal. A administração central de serotonina induz aumento da natriurese, possivelmente devido a inibição da atividade do nervo simpático renal (47). Observou-se, também, aumento da atividade da renina plasmática, liberação de vasopressina e de peptídeo natriurético atrial com a estimulação serotoninérgica central (15,71,41). Provavelmente, diferentes tipos de receptores serotoninérgicos estão envolvidos na resposta renal à ativação serotoninérgica central. Verificou-se que a injeção central de um agonista dos receptores 5HT1/5HT2, o MK212, induz antidiurese (61). Por outro lado, semelhante ao que ocorre com os receptores adrenérgicos, verifica-se distinção nas respostas renais à administração central de agonistas de receptores específicos. A injeção ICV de um agonista dos receptores 5HT1A, o 8-OH-DPAT, leva a antinatriurese, enquanto um agonista dos receptores 5HT2, o DOI, induz natriurese (61).

1.3 Neurotoxicidade dos metais pesados e balanço hidrossalino

Em estudos prévios do nosso laboratório, observamos que a injeção aguda de chumbo no 3º ventrículo (3ºV) levava a inibição da ingestão hídrica em ratos privados de água por 14h (“overnight”). Além disso, verificamos que o chumbo bloqueava a resposta dipsogênica induzida por carbacol e ANGII, sugerindo que a resposta antidipsogênica do chumbo pode ser mediada pela inibição das vias colinérgicas e angiotensinérgicas centrais (28).

De maneira semelhante, a microinjeção de cádmio, no 3º V, inibe a ingestão de água nas três situações: desidratação, estimulação colinérgica e angiotensinérgica centrais. Como os metais pesados aumentam a atividade das vias serotoninérgicas centrais, e desde que estas parecem atuar como um frenador da ingestão hídrica, era lícito supor que a resposta antidipsogênica do cádmio pudesse ser resultado de uma ativação das vias serotoninérgicas. Assim, neste mesmo trabalho, se investigou também a participação das vias serotoninérgicas centrais no efeito inibitório do cádmio sobre a ingestão de água. Observou-se que a administração de RP 62203, um antagonista 5HT-2 seletivo, reverte o efeito inibitório do cádmio sobre a ingestão de água em ratos desidratados. Estes dados sugerem que a resposta antidipsogênica do cádmio pode resultar de uma inibição das vias colinérgicas e angiotensinérgicas centrais e mostram ainda que a integridade funcional dos receptores 5-HT2 pode ser importante neste efeito do metal (18).

Diversos estudos mostram alteração da excreção renal de água e eletrólitos na intoxicação por metais pesados. A nefrotoxicidade por metais pesados pode ser observada em três estágios diferentes. No primeiro estágio, que é caracterizado por uma nefropatia reversível aguda, observa-se a presença de inclusões nucleares que são complexos proteínas-metais e disfunções das células tubulares proximais com consequente mudança na excreção urinária de

eletrólitos. O segundo estágio é caracterizado por uma nefropatia crônica não reversível que consiste de fibrose intersticial, perda progressiva do néfron e falha renal. E por último, o terceiro estágio que está associado a neoplasia ou adenocarcinoma das células tubulares renais (32,42). Entretanto, não se conhece o efeito dos metais pesados no sistema nervoso central sobre o controle da excreção renal de água e eletrólitos. Assim, os objetivos do presente trabalho foram: primeiro, investigar o efeito da neurotoxicidade aguda de diferentes doses de cádmio e chumbo sobre o controle central da função renal em ratos; segundo, investigar a participação das vias angiotensinérgicas centrais nas repostas renais induzidas pela administração central aguda dos metais pesados e, terceiro, verificar se as repostas renais induzidas pela administração central aguda dos metais pesados pode ser mediada por canais de cálcio voltagem-dependentes.

2 OBJETIVOS

1. Estudar o efeito agudo da injeção de chumbo e cádmio no 3° V sobre o controle central da excreção renal de água, sódio e potássio em ratos;
2. Verificar se os possíveis efeitos na excreção renal, induzidos pela administração central de chumbo e cádmio, dependem da neurotransmissão angiotensinérgica central;
3. Verificar se as respostas renais induzidas pela administração central aguda dos metais pesados podem ser mediadas por canais de cálcio voltagem-dependentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Nos experimentos, foram utilizados ratos Wistar machos (220 e 250 g) mantidos com água e ração (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, Brasil) *ad libitum*, ciclo de luz de 12h (06:00 - 18:00) e temperatura de aproximadamente 27°C. Foram feitos 15 grupos experimentais com *n* variando entre 8 e 12 animais. Cada grupo experimental foi repetido até três vezes para confirmação dos resultados. Os dados apresentados são referentes ao grupo que apresentou maior homogeneidade nas respostas aqui estudadas.

3.2 Tratamento cirúrgico: implante de cânula guia no 3º Ventrículo

As cânulas foram confeccionadas com agulhas hipodérmicas (30X7) de aço inoxidável, com diâmetro de 0,7 mm e comprimento de 15 mm. Preparou-se também mandris inoxidáveis adaptáveis às cânulas, a fim de evitar obstrução das mesmas.

A cirurgia estereotáxica para implante da cânula guia procedeu-se em animais sob anestesia com Tiopental sódico (Thionembatal, ABBOTT), 40 mg/kg i.p., em jejum prévio de aproximadamente 12 horas. Após a tricotomia da cabeça, os ratos foram colocados no aparelho estereotáxico. Foi feita uma incisão na pele e o periósteo foi afastado, de forma a expor as suturas cranianas. Tomando-se como referência estas suturas, marcou-se o ponto de implante da cânula guia de acordo com as seguintes coordenadas: anteroposterior = 0,5mm posterior ao bregma; vertical = 8,5 mm; lateral = 0 mm; inclinação da cabeça = +0,5 mm.

O crânio foi trepanado com broca odontológica esférica n.º 7, impulsionada por um motor de baixa rotação no local de implante da cânula e em dois outros locais para colocação de parafusos auxiliares da fixação. Após a trepanação, a cânula e os parafusos foram introduzidos e fixados com acrílico autopolimerizante (Simplex, Dental do Brasil S.A).

Ao final da cirurgia, os animais receberam uma dose profilática (0,2 ml/rato i.m.) de Pentabiótico Veterinário para animais de pequeno porte (Penicilina G benzatina 600.000 U.; Penicilina G procaína 300.000 U.; Penicilina G potássica cristalina 300.000 U.; dihidroestreptomicina base (sulfato) 250 mg; estreptomicina base (sulfato) 250 mg (Laboratórios Wyeth S.A) e foram mantidos em gaiolas individuais durante cinco dias para recuperação cirúrgica e treinamento.

3.3 Treinamento dos animais

Com o intuito de habituar os animais aos procedimentos experimentais, fez-se o treinamento diário de retirada e recolocação dos mandris das cânulas implantadas. Os animais também foram acostumados a passagem de sonda orogástrica para a administração de sobrecarga hídrica. Para tal utilizou-se uma sonda traqueal (nº 6; MarkMed Ind. e Comércio Ltda) conectada a uma seringa de 20ml. Em cada sessão de treinamento os animais receberam aproximadamente 1 ml de água.

3.4 Drogas e microinjeções

As drogas utilizadas foram: cloreto de cádmio (CdCl_2), acetato de chumbo (PbAc), nas doses de 0,03 , 0,3 e 3,0 nmol/rato e acetato de sódio obtidos da Sigma Co., St. Louis, MO;

losartan na dose de 10,8 nmol/rato (Merck Research Laboratories NJ) e gadolínio, na dose de 0,3 nmol/rato (Sigma Co., St. Louis, MO).

Todas as drogas foram diluídas em solução salina e injetadas no 3º V em um volume de 2 µl durante 30 seg. A fim de minimizar o estresse, as microinjeções foram realizadas com os animais, nas próprias gaiolas metabólicas. Utilizou-se uma microseringa de 10 µl (Hamilton, Co. Inc. Whittier, C.A.) conectada a uma agulha odontológica (AG.30G) através de um tubo de polietileno (PE 10) de 30 cm de comprimento. Os animais controle receberam injeção de soluções isotônicas de NaCl ou NaAc (0,3 nmol/rato).

3.5 Procedimentos experimentais

Os animais permaneceram em jejum alimentar por 24 horas antes da sessão experimental, para evitar diferenças individuais na excreção urinária de íons, devido às variações na ingestão alimentar.

Com o objetivo de obter durante a sessão experimental, um fluxo urinário maior do que o observado em condições normais, foram realizadas duas sobrecargas hídricas, com um intervalo de 60 minutos. A água foi administrada num volume equivalente a 5% do peso corporal através de uma sonda orogástrica. Imediatamente após a primeira sobrecarga hídrica, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas. A urina coletada no período que antecedeu a 2ª sobrecarga foi desprezada. Depois dessa segunda sobrecarga, a urina foi coletada a cada 20 minutos, durante duas horas. Logo após a primeira coleta de urina, os animais receberam microinjeções no 3ºV das diferentes doses de CdCl₂ (os animais controle receberam NaCl) ou PbAc nas diferentes doses (os animais controle receberam NaAc). A

primeira coleta de urina imediatamente antes da primeira injeção 3^oV foi considerada como tempo zero e serviu como um controle pré-droga. Para cada experimento, um novo grupo de animais foi utilizado. O volume urinário foi medido em tubos graduados, que permitiram a leitura do volume excretado. As amostras de urina foram estocadas em “freezer” - 20°C para análise da concentração de sódio e potássio. No grupo experimental realizado para investigar a relação das vias angiotensinérgicas com as respostas urinárias induzidas pelo chumbo e cádmio, os animais receberam injeções no 3^oV de losartan (10,8 nmol/rato), um antagonista específico dos receptores AT1, dez minutos antes da injeção dos metais.

No grupo onde se estudou o papel do cálcio na resposta de excreção urinária induzida pelos metais, os animais receberam injeções no 3^oV de gadolínio (0,3 nmol/rato), um bloqueador dos canais de cálcio voltagem-dependentes, vinte minutos antes da injeção de CdCl₂ (3,0 nmol) ou (PbAc (3,0 nmol).

3.6 Verificação da posição da cânula

Após cada sessão experimental, os animais eram sacrificados por inalação de éter e recebiam uma injeção de 2 µl do corante Azul de Evans, através da cânula ICV. Os cérebros eram rapidamente retirados, e a posição da ponta da cânula verificada. Somente os dados dos animais, cuja extremidade da cânula se encontrava no 3^o V foram considerados. O percentual de acerto na canulação foi de 95,7%.

3.7 Análise da Urina

Em cada amostra de urina, foram medidas as concentrações em mEq/l de sódio e potássio em fotômetro de chama (Micronal, modelo B267, São Paulo, Brasil). O aparelho foi

calibrado com padrão de Na^+ 140 mmol/l e K^+ 5 mmol/l (Doles, GO). Os valores foram expressos em carga de sódio ou potássio excretada e corrigidas pelo peso corporal (nEq/min/100 g peso corporal).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA seguido do pós-teste de Scheffé, utilizando-se o “software” GBSTAT - Versão 4.0 (Dynamic Microsystem Inc., Silver Spring, MD). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados são apresentados em média \pm EPM.

3.9 Planejamento experimental

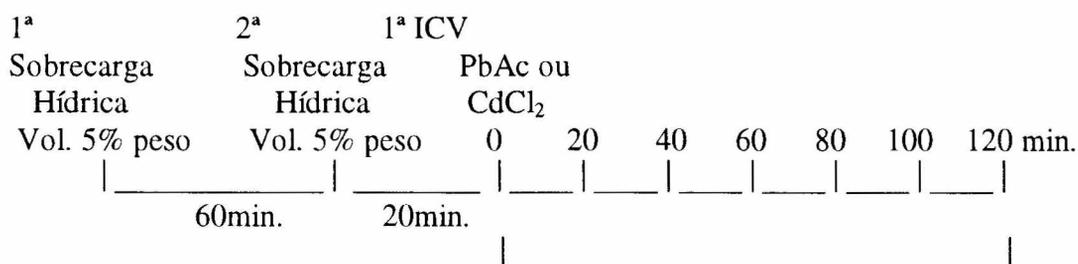
No presente trabalho, investigou-se o efeito de diferentes doses de metais pesados como cádmio e chumbo, sobre a diurese, natriurese e kaliurese e a possível interação desses metais com as vias angiotensinérgicas centrais bem como o papel do cálcio nas respostas induzidas pelos metais.

Inicialmente, os animais foram submetidos a canulação estereotáxica do 3º V para administração dos metais pesados e drogas.

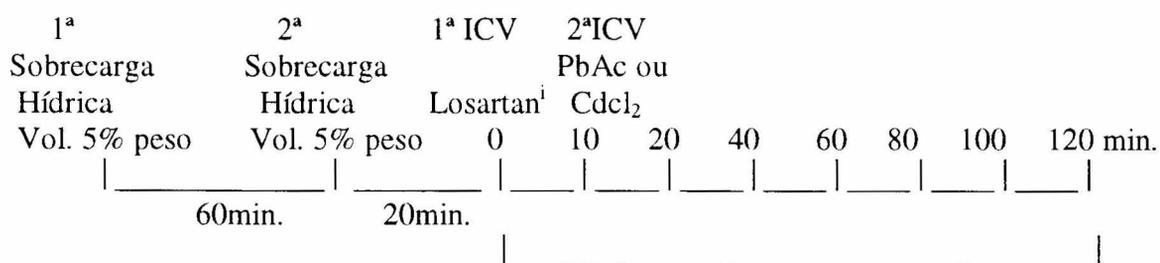
Durante o período pós-operatório de cinco dias, os animais foram habituados aos procedimentos experimentais. Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados e procedeu-se a localização macroscópica da cânula no 3º V.

