EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO INDUZ DISFUNÇÃO ENDOTELIAL EM AORTA E ACELERA O DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO EM SHR JOVENS

RAKEL PASSOS SIMÕES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS VITÓRIA, JUNHO DE 2019

EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO INDUZ DISFUNÇÃO ENDOTELIAL EM AORTA E ACELERA O DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO EM SHR JOVENS

Rakel Passos Simões

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em __ /__ / 2019 por:

Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha – Orientadora, PPGCF-UFES

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo - Coorientador, PPGCF-UFES

Prof. Dr. Leonardo dos Santos

Prof^a. Dr^a. Fabiana Dayse Magalhães Siman Meira

Dr^a. Jonaina Fiorim Pereira de Oliveira

Dr^a. Camila Almenara Cruz Pereira

Coordenadora do PPGCF: Prof^a.Dr