A sessão experimental consistia na administração de duas sobrecargas hídricas de 5% do peso corporal por sonda orogástrica, com intervalo de 60 minutos. Após a primeira sobrecarga hídrica, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta de urina. Considerou-se início do experimento, a coleta da primeira, de uma série de sete amostras de urina. O intervalo entre cada coleta foi de 20 minutos. As drogas ou salina foram administradas, imediatamente, após a primeira coleta de urina (amostra basal) 20 minutos depois da segunda sobrecarga hídrica. Tais injeções, foram realizadas com os animais livres nas gaiolas metabólicas. O volume urinário era devidamente anotado ao final de cada período de coleta e as amostras de urina foram estocadas em “freezer”, até a dosagem espectrofotométrica da concentração de sódio e potássio. A seguir, observam-se os esquemas das sessões experimentais.

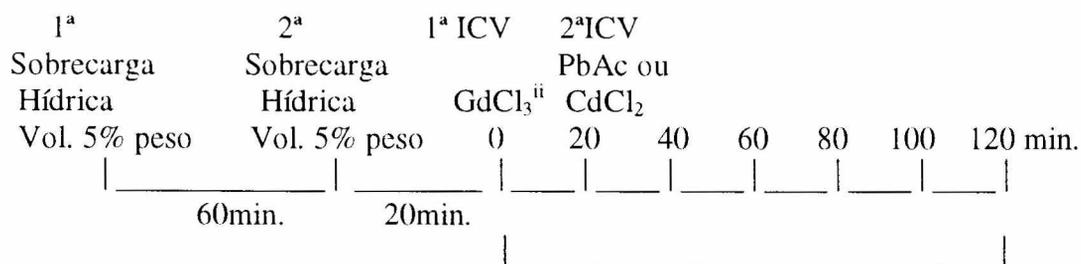
3.9.1 Desenho experimental



Coleta das amostras de urina.



Coleta das amostras de urina.



Coleta das amostras de urina.

ⁱ Losartan - Antagonista específico dos receptores angiotensinérgicos AT1

ⁱⁱ GdCl₃. Bloqueador dos canais de cálcio voltagem-dependentes

3.9.2 Grupos experimentais

3.9.2.1 Grupo experimental 1

Estudo do efeito de diferentes doses de PbAc (0,03; 0,3 e 3,0 nmol/rato), injetado no 3º V, sobre a excreção renal de água, sódio e potássio em ratos.

A finalidade deste grupo foi analisar o efeito sobre a excreção renal de água, sódio e potássio induzido pela administração central aguda de PbAc comparado com NaAc.

3.9.2.2 Grupo experimental 2

Efeito da injeção de NaAc (3,0 nmol/rato) no 3º V, sobre a excreção de água, sódio e potássio em ratos.

O objetivo deste experimento foi estudar o efeito na excreção renal de água, sódio e potássio após a administração de acetato de sódio, comparado com a injeção de salina (0,9%). Este grupo foi utilizado para que se pudesse usar o acetato de sódio como um controle válido para o acetato de chumbo. Ou seja, para verificar se o NaAc era de fato isento de ação sobre os parâmetros observados.

3.9.2.3 Grupo experimental 3

Efeito do pré-tratamento (10 min antes) com losartan, um antagonista específico dos receptores AT1, sobre a resposta de excreção renal de água, sódio e potássio induzida pela administração central aguda de chumbo (3,0 nmol/rato).

Baseando-se nos resultados do grupo experimental 1, realizou-se este grupo, com a finalidade de investigar se o efeito observado com a injeção central aguda de chumbo era devido a uma possível interação deste com as vias angiotensinérgica centrais.

3.9.2.4 Grupo experimental 4

Efeito do pré-tratamento (20 min. antes) com gadolínio (0,3 nmol/rato), um bloqueador dos canais de cálcio, sobre a resposta de excreção renal de água, sódio e potássio induzida pela administração aguda de chumbo.

Este experimento foi realizado com base nos resultados do grupo experimental 1 e com o objetivo de verificar se o efeito do chumbo sobre a excreção de água, sódio e potássio era devido a sua interação com os processos neurais mediados pelo cálcio no SNC.

3.9.2.5 Grupo experimental 5

Estudo do efeito de diferentes doses de CdCl_2 (0,03; 0,3 e 3,0 nmol/rato), injetado no 3º V, sobre a excreção renal de água, sódio e potássio .

A finalidade deste grupo foi analisar o efeito sobre a excreção renal de água, sódio e potássio induzido pela administração central aguda de cádmio comparado com a de NaCl.

3.9.2.6 Grupo experimental 6

Efeito do pré-tratamento (10 min antes) com losartan (10,8 nmol/rato) um antagonista dos receptores AT1, sobre a resposta de excreção renal de água, sódio e potássio induzida pela administração central aguda de cádmio (3,0 nmol/rato).

Com base nos resultados do grupo experimental 5, realizou-se este grupo, com o objetivo de verificar se o efeito do cádmio sobre a excreção de água, sódio e potássio era devido a sua interação com as vias angiotensinérgicas centrais.

3.9.2.7 Grupo experimental 7

Efeito do pré-tratamento (20 min antes) com gadolínio (0,3 nmol/rato), um bloqueador dos canais de cálcio, sobre a resposta de excreção renal de água, sódio e potássio induzida pela administração aguda de cádmio.

Este experimento foi realizado com base nos resultados do grupo experimental 5, com o objetivo de estudar se o efeito do cádmio sobre a excreção de água e sódio e potássio era devido a sua interação com os processos neurais mediados pelos canais de cálcio voltagem-dependentes no SNC.

3.9.2.8 Grupo experimental 8

Efeito do tratamento com losartan (10,8 nmol/rato) sobre a excreção renal de água, sódio e potássio.

Este experimento procura investigar o efeito do bloqueio dos receptores AT1 da ANGII sobre os parâmetros observados, desde que este antagonista da ANGII foi utilizado, em combinação com os metais, para a avaliação da participação angiotensinérgica central nos efeitos induzidos pela injeção de cada um deles isoladamente.

3.9.2.9 Grupo experimental 9

Efeito do tratamento com gadolínio (0,3 nmol/rato) sobre a excreção renal de água, sódio e potássio.

Este experimento procura investigar o efeito do bloqueio dos canais de cálcio voltagem-dependentes pelo gadolínio sobre os parâmetros observados, desde que este mesmo agente foi utilizado, em combinação com os metais, para a avaliação da participação dos canais de cálcio nos efeitos induzidos pela injeção de cada um deles, isoladamente.

4 RESULTADOS

O grupo experimental 2 revelou que os animais tratados com injeções ICV de NaAc e salina apresentaram resultados similares para todos os parâmetros observados: fluxo urinário e excreção de sódio e de potássio. Assim, o uso de NaAc como controle dos animais que receberam PbAc é adequado.

Na Tabela 1 e Figura 1, observam-se os resultados da administração de chumbo em diferentes doses (0,03; 0,3 e 3,0 nmol/rato) no 3ºV sobre a excreção renal de água, sódio e potássio. No painel A da Figura 1, verifica-se que o fluxo urinário aumentou após a segunda sobrecarga hídrica, mas não diferiu entre os animais que receberam PbAc e os animais controle que receberam NaAc. No painel B, observa-se que a excreção renal de sódio é significativamente aumentada naqueles animais que receberam PbAc, quando comparados aos animais controle. A dose de 0,03 foi ineficaz. Os animais que receberam a dose intermediária de PbAc (0,3 nmol/rato) apresentaram aumento da excreção urinária de sódio nos primeiros quarenta minutos, retornando aos valores basais após 60 minutos. Aqueles animais que receberam a dose mais alta de PbAc (3,0 nmol/rato), apresentaram um acentuado aumento da natriurese durante toda a duração da sessão experimental, quando comparados com os animais controle. Quanto a excreção de potássio, pode-se observar no painel C que esta foi consideravelmente aumentada após a injeção de PbAc em relação aos animais controle. A menor dose (0,03 nmol) não gerou efeito significativo. Os animais que receberam a dose intermediária (0,3 nmol) tiveram a kaliurese aumentada desde o tempo 40 min até 100 min da sessão experimental. Nos animais que receberam a dose maior (3,0 nmol), a kaliurese foi aumentada durante todo o tempo da sessão experimental, quando comparados com os animais controle.

TABELA 1 - Efeito da injeção de PbAc (0,03 ; 0,3 e 3,0 nmol/rato) no 3º Ventrículo sobre a excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Dados são expressos em média \pm EPM

Tempo (min)		Controle NaAc 3,0nmol (n=9)	PbAc 0,03nmol (n=8)	PbAc 0,3nmol (n=8)	PbAc 3nmol (n=10)
0	Vol	32.75 \pm 4.76	45.62 \pm 9.70	32.36 \pm 3.15	43.76 \pm 11.95
	Na	63.13 \pm 7.02	85.38 \pm 12.08	58.76 \pm 8.51	81.39 \pm 9.31
	K	112.08 \pm 6.07	101.73 \pm 16.25	98.43 \pm 11.50	112.30 \pm 7.11
20	Vol	49.10 \pm 5.87	65.32 \pm 6.44	41.34 \pm 4.17	65.39 \pm 7.28
	Na	109.02 \pm 17.25	118.23 \pm 19.03	*227.28 \pm 23.12	*374.11 \pm 77.67
	K	95.86 \pm 7.71	138.67 \pm 24.37	122.32 \pm 26.90	*414.58 \pm 54.05
40	Vol	68.60 \pm 12.29	57.44 \pm 5.98	72.07 \pm 10.06	58.00 \pm 11.35
	Na	102.97 \pm 18.40	127.52 \pm 21.14	*327.47 \pm 46.42	*335.64 \pm 64.33
	K	113.06 \pm 15.59	110.16 \pm 19.92	*262.36 \pm 77.92	*320.33 \pm 63.27
60	Vol	56.70 \pm 7.81	64.03 \pm 6.82	56.44 \pm 9.71	66.18 \pm 11.58
	Na	139.72 \pm 22.95	104.77 \pm 13.84	203.97 \pm 24.13	*413.50 \pm 71.32
	K	112.02 \pm 10.58	151.12 \pm 35.42	*199.78 \pm 51.11	*382.11 \pm 84.15
80	Vol	47.07 \pm 5.22	59.84 \pm 8.14	51.18 \pm 10.20	51.65 \pm 10.20
	Na	98.98 \pm 16.73	144.92 \pm 23.05	161.29 \pm 26.94	*401.12 \pm 86.12
	K	80.76 \pm 8.88	146.75 \pm 43.06	*264.49 \pm 77.75	*324.12 \pm 64.84
100	Vol	39.00 \pm 5.90	48.83 \pm 8.19	51.18 \pm 10.58	37.30 \pm 6.99
	Na	104.19 \pm 19.35	117.23 \pm 25.25	198.50 \pm 26.94	*314.86 \pm 62.49
	K	91.05 \pm 11.20	107.71 \pm 19.46	*248.93 \pm 59.16	*223.81 \pm 24.11
120	Vol	21.19 \pm 6.81	38.18 \pm 10.36	41.95 \pm 5.98	32.97 \pm 7.18
	Na	81.80 \pm 21.26	115.77 \pm 32.83	145.10 \pm 26.08	*265.65 \pm 79.59
	K	92.74 \pm 16.76	139.91 \pm 44.19	206.51 \pm 36.38	*261.33 \pm 62.67

Vol = volume urinário em μ l/min/100 g peso corporal

Na = carga excretada de sódio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

K = carga excretada de potássio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

* ($p < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controle

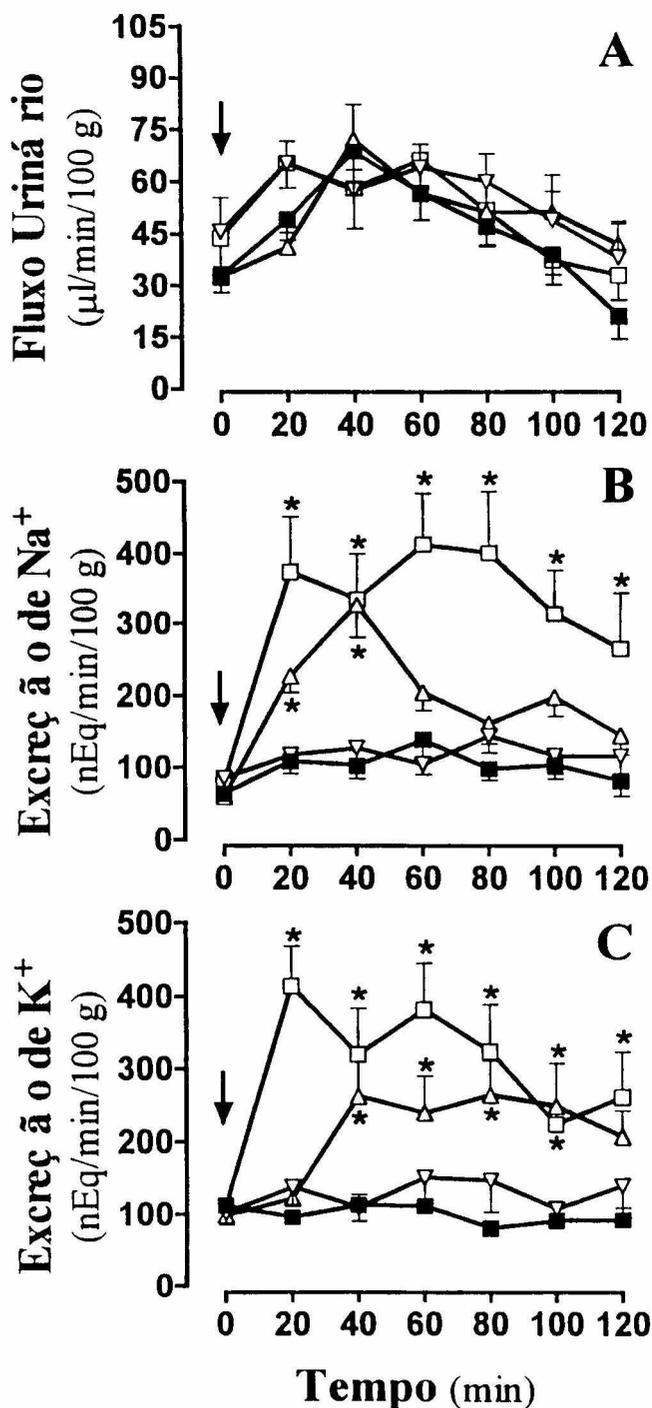


Figura 1 - Efeito no fluxo urinário (painel A), excreção renal de sódio (painel B) e excreção renal de potássio (painel C) após injeções no 3° ventrículo de PbAc em diferentes doses [0.03 (∇), 0.3 (Δ) e 3.0 nmol/rato (\square)] ou NaAc (\blacksquare). O tempo zero corresponde ao volume urinário, excreção de sódio e potássio medidos imediatamente antes da injeção de PbAc. As setas indicam o momento onde o PbAc ou NaAc foram injetados. Os asteriscos indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu PbAc em relação ao grupo que recebeu NaAc. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

Na Tabela 2 e Figura 2, encontram-se os resultados do pré-tratamento (10 min. antes) com losartan um antagonista específico dos receptores AT1, sobre a excreção renal de água, sódio e potássio induzida pela administração aguda de acetato de chumbo. Na Figura 2 no painel A, observa-se que o fluxo urinário após a segunda sobrecarga hídrica dos animais pré-tratados com losartan (10,8 nmol/rato) que receberam chumbo não diferiu significativamente daquele apresentado pelos animais que receberam apenas PbAc na dose maior (3,0 nmol/rato). O pré-tratamento com o losartan (10,8 nmol/rato) bloqueou a resposta natriurética induzida pelo chumbo. De fato, quando se compara a resposta natriurética dos animais pré-tratados com losartan com aquela dos animais tratados apenas com chumbo, há um bloqueio significativo na excreção renal de sódio entre os minutos 20 e 100 da sessão experimental. No painel C, verifica-se um quadro similar. O pré-tratamento com losartan também bloqueou significativamente a kaliurese induzida pela administração central de PbAc na sua maior dose nos primeiros 80 minutos da sessão experimental.

TABELA 2 - Efeito da injeção de Losartan (10,8 nmol/rato) injetado no 3º ventrículo dez minutos antes da injeção de PbAc (3,0 nmol/rato) sobre a excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Dados são expressos em média \pm EPM.

Tempo (min)		Controle NaAc 3nmol (n=9)	PbAc 3nmol (n=10)	PbAc 3,0nmol + Losartan 10,8 nmol (n=8)
0	Vol	32.75 \pm 4.76	43.76 \pm 11.95	29.82 \pm 5.60
	Na	63.13 \pm 7.02	81.39 \pm 9.31	59.61 \pm 10.33
	K	112.08 \pm 6.07	112.30 \pm 7.11	102.86 \pm 18.43
20	Vol	49.10 \pm 5.87	65.39 \pm 7.28	45.99 \pm 9.39
	Na	109.02 \pm 17.25	*374.11 \pm 77.67	#72.71 \pm 13.20
	K	95.86 \pm 7.71	*414.58 \pm 54.05	#146.71 \pm 32.13
40	Vol	68.60 \pm 12.29	58.00 \pm 11.35	74.41 \pm 10.82
	Na	102.97 \pm 18.40	*335.64 \pm 64.33	#88.52 \pm 14.15
	K	113.06 \pm 15.59	*320.33 \pm 63.27	#146.20 \pm 28.49
60	Vol	56.70 \pm 7.81	66.18 \pm 11.58	69.40 \pm 6.97
	Na	139.72 \pm 22.95	*413.50 \pm 71.32	#63.12 \pm 9.66
	K	112.02 \pm 10.58	*382.11 \pm 84.15	#101.42 \pm 18.75
80	Vol	47.07 \pm 5.22	51.65 \pm 10.20	51.06 \pm 4.88
	Na	98.98 \pm 16.73	*401.12 \pm 86.12	#78.42 \pm 13.32
	K	80.76 \pm 8.88	*324.12 \pm 64.84	#150.28 \pm 23.99
100	Vol	39.00 \pm 5.90	37.30 \pm 6.99	49.06 \pm 2.61
	Na	104.19 \pm 19.35	*314.86 \pm 62.49	#66.73 \pm 16.12
	K	91.05 \pm 11.20	*223.81 \pm 24.11	185.30 \pm 22.92
120	Vol	21.19 \pm 6.81	32.97 \pm 7.18	40.62 \pm 10.63
	Na	81.80 \pm 21.26	*265.65 \pm 79.59	131.82 \pm 36.00
	K	92.74 \pm 16.76	*261.33 \pm 62.67	162.80 \pm 28.81

Vol = volume urinário em μ l/min/100 g peso corporal

Na = carga excretada de sódio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

K = carga excretada de potássio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

* ($p < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controle

($p < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais tratados apenas com metal

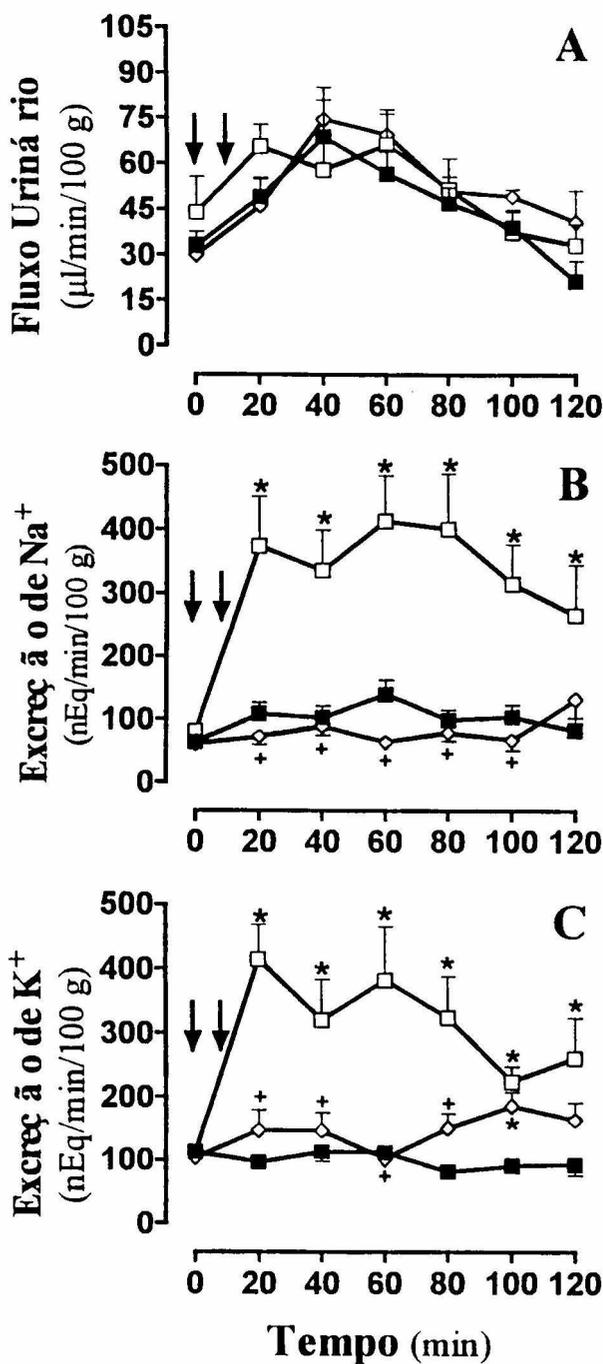


FIGURA 2 -Efeito no fluxo urinário (painel A), excreção renal de sódio (painel B) e excreção renal de potássio (painel C) em animais pré-tratados com losartan 10,8 nmol/rato 10 minutos antes da administração de PbAc 3,0 nmol/rato (◇) no 3^oV, comparados com os animais tratados apenas com PbAc [3,0 nmol/rato (□)] ou NaAc (■). A primeira seta indica o momento da injeção do chumbo. A segunda indica o momento da injeção de losartan. O tempo zero corresponde ao volume urinário e excreção de sódio e potássio imediatamente antes da injeção de chumbo. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu PbAc comparado com o seu respectivo controle. O sinal (+) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu o PbAc quando comparado com o grupo que recebeu PbAc + losartan. Dados são apresentados como média \pm EPM.

Na Tabela 3 e Figura 3, verificam-se os resultados do pré-tratamento (20 min antes) com gadolínio (0,3 nmol/rato), um bloqueador dos canais de cálcio, sobre a excreção renal de água, sódio e potássio induzida pela administração aguda de acetato de chumbo. Na Figura 3 painel A, observa-se que os animais pré-tratados com gadolínio apresentaram fluxo urinário similar ao dos animais que receberam acetato de chumbo na dose de 3,0 nmol/rato.

No painel B, fica evidente que o pré-tratamento com gadolínio (0,3 nmol/rato) foi capaz de induzir um bloqueio significativo da natriurese induzida pelo tratamento com PbAc durante toda a duração do experimento. Esta mesma situação se repete no que concerne a kaliurese induzida pelo tratamento com PbAc desde que, como se observa no painel C, os animais pré-tratados com gadolínio que receberam chumbo não mais apresentam uma exuberante kaliurese e se comportam como os controles tratados apenas com NaAc.

TABELA 3 - Efeito da injeção de Gadolínio (0,3 nmol/rato) injetado no 3º ventrículo vinte minutos antes da injeção de PbAc (3,0 nmol/rato) sobre a excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Dados são expressos em média \pm EPM.

Tempo (min)		Controle NaAc3,0 nmol n=10	PbAc 3,0 nmol n=10	PbAc 3,0nmol + Gadolínio 0,3 nmol n=9
0	Vol	32.75 \pm 4.76	43.76 \pm 11.95	38.25 \pm 7.51
	Na	63.13 \pm 7.02	81.39 \pm 9.31	65.18 \pm 12.66
	K	112.08 \pm 6.07	112.30 \pm 7.11	116.70 \pm 9.03
20	Vol	49.10 \pm 5.87	65.39 \pm 7.28	63.39 \pm 12.79
	Na	109.02 \pm 17.25	*374.11 \pm 77.67	#87.20 \pm 9.74
	K	95.86 \pm 7.71	*414.58 \pm 54.05	#95.31 \pm 5.60
40	Vol	68.60 \pm 12.29	58.00 \pm 11.35	65.29 \pm 11.03
	Na	102.97 \pm 18.40	*335.64 \pm 64.33	#77.36 \pm 9.90
	K	113.06 \pm 15.59	*320.33 \pm 63.27	#91.29 \pm 8.61
60	Vol	56.70 \pm 7.81	66.18 \pm 11.58	63.19 \pm 5.99
	Na	139.72 \pm 22.95	*413.50 \pm 71.32	#85.53 \pm 8.92
	K	112.02 \pm 10.58	*382.11 \pm 84.15	#86.61 \pm 9.44
80	Vol	47.07 \pm 5.22	51.65 \pm 10.20	69.35 \pm 7.93
	Na	98.98 \pm 16.73	*401.12 \pm 86.12	#82.77 \pm 6.16
	K	80.76 \pm 8.88	*324.12 \pm 64.84	#89.15 \pm 8.22
100	Vol	39.00 \pm 5.90	37.30 \pm 6.99	54.59 \pm 5.91
	Na	104.19 \pm 19.35	*314.86 \pm 62.49	#78.95 \pm 7.36
	K	91.05 \pm 11.20	*223.81 \pm 24.11	#110.76 \pm 15.78
120	Vol	21.19 \pm 6.81	32.97 \pm 7.18	43.09 \pm 7.34
	Na	81.80 \pm 21.26	*265.65 \pm 79.59	#105.93 \pm 16.26
	K	92.74 \pm 16.76	*261.33 \pm 62.67	#125.17 \pm 17.31

Vol = volume urinário em μ l/min/100 g peso corporal

Na = carga excretada de sódio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

K = carga excretada de potássio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

* ($p < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controle

($p < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais tratados apenas com metal

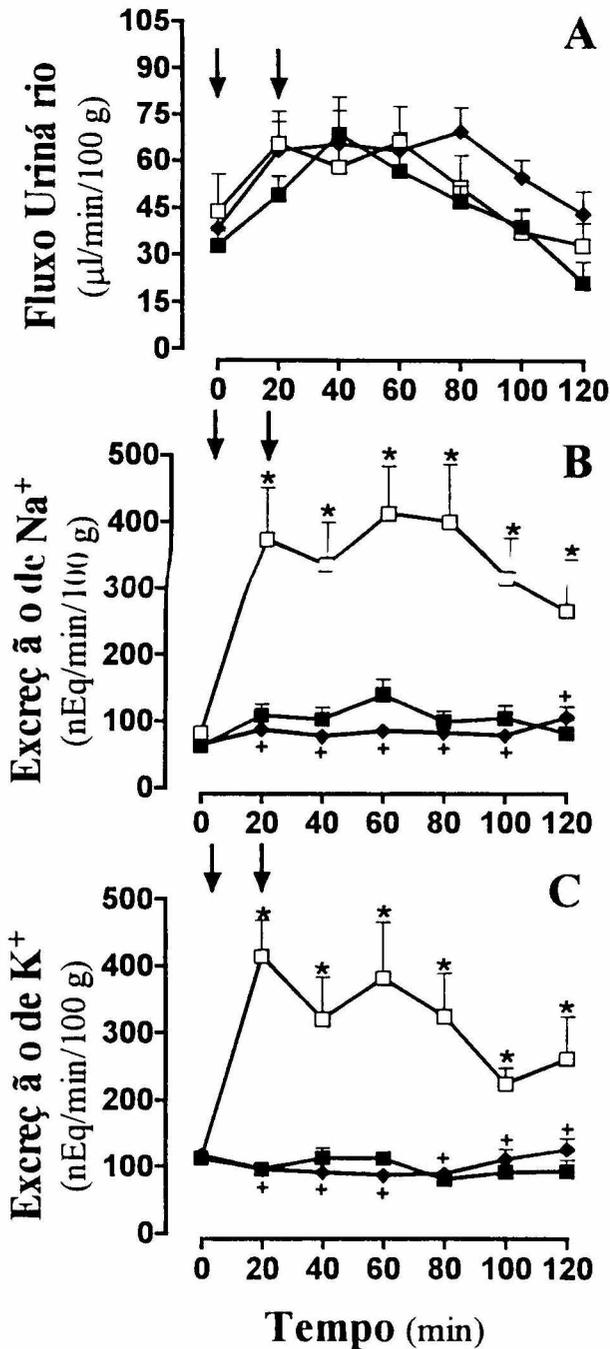


FIGURA 3- Efeito no fluxo urinário (painel A), excreção renal de sódio (painel B) e excreção renal de potássio (painel C) em animais pré-tratados com gadolínio 0,3 nmol/rato 20 minutos antes da administração de PbAc 3,0 nmol/rato (\blacklozenge) no 3^oV, comparados com animais tratados apenas com PbAc [3,0 nmol/rato (\square)] ou NaAc (\blacksquare). A primeira seta indica o momento da injeção do metal. A segunda indica o momento da injeção de gadolínio. O tempo zero corresponde ao volume urinário e excreção de sódio e potássio imediatamente antes da injeção de chumbo. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu PbAc comparado com o seu controle. O sinal (+) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu o metal, quando comparado com o grupo que recebeu metal + gadolínio. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

Na Tabela 4 e Figura 4, observam-se os resultados da administração de cádmio em diferentes doses (0,03; 0,3 e 3,0 nmol/rato) no 3ºV sobre a excreção renal de água, sódio e potássio. No painel A, verifica-se que o fluxo urinário aumentou de forma similar em todos os grupos após a segunda sobrecarga hídrica. A administração do CdCl₂ foi incapaz portanto de modificar o fluxo urinário quando comparado com os animais controle tratados com NaCl. Por outro lado, as injeções de CdCl₂ induziram uma resposta natriurética (Painel B). Mesmo na menor dose empregada (0,03 nmol) o CdCl₂ gerou um significativo aumento na excreção renal de sódio que ocorreu entre os períodos de 40 e 80 minutos após injeção do metal. A dose intermediária do CdCl₂ (0,3 nmol) também produziu um significativo aumento na resposta natriurética, observada desde os 20 minutos até os 60 minutos. Na dose mais alta (3,0 nmol), o aumento da resposta natriurética foi observado dos 20 minutos iniciais aos 100 minutos. Nenhuma das doses empregadas de CdCl₂ foi capaz de manter a resposta natriurética aumentada durante todo o experimento. Quanto a excreção de potássio, pode-se observar no painel C que esta foi aumentada após a injeção de CdCl₂ em relação aos animais controle. Mesmo na dose menor (0,03 nmol) foi observado que a kaliurese estava aumentada apenas no tempo 40 min. Os animais que receberam a dose intermediária de CdCl₂ (0,3 nmol) tiveram a kaliurese aumentada nos tempos 20, 40, 100 e 120 min da sessão experimental. Nos animais que receberam a dose maior de CdCl₂ (3,0 nmol), a kaliurese foi aumentada durante todo o tempo da sessão experimental quando comparados com os animais controle.

TABELA 4 - Efeito da injeção de CdCl₂ (0,03 ; 0,3 e 3,0 nmol/rato) no 3º ventrículo sobre a excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Dados são expressos como média ± EPM.

Tempo (min)		Controle NaCl 0,9% (n=9)	CdCl ₂ 0,03 nmol (n=12)	CdCl ₂ 0,3 nmol (n=8)	CdCl ₂ 3,0 nmol (n=9)
0	Vol	41.30 ± 4.75	47.52 ± 3.89	32.38 ± 3.76	47.44 ± 6.97
	Na	81.81 ± 14.41	90.88 ± 8.72	81.88 ± 11.60	85.84 ± 11.92
	K	118.36 ± 13.35	82.90 ± 7.85	83.56 ± 9.77	96.17 ± 8.31
20	Vol	58.32 ± 8.63	54.14 ± 4.43	53.22 ± 3.12	55.47 ± 7.93
	Na	110.59 ± 17.01	205.56 ± 42.87	*161.51 ± 16.09	*186.68 ± 19.31
	K	120.82 ± 14.95	*175.03 ± 14.00	*159.11 ± 12.65	*238.26 ± 23.70
40	Vol	60.77 ± 7.18	61.19 ± 6.70	69.41 ± 7.11	57.15 ± 11.46
	Na	104.12 ± 15.70	*170.61 ± 19.47	*168.57 ± 12.35	*268.64 ± 39.95
	K	108.75 ± 17.38	151.37 ± 13.97	*170.33 ± 13.65	*266.78 ± 35.02
60	Vol	62.94 ± 4.14	52.30 ± 4.95	66.76 ± 2.78	55.62 ± 7.28
	Na	89.68 ± 8.42	*187.06 ± 23.65	*167.06 ± 10.48	*252.05 ± 30.42
	K	99.70 ± 15.13	153.00 ± 10.34	153.86 ± 8.11	*252.95 ± 35.27
80	Vol	60.65 ± 3.30	50.00 ± 5.58	63.00 ± 7.86	63.89 ± 4.88
	Na	112.41 ± 10.85	*142.99 ± 21.52	171.71 ± 9.66	*261.90 ± 11.24
	K	113.48 ± 17.13	177.80 ± 10.47	139.79 ± 10.52	*258.08 ± 30.07
100	Vol	58.76 ± 7.07	46.51 ± 5.15	53.00 ± 3.97	55.10 ± 5.81
	Na	92.38 ± 10.85	117,20 ± 20.14	94.76 ± 10.42	*266.25 ± 30.62
	K	106.14 ± 17.34	193.45 ± 23.65	*167.28 ± 13.57	*289.73 ± 34.01
120	Vol	52.10 ± 10.45	27.45 ± 5.08	42.16 ± 5.88	31.96 ± 5.40
	Na	83.59 ± 19.74	123.02 ± 15.18	102.20 ± 14.74	122.81 ± 15.08
	K	93.88 ± 22.30	174.42 ± 23.57	*171.10 ± 18.21	*187.13 ± 29.75

Vol = volume urinário em µl/min/100 g peso corporal

Na = carga excretada de sódio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

K = carga excretada de potássio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

*(p < 0,05) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controle

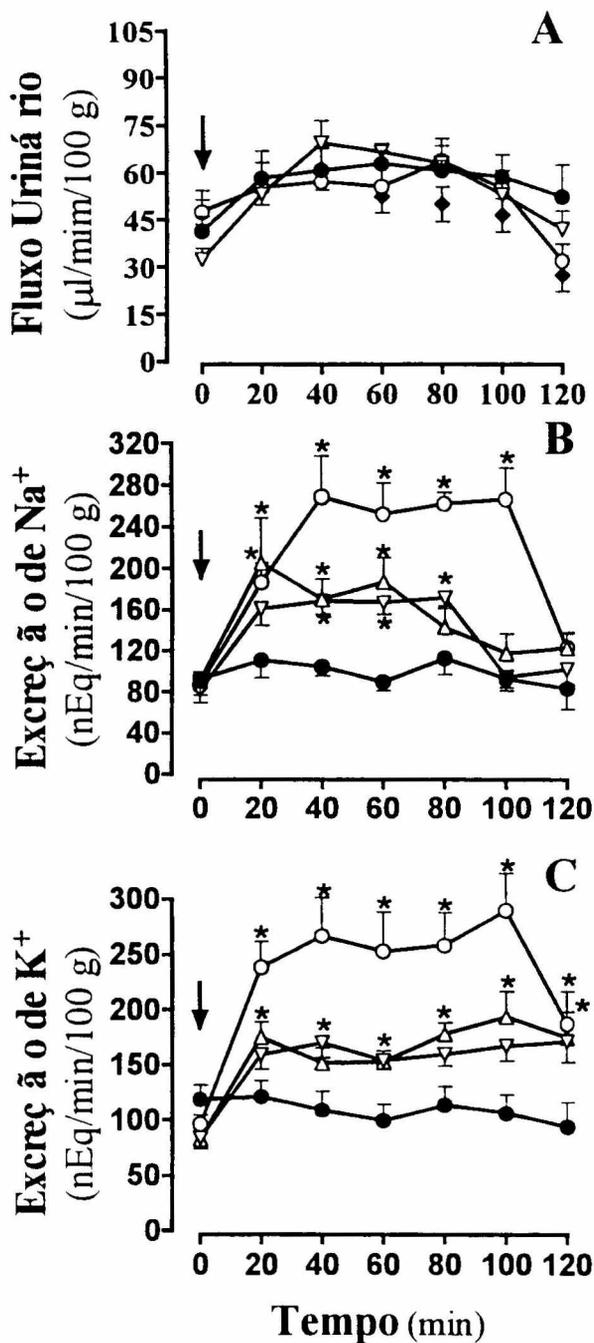


FIGURA 4 -Efeito no fluxo urinário (painel A), excreção renal de sódio (painel B) e excreção renal de potássio (painel C) após injeções no 3º ventrículo de CdCl₂ em diferentes doses [0.03 (▽), 0.3 (Δ) e 3.0 nmol/rato (O)] ou NaCl (●). O tempo zero corresponde ao volume urinário e excreção de sódio e potássio medidos imediatamente antes da injeção de CdCl₂. As setas indicam o momento onde o CdCl₂ ou NaCl foram injetados. Os asteriscos indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu CdCl₂ em relação ao que recebeu NaCl. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

Na Tabela 5 e Figura 5, encontram-se os resultados do pré-tratamento (10 min. antes) com losartan, um antagonista específico dos receptores AT1, sobre a excreção renal de água, sódio e potássio induzida pela administração aguda de CdCl₂. No painel A, observa-se que o fluxo urinário dos animais pré-tratados com losartan que receberam cádmio não foi significativamente diferente do daqueles animais que receberam injeção de cádmio na dose maior (3,0 nmol/rato). No painel B, fica claro que a natriurese induzida pela administração de CdCl₂ é significativamente bloqueada pelo pré-tratamento com losartan (10,8 nmol/rato). De fato, ao se comparar o grupo tratado apenas com cádmio com aquele tratado com cádmio porém pré-tratado com losartan se verifica um bloqueio significativo da resposta natriurética neste último grupo entre os minutos 20 e 80 da sessão experimental. Ao contrário, este mesmo pré-tratamento com losartan foi incapaz de modificar o aumento da kaliurese induzida pela administração de CdCl₂. De fato, embora exista uma tendência para a redução da kaliurese no grupo pré-tratado com losartan se comparada àquele tratado com o metal apenas, esta diferença não é estatisticamente significativa (painel C).

TABELA 5 - Efeito da injeção de Losartan (10,8 nmol/rato) injetado no 3º Ventrículo dez minutos antes da injeção de CdCl₂ (3,0 nmol/rato) sobre a excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Dados são expressos em média ± EPM.

Tempo (min)		Controle NaCl 0,9% (n=9)	CdCl ₂ 3,0 nmol (n=9)	CdCl ₂ 3,0nmol + Losartan 10,8 nmol (n=10)
0	Vol	41.30 ± 4.75	47.44 ± 6.97	36.94 ± 3.43
	Na	81.81 ± 14.41	85.84 ± 11.92	58.97 ± 11.15
	K	118.36 ± 13.35	96.17 ± 8.31	120.46 ± 23.75
20	Vol	58.32 ± 8.63	55.47 ± 7.93	50.49 ± 8.61
	Na	110.59 ± 17.01	*186.68 ± 19.31	#82.73 ± 13.73
	K	120.82 ± 14.95	*238.26 ± 23.70	206.69 ± 58.01
40	Vol	60.78 ± 7.18	57.15 ± 11.46	54.51 ± 7.10
	Na	104.12 ± 15.70	*268.64 ± 39.95	#103.15 ± 43.77
	K	108.75 ± 17.38	*266.78 ± 35.02	193.38 ± 47.05
60	Vol	62.94 ± 4.14	55.62 ± 7.28	51.03 ± 7.33
	Na	89.68 ± 8.42	*252.05 ± 30.42	#98.78 ± 26.46
	K	99.70 ± 15.13	*252.95 ± 35.27	154.19 ± 42.85
80	Vol	60.65 ± 3.30	63.89 ± 4.88	57.94 ± 3.82
	Na	112.41 ± 0.85	*261.90 ± 11.24	#93.97 ± 28.91
	K	113.48 ± 7.13	*258.08 ± 30.07	163.02 ± 40.42
100	Vol	58.77 ± 7.07	55.10 ± 5.81	66.37 ± 8.91
	Na	92.38 ± 0.85	*266.25 ± 30.62	169.40 ± 55.21
	K	106.14 ± 17.34	*289.73 ± 34.01	*359.52 ± 43.37
120	Vol	52.10 ± 10.45	31.96 ± 5.40	41.80 ± 9.10
	Na	83.59 ± 19.74	122.81 ± 15.08	99.97 ± 32.69
	K	93.88 ± 22.30	*187.13 ± 29.75	*238.83 ± 46.68

Vol = volume urinário em µl/min/100 g peso corporal

Na = carga excretada de sódio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

K = carga excretada de potássio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

* (p < 0,05) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controle

(p < 0,05) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais tratados apenas com metal

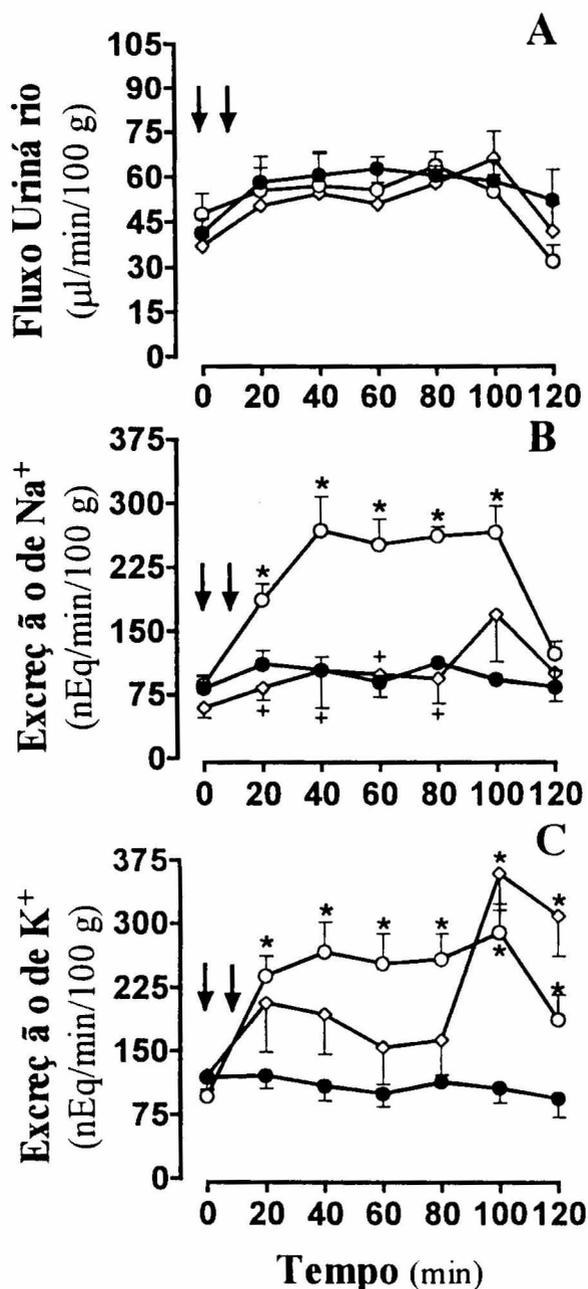


FIGURA 5 -Efeito no fluxo urinário (painel A), excreção renal de sódio (painel B) e excreção renal de potássio (painel C) em animais pré-tratados com losartan 10,8 nmol/rato 10 minutos antes da administração de CdCl₂ 3,0 nmol/rato (◇) no 3^oV, comparados com os animais que receberam apenas CdCl₂ [3,0 nmol/rato (○)] ou NaCl (●). A primeira seta indica o momento da injeção do cádmio. A segunda indica o momento da injeção de losartan. O tempo zero corresponde ao volume urinário e excreção de sódio e potássio imediatamente antes da injeção de cádmio. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu CdCl₂ comparado com o seu respectivo controle. O sinal (+) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu o metal quando comparado com o grupo que recebeu metal + losartan. Dados são apresentados como média ± EPM.

Na Tabela 6 e Figura 6, verificam-se os resultados do pré-tratamento (20 min antes) com gadolínio (0,3 nmol/rato), um bloqueador dos canais de cálcio, sobre a excreção renal de água, sódio e potássio induzida pela administração aguda de CdCl₂. Na figura 6 painel A, observa-se que o pré-tratamento com gadolínio não modificou o fluxo urinário, quando comparado com os animais que receberam CdCl₂ (3,0 nmol/rato). No painel B, evidencia-se que o pré-tratamento com o gadolínio (0,3 nmol/rato) é eficaz em bloquear a natriurese induzida pela administração central de CdCl₂ (3,0 nmol/rato) entre os minutos 20 e 100 da sessão experimental. Da mesma forma, o pré-tratamento com o gadolínio foi também capaz de bloquear significativamente a kaliurese induzida por CdCl₂ entre os minutos 20 a 100 da sessão experimental (painel C).

TABELA 6 - Efeito da injeção de Gadolínio (0.3nmol) injetado no 3º Ventrículo vinte minutos antes da injeção de CdCl₂ (3,0 nmol/rato) sobre a excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Dados são expressos em média ± EPM.

Tempo (min)		Controle NaCl 0,9% (n=9)	CdCl ₂ 3,0 nmol (n=9)	CdCl ₂ 3,0 nmol + GdCl ₃ 0,3 nmol (n=9)
0	Vol	41.30 ± 4.75	47.44 ± 6.97	36.07 ± 6.43
	Na	81.81 ± 14.41	85.84 ± 11.92	80.53 ± 12.66
	K	118.36 ± 13.35	96.17 ± 8.31	93.11 ± 21.66
20	Vol	58.32 ± 8.63	55.47 ± 7.93	56.29 ± 10.22
	Na	110.59 ± 17.01	*186.68 ± 19.31	#99.36 ± 21.51
	K	120.82 ± 14.95	*238.26 ± 23.70	#154.35 ± 19.88
40	Vol	60.77 ± 7.18	57.15 ± 11.46	48.35 ± 15.26
	Na	104.12 ± 15.70	*268.64 ± 39.95	#86.64 ± 48.32
	K	108.75 ± 17.38	*266.78 ± 35.02	#94.86 ± 29.62
60	Vol	62.94 ± 4.14	55.62 ± 7.28	52.36 ± 3.14
	Na	89.68 ± 8.42	*252.05 ± 30.42	#115.98 ± 24.58
	K	99.70 ± 15.13	*252.95 ± 35.27	#126.62 ± 35.99
80	Vol	60.65 ± 3.30	63.89 ± 4.88	54.60 ± 4.64
	Na	112.41 ± 10.85	*261.90 ± 11.24	#96.28 ± 26.26
	K	113.48 ± 17.13	*258.08 ± 30.07	#92.76 ± 11.31
100	Vol	58.76 ± 7.07	55.10 ± 5.81	50.72 ± 14.10
	Na	92.38 ± 10.85	*266.25 ± 30.62	#128.15 ± 44.39
	K	106.14 ± 17.34	*289.73 ± 34.01	#151.59 ± 30.41
120	Vol	52.10 ± 10.45	31.96 ± 5.40	38.55 ± 15.30
	Na	83.59 ± 19.74	122.81 ± 15.08	112.15 ± 32.64
	K	93.88 ± 22.30	*187.13 ± 29.75	259.16 ± 69.82

Vol = volume urinário em µl/min/100 g peso corporal

Na = carga excretada de sódio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

K = carga excretada de potássio urinário em nEq/min/100 g de peso corporal

* (p < 0,05) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controle

(p < 0,05) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais tratados apenas com metal

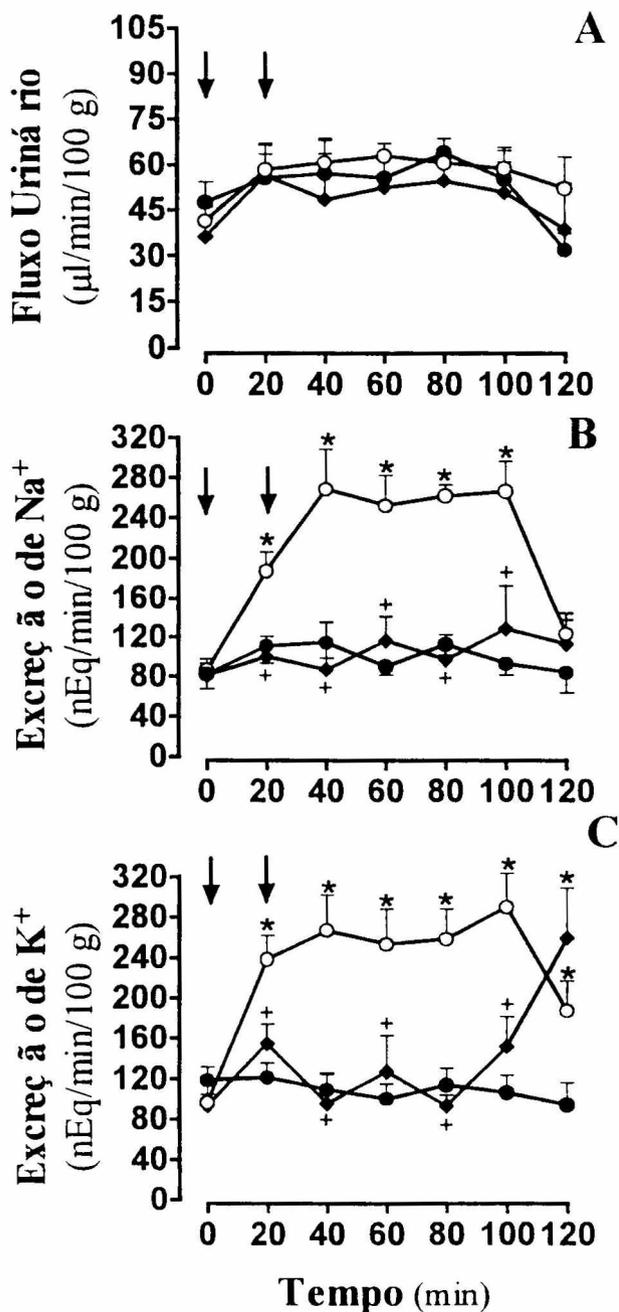


FIGURA 6-Efeito no fluxo urinário (painel A), excreção renal de sódio (painel B) e excreção renal de potássio (painel C) em animais pré-tratados com gadolínio 0,3 nmol/rato 20 minutos antes da administração de CdCl₂ 3,0 nmol/rato (◆) no 3^oV, comparados com os animais que receberam apenas [CdCl₂ 3,0 nmol/rato (○)] ou NaCl (●). A primeira seta indica o momento da injeção do metal. A segunda indica o momento da injeção de gadolínio. O tempo zero corresponde ao volume urinário e excreção de sódio e potássio imediatamente antes da injeção de cádmio. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu PbAc com o controle. O sinal (+) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que recebeu o metal quando comparado com o grupo que recebeu metal + gadolínio. Dados são apresentados como média ± EPM.

Como se observa na Tabela 7 e Figura 7, a injeção central de losartan isoladamente, na mesma dose empregada anteriormente (10,8 nmol/rato), quando o losartan serviu de pré-tratamento à injeção de metais, foi incapaz de modificar qualquer dos parâmetros observados. De fato, tanto o volume urinário quanto a excreção de sódio e de potássio são similares nos grupos que receberam injeção central de solução salina ou losartan.

TABELA 7 - Efeito da injeção de Losartan (10,8 nmol/rato) injetado no 3º Ventrículo sobre a excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Dados são expressos em média \pm EPM.

Tempo (min)		Controle NaCl 0,9% (n=9)	Losartan 10,8 nmol (n=9)
0	Vol	41.30 \pm 4.75	36.89 \pm 4.92
	Na	81.81 \pm 14.41	81.22 \pm 12.36
	K	118.36 \pm 13.35	138.32 \pm 23.12
20	Vol	58.32 \pm 8.63	64.52 \pm 10.22
	Na	110.59 \pm 17.01	103.46 \pm 16.37
	K	120.82 \pm 14.95	148.35 \pm 20.18
40	Vol	60.77 \pm 7.18	73.21 \pm 12.72
	Na	104.12 \pm 15.70	98.78 \pm 13.53
	K	108.75 \pm 17.38	151.24 \pm 16.34
60	Vol	62.94 \pm 4.14	62.46 \pm 11.98
	Na	89.68 \pm 8.42	118.42 \pm 14.24
	K	99.70 \pm 15.13	141.54 \pm 33.12
80	Vol	60.65 \pm 3.30	40.87 \pm 8.30
	Na	112.41 \pm 10.85	115.01 \pm 28.65
	K	113.48 \pm 17.13	109.68 \pm 14.56
100	Vol	58.76 \pm 7.07	35.18 \pm 12.08
	Na	92.38 \pm 10.85	92.46 \pm 24.12
	K	106.14 \pm 17.34	137.46 \pm 36.48
120	Vol	52.10 \pm 10.45	29.68 \pm 10.61
	Na	83.59 \pm 19.74	110.09 \pm 32.58
	K	93.88 \pm 22.30	115.67 \pm 38.15

Vol = volume urinário em $\mu\text{l}/\text{min}/100$ g peso corporal

Na = carga excretada de sódio urinário em $\text{nEq}/\text{min}/100$ g de peso corporal

K = carga excretada de potássio urinário em $\text{nEq}/\text{min}/100$ g de peso corporal

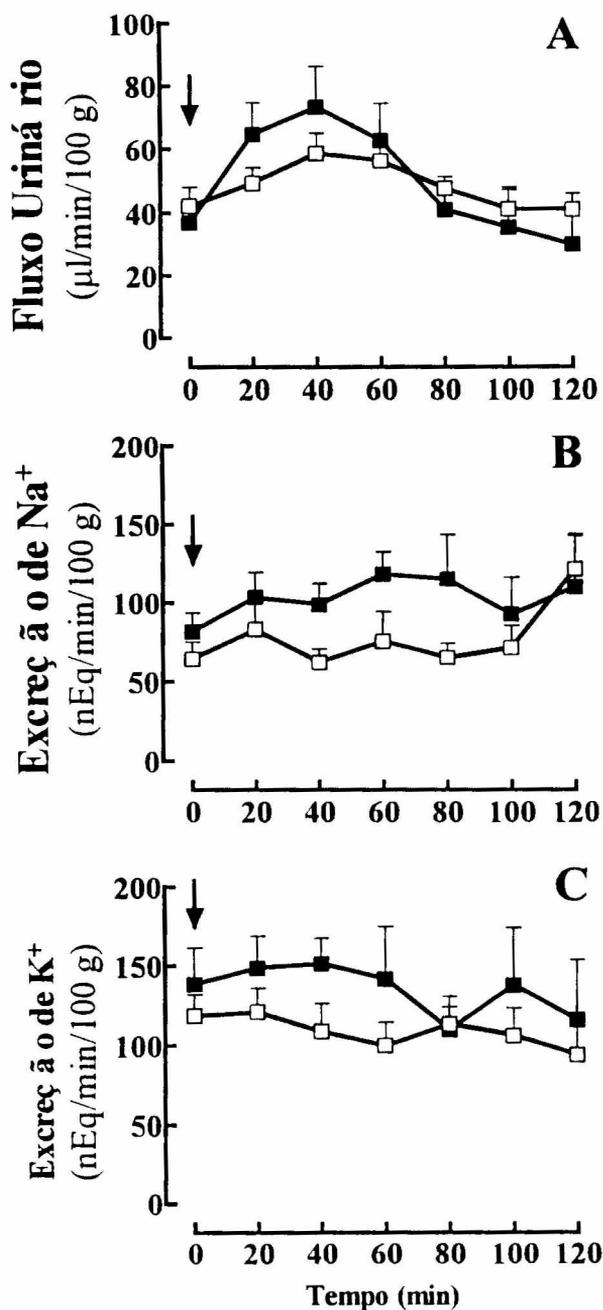


Figura 7 - Efeito no fluxo urinário (painel A), excreção renal de sódio (painel B) e excreção renal de potássio (painel C) após injeções no 3^o ventrículo de Losartan [10,8 nmol/rato (\square)] ou NaCl (\blacksquare). O tempo zero corresponde ao volume urinário, excreção de sódio e potássio medidos imediatamente antes da injeção de Losartan. As setas indicam o momento onde o Losartan ou NaCl foram injetados.

A injeção central de gadolínio, na mesma dose empregada anteriormente (0,3 nmol/rato), quando serviu de pré-tratamento à injeção de metais, foi incapaz de modificar quer o volume urinário quer a excreção renal de sódio ou de potássio, como pode-se observar na Tabela 8 e na Figura 8.

TABELA 8 - Efeito da injeção de Gadolínio (0,3 nmol/rato) injetado no 3° Ventrículo sobre a excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Dados são expressos em média \pm EPM.

Tempo (min)		Controle NaCl 0,9% (n=9)	Gadolínio 0,3 nmol/rato (n=9)
0	Vol	41.30 \pm 4.75	29.92 \pm 4.93
	Na	81.81 \pm 14.41	56.82 \pm 12.92
	K	118.36 \pm 13.35	116.91 \pm 26.52
20	Vol	58.32 \pm 8.63	41.72 \pm 4.75
	Na	110.59 \pm 17.01	76.25 \pm 21.09
	K	120.82 \pm 14.95	123.84 \pm 36.53
40	Vol	60.77 \pm 7.18	61.63 \pm 6.34
	Na	104.12 \pm 5.70	91.13 \pm 42.57
	K	108.75 \pm 17.38	98.29 \pm 13.95
60	Vol	62.94 \pm 4.14	61.72 \pm 5.97
	Na	89.68 \pm 8.42	112.42 \pm 37.81
	K	99.70 \pm 5.13	93.01 \pm 13.12
80	Vol	60.65 \pm 3.30	55.10 \pm 6.52
	Na	112.41 \pm 0.85	150.02 \pm 44.63
	K	113.48 \pm 7.13	128.44 \pm 49.06
100	Vol	58.76 \pm 7.07	64.32 \pm 8.48
	Na	92.38 \pm 10.85	144.22 \pm 35.99
	K	106.14 \pm 17.34	145.55 \pm 21.88
120	Vol	52.10 \pm 10.45	38.47 \pm 4.51
	Na	83.59 \pm 19.74	100.24 \pm 42.62
	K	93.88 \pm 22.30	117.89 \pm 20.43

Vol = volume urinário em $\mu\text{l}/\text{min}/100$ g peso corporal

Na = carga excretada de sódio urinário em $\text{nEq}/\text{min}/100$ g de peso corporal

K = carga excretada de potássio urinário em $\text{nEq}/\text{min}/100$ g de peso corporal

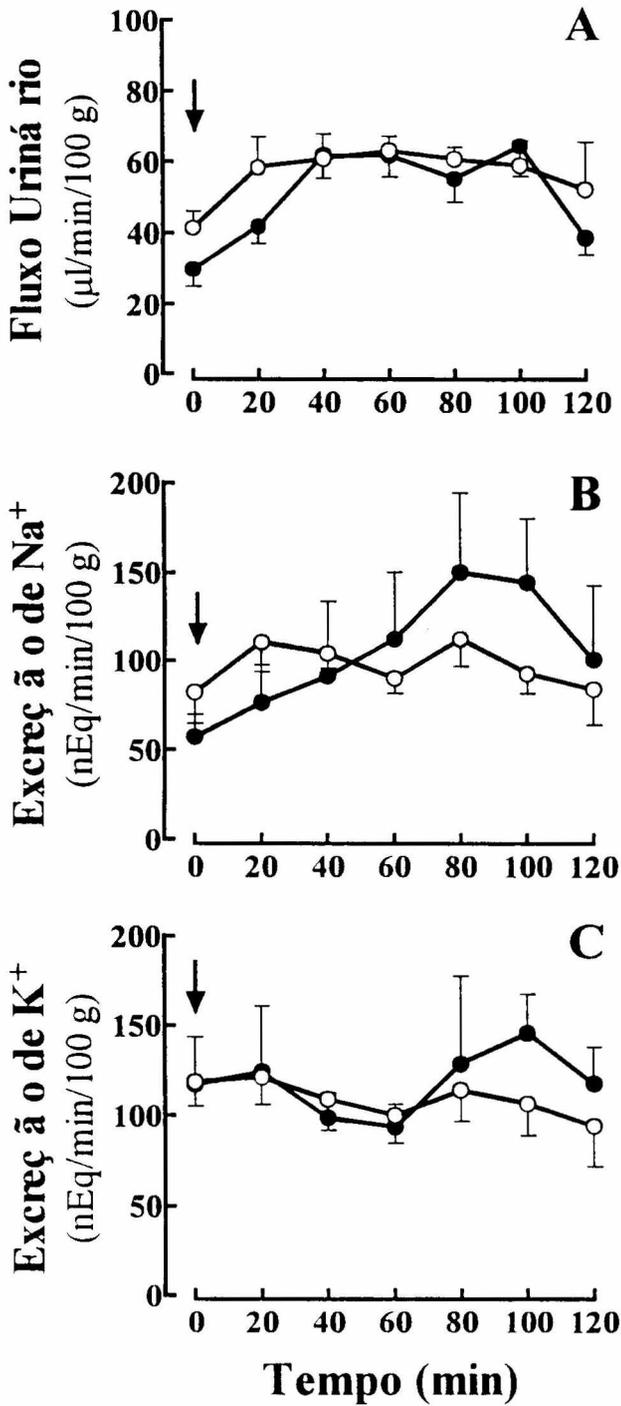


Figura 8 - Efeito no fluxo urinário (painel A), excreção renal de sódio (painel B) e excreção renal de potássio (painel C) após injeções no 3º ventrículo de Gadolínio 0,3 nmol/rato (○) ou NaCl (●). O tempo zero corresponde ao volume urinário, excreção de sódio e potássio medidos imediatamente antes da injeção de Gadolínio. As setas indicam o momento no qual o Gadolínio ou NaCl foram injetados.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho, demonstram, claramente, que injeções agudas de pequenas quantidades de CdCl_2 e PbAc , no 3º V, induzem um rápido e significativo aumento na excreção renal de sódio e potássio, sem afetar o fluxo urinário. A resposta natriurética observada após as injeções centrais de ambos os metais é revertida tanto pelo pré-tratamento com losartan, um antagonista específico dos receptores AT_1 , como pelo pré-tratamento com gadolínio, um bloqueador de canais de cálcio voltagem- dependentes. Isto indica que a natriurese induzida por CdCl_2 e PbAc depende da integridade funcional do sistema angiotensinérgico central, bem como de mecanismos intracelulares dependentes de cálcio. Quanto a kaliurese, foi observado que o efeito do chumbo em aumentar a excreção de potássio era diminuída com a pré-injeção de gadolínio e losartan. No grupo tratado com cádmio, a resposta kaliurética induzida por este metal foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento com gadolínio, mas não com o pré-tratamento com o losartan. Isto mostra que os efeitos kaliuréticos do chumbo e do cádmio compartilham os mesmos mecanismos centrais dependentes de cálcio, porém a resposta kaliurética induzida pelo cádmio não parece depender do componente angiotensinérgico central.

A neurotoxicidade por chumbo e cádmio é um problema que vem sendo bastante estudado. O chumbo se acumula, lentamente, no cérebro de ratos adultos (53) e se concentra nas células endoteliais podendo danificar a barreira hematoencefálica que normalmente restringe a entrada deste íon no sistema nervoso central. Da mesma forma, o cádmio alcança o cérebro por várias rotas, sendo internalizado nos neurônios como um complexo metaloproteico

(50). Como consequência, esses dois metais podem causar sequelas neurológicas que podem ser atribuídas a uma série de danos celulares ou apenas a alterações da neurotransmissão central.

Injeções agudas de metais pesados, no SNC, representam uma interessante abordagem para avaliar a sua rápida ação na neurotransmissão. Além disso, esta estratégia pode mimetizar a chegada das primeiras cargas tóxicas de metais ao cérebro. É interessante salientar que as doses de ambos os metais usados nesse trabalho, são muito pequenas e mesmo menores do que a concentração tecidual observada em cérebros de animais intoxicados por esses metais. Foi demonstrado que a injeção de cádmio, diretamente no 3^oV, induz uma resposta hipertensiva aguda (45) e nós, recentemente, mostramos que tanto a injeção de cádmio quanto a injeção de chumbo, no 3^o V, induzem um poderoso efeito antidipsogênico em três modelos experimentais: desidratação, estimulação colinérgica e angiotensinérgica centrais.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que, quando injetados centralmente, tanto o cádmio quanto o chumbo exercem seu efeito natriurético por um mecanismo dependente da ativação dos receptores AT1. Isto porque seus efeitos são bloqueados pelo pré-tratamento com o losartan, um bloqueador seletivo destes receptores. Por outro lado, a ausência de efeito do losartan quando administrado isoladamente revela dois fatos: 1) no modelo aqui empregado parece inexistir um tônus basal angiotensinérgico regulando a natriurese e 2) a injeção dos metais é o fator que desencadeia alguma liberação central de ANGII, desde que o efeito natriurético evidenciado após a administração dos metais é eliminado se os receptores AT1 são bloqueados pelo losartan.

Está bem estabelecido que ANGII administrada, centralmente, induz resposta natriurética que se opõe ao efeito de retenção de sódio evocado pelo sistema angiotensinérgico

periférico (14,81). O(s) mecanismo(s) responsáveis pela natriurese induzida pela ANGII cerebral são desconhecidos, porém parecem não estar relacionados às mudanças na pressão sanguínea, fluxo sanguíneo renal, taxa de filtração glomerular e níveis plasmáticos de aldosterona. Os dados apresentados aqui sugerem que, nas condições usadas em nosso protocolo experimental, as injeções centrais de $CdCl_2$ e $PbAc$ induzem natriurese por estimulação da ANGII cerebral.

O chumbo e o cádmio foram utilizados, no presente estudo, em doses equimolares. Quando são comparadas ente si as maiores doses de chumbo e cádmio empregadas (3,0 nmol/rato) verifica-se a maior potência natriurética do chumbo. Fica também claro, ao se comparar doses idênticas de chumbo e cádmio, que a natriurese induzida pelo chumbo, é mais prolongada que a aquela induzida pelo cádmio. Isto pode sugerir que, nas condições experimentais usadas aqui, o cádmio evoca um aumento menor e mais transitório na liberação de ANGII central.

A resposta natriurética induzida por ANGII é vista mesmo em baixas doses, abaixo do limiar que induz a resposta pressora, o comportamento de ingestão de água e a liberação de vasopressina (67). É possível que a injeção central dos metais, nas doses aqui empregadas, promovam um aumento mínimo da liberação central de ANGII que é suficiente para gerar efeitos natriuréticos mas incapaz de modificar o fluxo urinário.

Outros hormônios que podem estar envolvidos na respostas renais dos metais pesados são o peptídeo natriurético atrial (ANP) e a vasopressina (AVP). Ambos os hormônios apresentam ação natriurética mas agem antagonicamente com relação ao volume urinário (34,57). Assim, é possível que a resposta renal à injeção central dos metais seja mediada também pela liberação do ANP e AVP o que poderia explicar a resposta natriurética. Por outro

lado, se os metais pesados induzem a liberação destes hormônios, com efeito antagônico entre si sobre o fluxo urinário, não se observaria nenhuma alteração neste parâmetro como de fato se constata aqui.

A ação dos metais pesados a nível molecular, ainda não é totalmente entendida. Alguns estudos têm mostrado que a intoxicação por metais pesados como chumbo, zinco, alumínio e cádmio podem interferir com as funções celulares normais do cálcio, resultando em consequências patológicas (78). Além disso, evidências de que metais pesados como chumbo e cádmio possuem a capacidade de mimetizar o íon cálcio no SNC, podem sugerir que o efeito natriurético e kaliurético induzido por injeções 3^oV de cádmio e chumbo são devidos às alterações causadas por esses metais nos processos celulares dependentes de cálcio. Essa hipótese torna-se válida a partir do momento em que vários dados da literatura têm mostrado que tanto o cádmio, como o chumbo, podem se ligar indiscriminadamente à calmodulina, levando a uma prolongada ativação desta, podendo acarretar sérios distúrbios da neurotransmissão central. Estudos usando um antagonista específico da calmodulina, o W-7 mostram que este é capaz de inibir a ativação da calmodulina induzida tanto por cádmio quanto por cálcio (1).

Existem quatro tipos de canais de cálcio voltagem-dependentes: os canais L,T,N e P que são largamente distribuídos no SNC (16). O cálcio que entra nas células através desses canais participa de vários processos biológicos, como por exemplo a neurotransmissão central.

Em protocolo experimental bastante similar ao usado nesse trabalho, foi verificado que a resposta pressora induzida pela administração ICV de cádmio era prevenida pela administração anterior de verapamil. Esse achado de que um antagonista dos canais de cálcio voltagem-dependentes previne a resposta pressora do cádmio, sugere que o metal pode

interferir com o influxo transmembranal do cálcio no cérebro e aumentar a concentração intraneural deste íon, podendo interferir na liberação de importantes neurotransmissores com papel no controle central da função cardiovascular (45). A relação dos metais pesados com os canais de cálcio vem sendo bastante registrada, mostrando a interação desses com o metabolismo intracelular do cálcio e com o influxo transmembranal desse íon também a nível de sistema nervoso central (36,65).

Para observar o envolvimento dos canais de cálcio nas repostas induzidas pela administração central de cádmio e chumbo, na excreção de sódio e potássio, foi utilizado um potente bloqueador dos canais de cálcio, o gadolínio. Este agente foi precipuamente escolhido porque, além de ser um bloqueador eficaz dos canais de cálcio voltagem-dependentes, é facilmente diluído em solução salina. O verapamil, assim como outros bloqueadores de canais de cálcio, não foi utilizado no presente trabalho devido ao fato de que a sua diluição depende de substâncias que poderiam alterar a osmolaridade do tecido cerebral, podendo assim interferir com os comandos centrais sobre a função renal.

O gadolínio, um lantanídeo que se comporta como um íon permeante através dos canais de cálcio e que, por isso mesmo, bloqueia competitivamente o influxo celular de cálcio, aboliu completamente a resposta natriurética e kaliurética induzida por injeções icv de chumbo e cádmio. O efeito destes metais pode, portanto, ser decorrente de dois mecanismos diferentes: um mecanismo seria a sua ligação aos canais de cálcio impedindo a entrada deste para os terminais nervosos e, conseqüentemente, alterando a liberação de neurotransmissores centrais envolvidos no controle da excreção renal de sódio e potássio; outro mecanismo seria a entrada dos metais nos terminais nervosos, possivelmente através dos próprios canais de cálcio (11), com estimulação da secreção basal e/ou a liberação espontânea de neurotransmissores, por

interagir diretamente com os processos de liberação dependentes de cálcio ou interferindo com a homeostase do cálcio aumentando a concentração de cálcio intracelular. De fato, tem-se demonstrado que a presença intracelular de metais pesados pode aumentar a concentração intracelular de cálcio por reduzir seu efluxo conseqüente a inibição da bomba Ca^{2+} -ATPase (44,83).

No presente trabalho, a inibição isolada dos canais de cálcio voltagem-dependentes pelo gadolínio não modificou qualquer dos parâmetros observados. Isto nos permite sugerir que o segundo mecanismo, ou seja, a entrada de metais pesados para a célula via canais de cálcio, seja o mecanismo prevalente para explicar os efeitos aqui demonstrados.

Em estudos realizados para investigar o efeito dos metais pesados nos processos cálcio-dependentes da neurotransmissão central, foi observado que a administração ventricular de Cd^{2+} foi capaz de aumentar os níveis de dopamina no neocórtex e núcleo acumbente. Esse efeito foi abolido pela administração W-7, um antagonista da CaM. Isto reforça a idéia de que o organismo não é capaz de distinguir entre o Cd^{2+} e Ca^{2+} permitindo que o Cd^{2+} se ligue aos sítios de Ca^{2+} da CaM, interferindo assim em importantes processos biológicos, como por exemplo a síntese de catecolaminas (76). Como o cádmio, o chumbo também afeta muitos sistemas biológicos, mimetizando ou competindo com íons cálcio na junção neuromuscular, interferindo com proteínas quinases cálcio-dependentes e inibindo receptores NMDA (80), além de estimular a liberação de [^3H] noradrenalina de células cromafins bovinas e [^3H]acetilcolina de sinaptossomos de cérebro de ratos (68).

A capacidade de alguns metais, como o cádmio, de interferir nas funções celulares cálcio-dependentes, parece ser dependente da ação seletiva destes sobre certos tipos de canais de cálcio. No entanto, algumas evidências limitadas sugerem que o chumbo inibe todos os

canais de cálcio, com pequenas diferenças na potência. O chumbo é altamente permeável, através de alguns tipos de canais de cálcio voltagem-dependentes. A entrada de chumbo e cádmio no citoplasma neuronal, através dos canais de cálcio, seguidos por um distúrbio das funções intracelulares, pode ser a explicação para a neurotoxicidade induzida por esses metais (6).

Em resposta à intoxicação por metais, o organismo aumenta a síntese de algumas proteínas como metalotioneínas, proteínas do estresse e p53, além de aumentar também a síntese de glutathione. Isso serve como uma proteção do organismo contra os danos que podem ser causados pelos metais, já que esses componentes protegem as células dos efeitos tóxicos dos metais pesados e de outros agentes tóxicos como por exemplo, o oxigênio reativo (11). No entanto, a síntese dessas proteínas só é aumentada em protocolos experimentais onde há intoxicação crônica pelos metais (51). Como os efeitos observados na excreção renal de água, sódio e potássio nesse protocolo experimental são respostas agudas à administração ICV de cádmio e chumbo, pode-se sugerir que essas respostas ocorrem livres de qualquer tipo de mecanismo protetor do organismo.

Como já foi dito anteriormente, a exposição ambiental e ocupacional a metais pesados como chumbo e cádmio, leva a sérios distúrbios da saúde humana. As crianças são as principais vítimas dos efeitos destes metais. Vários estudos têm demonstrado que crianças expostas a baixos níveis de chumbo e cádmio apresentam sérios danos no desenvolvimento comportamental e intelectual (86). Devido a isso, vários órgãos da saúde têm sugerido algumas medidas para diminuir a intoxicação por metais pesados. Nos EUA, em 1978, foi proibido o uso de chumbo em tintas e em 1991 decretou-se a diminuição nos níveis de chumbo na gasolina (31). Essas medidas diminuíram consideravelmente a poluição por esse metal e

consequentemente os seus efeitos tóxicos para a população. No Brasil, o uso do chumbo na gasolina foi suspenso desde 1983, de acordo com relatório apresentado pela Petrobrás (55). No entanto, a gasolina com chumbo continua sendo largamente utilizada em vários países da Europa assim como em diversos países em desenvolvimento (7).

A possível interação dos metais utilizados (Cd^{2+} e Pb^{2+}) com os processos celulares dependentes de cálcio na neurotransmissão central, sugere que o efeito dos metais pesados na excreção de sódio e potássio seja resultado de uma complexa mudança no sistema de neurotransmissão central e que, além das vias angiotensinérgicas, outras vias transmissoras centrais possam estar envolvidas.

No presente estudo, os animais receberam uma alta sobrecarga de água para promover a diurese necessária para estudar a excreção renal de eletrólitos. Este é um protocolo clássico usado por vários outros investigadores. Nesta situação, os animais estão hiperhidratados, uma condição caracterizada por elevação dos níveis do peptídeo natriurético atrial e plasmático (3). Desde que, tanto os animais controle como os experimentais foram hiperhidratados, não é possível excluir a hipótese de que os metais poderiam estar potenciando a liberação de ANP, o que explica o fato dos animais tratados com metais apresentarem uma natriurese mais pronunciada. A inexistência de um antagonista seletivo do ANP cria problemas metodológicos no estudo desta possibilidade no modelo experimental por nós utilizado.

O presente trabalho traz novas informações acerca da neurotoxicidade por chumbo e cádmio. Tanto o chumbo como o cádmio podem induzir nefropatia (31) que é acompanhada por importantes distúrbios eletrolíticos. A estimulação central da excreção renal de sódio e potássio, por estes metais, poderia contribuir para aumentar a desordem eletrolítica presente em quadros de nefropatia por metais pesados. O efeito antidipsogênico do cádmio e chumbo,

previamente mostrado por nosso grupo (18,28), pode ser uma influência adicional complicando a homeostase hidroeletrolítica em pacientes intoxicados por metais pesados. Além disso, a metodologia aqui empregada é de baixo custo, e permite o estudo do efeito agudo dos metais pesados, no SNC, de animais não-anestesiados. Desta forma, é possível relacionar a ação neurotóxica dos metais pesados aos distúrbios comportamentais e a disfunção dos diferentes órgãos regulados pelo SNC. Comparando-se com os estudos crônicos, o estudo agudo da ação dos metais pesados tem a vantagem de permitir a observação de modificações diretas da neurotransmissão central, enquanto que, em estudos crônicos, estas alterações podem estar relacionadas ou ser conseqüente a alterações morfológicas e mudanças plásticas.

6 CONCLUSÃO

Observou-se que a injeção aguda de cádmio e chumbo, no 3º V, induz um significativo aumento na excreção renal de sódio, sem nenhuma modificação no fluxo urinário. Verificou-se também que a resposta natriurética que ocorre após a administração de cádmio e chumbo é dependente da integridade funcional das vias angiotensinéricas centrais. Esta interação parece ser mediada pelos receptores AT1, já que o losartan, um antagonista específico desses receptores, quando injetado centralmente é capaz de reverter a natriurese induzida por cádmio e chumbo. Além disto, o efeito kaliurético induzido pelo Pb^{2+} parece também depender da atividade angiotensinérica central, desde que é revertido pelo pré-tratamento com o losartan. Ao contrário, o efeito kaliurético do Cd^{2+} não pode ser explicado pelo aumento da atividade da ANGII central, desde que o losartan foi incapaz de revertê-lo.

Ademais, observou-se que o gadolínio, um potente bloqueador dos canais de cálcio voltagem-dependentes, também inibe completamente o efeito natriurético e kaliurético induzido pelos metais. Este resultado sugere uma possível interação dos metais com os processos celulares dependentes de cálcio.

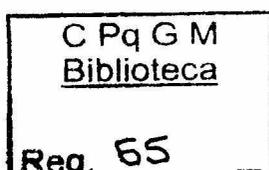
A intensidade e duração da resposta natriurética observada após cada metal, parece indicar que o cádmio evoca um aumento na ANGII cerebral que é menor e mais transitório do que aquele visto após administração do chumbo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AKIYAMA, K.; SUTOO, D.; REID, D.G. Al-NMR comparison of calmodulin activation by calcium and by cadmium. **Jpn. J. Pharmacol.**, **53**:393-401, 1990.
- 2- AL-SALEH, I.A. The biochemical and clinical consequences of lead poisoning. **Med. Res. Rev.**, **14**:415-86, 1994.
- 3- ANAND-SRIVASTAVA, M.B. & TRACHTE, G.J. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanism. **Pharmacol. Rev.**, **45**:455-97, 1993.
- 4- ARVIDSON, B. A review of axonal transport of metals. **Toxicology**, **88**:1-4, 1994.
- 5- AUDESIRK, G. Electrophysiology of lead intoxication: effects on voltage-sensitive ion channels. **Neurotoxicology**, **14**:137-47, 1993.
- 6- AUDESIRK, G. & AUDESIRK, T. The effects of inorganic lead on voltage-sensitive calcium channels differ among cell types and among channel subtypes. **Neurotoxicology**, **14**: 259-66, 1993.
- 7- AUDESIRK, T.; SHUGARTS, D.; WARDLE, K. The effects of triethyl lead on the development of hippocampal neurons in culture. **Cell Biol. Toxicol.**, **11**:1-10, 1995.
- 8- AZIZ, L.A.; FORSLING, M.L.; WOOLF, C.J. The effect of intracerebroventricular injections of morphine on vasopressin release in the rat. **J. Physiol.**, **311**:401-9, 1981.
- 9- BELLINGER, D.C. Epidemiologic approaches to characterizing the developmental neurotoxicity of lead. **In**: YASUI, M.; STRONG, M.J.; OTA, K.; VERITY, M.A. (Ed.). **Mineral and metal neurotoxicology**. New York: CRC Press, 1997. p. 275-83.

- 10- BELLINGER, D.C.; STILES, K.M.; NEEDLEMAN, H.L. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study [see comments]. **Pediatrics**, **90**:855-61, 1992.
- 11- BEYERSMANN, D. & HECHTENBERG, S. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **144**:247-61, 1997.
- 12- BIELARCZYK, H.; TOMSIG, J.L.; SUSZKIW, J.B. Perinatal low-level lead exposure and the septo-hippocampal cholinergic system: selective reduction of muscarinic receptors and cholineacetyltransferase in the rat septum. **Brain Res.**, **643**:211-7, 1994.
- 13- BRADBURY, M.W.B. & DEANE, R. Permeability of the blood-brain barrier to lead. **Neurotoxicology**, **14**:131-6, 1993.
- 4- BROOKS, V.L. & MALVIN, R.L. Intracerebroventricular infusions of angiotensin II increases sodium excretion. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **169**:532-7, 1982.
- 15- BROWNFIELD, M.S.; GREATHOUSE, J.; LORENS, S.A.; ARMSTRONG, J.; URBAN, J.H.; KAR, L.D van de. Neuropharmacological characterization of serotonergic stimulation of vasopressin secretion in conscious rats. **Neuroendocrinology**, **47**:227-83, 1988.
- 16- BUSSELBERG, D.; PLATT, B.; MICHAEL, D.; CARPENTER, D.O.; HAAS, H.L. Mammalian voltage-activated calcium channel currents are blocked by Pb^{++} , Zn^{++} e Al^{++} . **J. Neurophysiol.**, **71**:1491-7, 1994.
- 17- CARLISLE, J.C. & WADE, M.J. Predicting blood lead concentrations from environmental concentrations. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, **16**:280-9, 1992.
- 18- CASTRO E SILVA, E. de; FERREIRA, H.; CUNHA, M.; BULCÃO, C.; SARMENTO, C.; OLIVEIRA, I. de; FREGONEZE, J.B. Effect of central acute administration of cadmium on drinking behavior. **Pharmacol. Biochem. Be.**, **53**:687-93, 1996.

- 19- CHEUNG, W.Y. Calmodulin: its potencial role in cell proliferation and heavy metal toxicity. **Fed. Proc.**, **43**:2995-9, 1984.
- 20- CHOUDHURI, S.; LIU, W.L.; BERMAN, N.E.J.; KLAASSEN, C.D. Cadmium accumulation and metallothionein expression in brain of mice at different stages of development. **Toxicol. Lett.**, **84**:127-33, 1996.
- 21- COLOMBARI, D.S.A.; HAIBARA, A.S.; CAMARGO, L.A.A.; SAAD, W.A.; RENZI, A.; DE LUCA JR, L.A.; MENANI, J.V. Role of medial septal area on the cardiovascular, fluid and eletrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats. **Brain Res. Bull.**, **33**:249-54, 1994.
- 22- CORY-SLECHTA, D.A.; WEISS, B.; COX, C. Tissue distribution of Pb in adult vs. old rats: a pilot study. **Toxicology**, **59**:139-50, 1989.
- 23- DORN, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MC CANN, S.M. Natriuresis in the rat following intraventricular carbachol. **Am. J. Physiol.**, **219**:1292-8,1970.
- 24- EVANS, J. & HASTINGS, L. Accumulation of Cd(II) in the CNS depending on the route of administration: intraperitoneal, intratracheal, or intranasal. **Fundam. Appl. Toxicol.**, **19**:275-8, 1992.
- 25- FLIK, G.; WINKEL, J.G.J. van de; PART, P.; BONGA, S.E.W.; LOCK, R.A.C. Calmodulin-mediated cadmium inhibition of phosphodiesterase activity, in vitro. **Arch. Toxicol.**, **59**:353-9, 1987.
- 26- FRANCI, C.R.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; SILVA-NETTO, C.R.; CAMARGO, L.A.; SAAD, W.A. Identification of pathways involved in the natriuretic, kaliuretic and diuretic responses induced by cholinergic stimulation of the medial septal area (MSA). **Physiol. Behav.**, **30**:65-71, 1983.



- 27- FREGONEZE, J.B. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Role of opioid peptides and subfornical organ in the renal function of intact and hypophysectomized rats. **Physiol. Behav.**, **51**:287-92, 1991.
- 28- FREGONEZE, J.B.; CUNHA, M.; BULCÃO, C.; FERREIRA, H.; CASTRO E SILVA, E. de. Acute effect of intracerebroventricular administration of lead on the drinking behavior of rats induced by dehydration or central cholinergic and angiotensinergic stimulation. **Physiol. Behav.**, **56**:129-33,1994.
- 29- GOLDSTEIN, G.W. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. **Neurotoxicology**, **14**:97-101, 1993.
- 30- GONTIJO, J.A.R.; SILVA-NETTO, C.R.; FURTADO, M.R.F. Effects of injection of selective adrenergic receptors antagonists into the lateral hypothalamic area on renal function. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **23**:1205-8, 1990.
- 31- GOYER, R.A. Mechanism of lead and cadmium nephrotoxicity. **Toxicol. Lett.**, **46**:153-62, 1989.
- 32- GOYER, R.A. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. **Environ. Health Persp.**, **104**:1050-3, 1996.
- 33- GROSSMAN, A.; BESSER, G.M.; MILLES, J.J.; BAYLIS, P.H. Inhibition of vasopressin release in man by an opiate peptide. **Lancet**, **2**: 1108-10, 1980.
- 34- GUTKOWSKA, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MC CANN, S.M. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. **Physiol. Rev.**, **77**:465-515, 1997.
- 35- HAAF, J.A. ten; WINERSMA, T.B. van; GREIDANUS, T.; BUON, W.; MAIGRET, C.; DEWIED, D. Effect of opioid peptide beta-endorphin on the in vivo release of vasopressin in rats under various conditions. **Neuroendocrinology**, **44**:102-7, 1986.

- 36- HABERMANN, E.; CROWELL, K.; JANICKI, P. Lead and others metals can substitute for calcium in calmodulin. **Arch. Toxicol.**, **54**:61-70, 1983.
- 37- HOFFMAN, W.E.; PHYLLIPS, M.I.; SCHIMID, P.G.; FALCON, J.; WEET, J.F. Antidiuretic hormone release and pressor reponse to central angiotensin II and cholinergic stimulation. **Neuropharmacology**, **16**:463-72,1977.
- 38- HUIDOBRO-TORO, J.P. Antidiuretic effect of beta-endorphin and morphine in Brattleboro rats: development of tolerance and physical dependence after chronic morphine treatment. **Br. J. Pharmacol.**, **71**:51-6, 1980.
- 39- ISHIKAWA, S.E. & SCHRIER, R.W. Evidence for a role of opioid peptides in the release of arginine vasopressin in the conscious rat. **J. Clin. Invest.**, **69**:666-72, 1982.
- 40- JONES, H.S. & FOWLER, B.A. Biological interactions of cadmium with calcium. **Ann. New York Acad. Sci.**, **355**:309-18, 1980.
- 41- KAR, L.D. van de.; WILKINSON, C.W.; GANONG, W.F. Pharmacological evidence for role of brain serotonin in the maintenance of plasma renin activity in unanesthetized rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **219**:85-90, 1981.
- 42- KHALIL-MANESH, F.; GONICK, H.C.; COHEN, A.H.; ALINOVI, R.; BERGAMASCHI, E.; MUTTI, A.; ROSEN, V.J. Experimental model of lead nephropathy. I. Continuous high-dose lead administration. **Kidney Int.**, **41**:1192-203,1992.
- 43- KITCHEN, I.; MC DOWELL, J.; WIDER, C.; WILSON, J.M. Low-level lead exposure alters morphine antinociception in neonatal rats. **Toxicol. Lett.**, **22**:119-23, 1984.
- 44- LONG, G.J. Cadmium perturbs calcium homeostasis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells; a possible role for protein kinase C. **Toxicol. Lett.**, **91**:91-7, 1997.

- 45- MADEDDU, P.; DEMONTTIS, M.P.; VARONI, M.V.; FATTACCIO, M.C.; PALMIERI, A.; ANANIA, V. Verapamil prevents the acute hypertensive response to intracerebroventricular cadmium in conscious normotensive rats. **Am. J. Hypertens.**, **6**:193-7, 1993.
- 46- MC DOWELL, J. & KITCHEN, I. Perinatal lead exposure alters the development of δ - but not μ -opioid receptors in rat brain. **Br. J. Pharmacol.**, **94**: 933-7, 1988.
- 47- MONTES, R. & JOHNSON, A.K. Efferent mechanisms mediating renal sodium and water excretion induced by centrally administered serotonin. **Am. J. Physiol.**, **259**:R1267-73, 1990.
- 48 MORRIS, M.; MC CANN, S.M.; ORIAS, R. Evidence for hormonal participation on the natriuretic and kaliuretic response to intraventricular hypertonic saline and norepinephrine. **Proc. Soc. Exp. Biol.Med.**, **152**:95-8, 1976.
- 49- MORRIS, M.; MC CANN, S.M.; ORIAS, R. Role of transmitters in mediating hypothalamic control of electrolytes excretion. **Can. J. Physiol Pharm.**, **55**:1143-54, 1977.
- 50- MURPHY, V.A. Cadmium: Acute and chronic neurological disorders. **In**: YASUI, M, STRONG, M.J.; OTA, K.; VERITY, M.A. (Ed.). **Mineral and metal neurotoxicology**. New York: CRC Press, 1997. p. 229-40.
- 51- NORDBERG, M. Studies on metallothionein and cadmium. **Environ. Res.**, **15**:381-404, 1978.
- 52- OORTGIESEN, M.; KLEEF, R.G. van; BAJNATH, R.B.; VIJVERBERG, H.P. Nanomolar concentrations of lead selectively block neuronal nicotinic acetylcholine responses in mouse neuroblastoma cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **103**:165-74, 1990.

- 53-P'AN, A.Y.S. & KENNEDY, C. Lead distribution in rats repeatedly treated with low doses of lead acetate. **Environ. Res.**, **48**:238-47, 1989.
- 54-PERFUMI, M.; DE CARO, G.; MASSI, M.; VENTURI, F. Inhibition of ANGII-induced drinking by dermorphin given into the SFO or into the lateral ventricle of intact or SFO lesioned rats. In: DE CARO, G.; EPSTEIN, A.; MASSI M. **The physiology of thirst and sodium appetite**. New York: Plenum Press, 1984. p.257-63.
- 55- PETROBRAS. RLAM. **Plano diretor de resíduos sólidos**, 1996.
- 56-PHILLIPS, M.I. Functions of angiotensin in the central nervous system. **Annu. Rev.**
- 57- PIERCE, E.T.; GREKIN, R.J.; MOUW, D.R. Efferent role of ADH in CNS-induced natriuresis. **Am. J Physiol.**, **246**:F32-8, 1984.
- 58- RAFALOWSKA, U.; STRUZYSKA, L.; DABROWSKA-BOUTA, B.; LENKIEWICZ, A. Is lead toxicosis a reflection of altered energy metabolism in brain synaptosomes? **Acta Neurobiol. Exp.**, **56**:611-7, 1996.
- 59- RASTOGI, R.B.; MERALI, Z.; SINGHAL, R.I. Cadmium alters behaviour and the biosynthetic capacity for catecholamines and serotonin in neonatal rat brain. **J. Neurochem.**, **28**:789-94, 1977.
- 60- REIS, L.C.; RAMALHO, M.J.P.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Effect of central administration of serotonergic agonists on electrolyte excretion control. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **24**: 633-41, 1991.
- 61- REIS, L.C.; RAMALHO, M.J.P.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of the serotonergic system in the regulation of water and electrolytic balance. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **22**:761-3, 1989.

- 62- ROCHA, M.J.A.; FRANCI, C.R.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of cholinergic and adrenergic synapses of the medial septal area (MSA) in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline (NaCl). **Physiol. Behav.**, **34**:23-8,1984.
- 63- ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V.; BRAMMER, M.J. The use of gadolinium to investigate the relationship between Ca^{++} influx and glutamate release in rat cerebrocortical synaptosomes. **Neurosc. Lett.**, **178**:155-8, 1994.
- 64- ROSEN, H.; & POLAKIEWICZ, R.D. Increase in hypothalamic pro-opiomelanocortin gene expression in response to prolonged low level lead exposure. **Brain Res.**, **493**:380-4, 1989.
- 65- ROSSI, F.; CAZZOLA, M.; SANTIS, D. de. Cardiovascular effects of thallium sulfate after intracerebroventricular administration in normotensive rats. **Curr. Ther. Res.**, **42**:778-9, 1987.
- 66-SAAD, W.A.; CAMARGO, L.A.A.; SILVA-NETTO, C.R.; GENTIL, C.G.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; COVIAN, M.R. Natriuresis, kaliuresis and diuresis in rat following microinjections of carbachol into the septal area. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **3**:985-92,1975.
- 67- SAAVEDRA, J. M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocr. Rev.**, **13**:329-80, 1992.
- 68- SHAILESH-KUMAR, M.V. & DESIRAJU, T. Regional alterations of brain biogenic amines and GABA/glutamate levels in rats following chronic lead exposure during neonatal development. **Arch. Toxicol.**, **64**:305-14, 1990.
- 69- SILVA NETTO, C.R.; MELLO-AYRES, M.; MALNIC, G. Hypothalamic stimulation and electrolyte excretion: a micropuncture study. **Am. J. Physiol.**, **239**:F206-14, 1980.
- 70- SIMONS, T.J.B. Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. **Neurotoxicology**, **14**:77-85, 1993.

- 71- SKERFVING, S. & NILSSON, U. Assessment of accumulated body burden of metals. **Toxicol. Lett.**, **64/65**(Spec. N.):17-24, 1992.
- 72- STEARDO, L. & IOVINO, M. Vasopressin release after enhanced serotonergic transmission is not due to activation of the peripheral renin-angiotensin system. **Brain Res.**, **382**:145-8, 1986.
- 73- SUMMY-LONG, J.Y.; KEIL, L.C.; DEEN, K.; SEVERS, W.B. Opiate regulation of angiotensin-induced drinking and vasopressin release. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **217**:630-7, 1981.
- 74- SUMMY-LONG, J.Y.; KEIL, L.C.; SELLS, G.; KIRBY, A.; CHER, O.; SEVERS, W.B. Cerebroventricular sites for enkephalin inhibition of the central actions of angiotensin. **Am. J. Physiol.**, **244**:R522-9, 1983.
- 75- SUTOO, D. Disturbances of brain function by exogenous cadmium. **In**: ISAACSON, R.L. & JENSEN, K.F. (Ed.). **The vulnerable brain and environmental risks: toxins in air and water**. New York: Plenum Press, 1994. v.3, p. 281-300.
- 76- SUTOO, D.; AKIYAMA, K.; IMAMIYA, S. A mechanism of cadmium poisoning: the cross effect of calcium and cadmium in the calmodulin-dependent system. **Arch. Toxicol.**, **64**:161-4, 1990.
- 77- SUTOO, D.; AKIYAMA, K.; IMURA, K. The ability of divalent cations to enhance ethanol-induced sleeping time. **Alcohol**, **3**:69-72, 1986.
- 78- SUZUKI, Y.; CHAO, S.; ZYSK, J.R.; CHEUNG, W.Y. Stimulation of calmodulin by cadmium ion. **Arch. Toxicol.**, **57**:205-11, 1985.
- 79- TANGAPRÉGASSOM, A.M.; TANGAPRÉGASSOM, M.J.; SOULAIRAC, A. Effets des lésions de la région du raphé mésencéphalique sur le comportement de soif et la neurosécrétion hypothalamique antérieure du rat. **Ann. Endocrinol.**, **35**:667-8, 1974.

- 80- UJIHARA, H.; SASA, M.; BAN, T. Selective blockade of p-type calcium channels by lead in cultured hippocampal neurons. **Jpn. J. Pharmacol.**, **67**:267-9, 1995.
- 81- UNGER, T.; HORST, P.J.; BAUER, M.; DEMMERT, G.; RETTIG, R.; ROHMEISS, P. Natriuretic action of central angiotensin II in conscious rats. **Brain Res.**, **486**:33-8, 1989.
- 82- VALLEE, B.L. & FALCHUK, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiol. Rev.**, **73**:79-118, 1993.
- 83- VERBOST, P.M.; FLIK, G.; PANG, P.K.; LOCK, R.A.; WENDELAAR, S.F. Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca^{2+} pump: a molecular interpretation. **J. Biol. Chem.**, **264**:5613-5, 1989.
- 84- WHATLEY, S.A.; POWELL, J.F.; POLITOPOULOU, G.; CAMPBELL, I.C.; BRAMMER, M.J.; PERCY, N.S. Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein. **Neuroreport**, **6**:2333-7, 1995.
- 85- WIDZOWSKI, D.V. & CORY-SLECHTA, D.A. Homogeneity of regional brain lead concentrations. **Neurotoxicology**, **15**:295-307, 1994.
- 86- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Inorganic lead**. Geneva, 1995. International Program for Chemical Safety (Environmental Criteria Document, 165).
- 87- YAMAGUCHI, K.; HAMA, H.; SAKAGUCHI, T.; NEGORO, H.; KOMI, K. Effects of intraventricular injection of $\text{Sar}^1\text{-Ala}^8$ -angiotensin II on plasma vasopressin level increased by angiotensin II and by water deprivation in conscious rats. **Acta Endocrinol.**, **93**:407-12, 1980.
- 88- YU, S.Y.; MIZINGA, K.M.; NONAVINAKERE, V.K.; SOLIMAN, K.F.A. Decreased endurance to cold water swimming and delayed sexual maturity in the rat following neonatal lead exposure. **Toxicol. Lett.**, **85**:135-41, 1996.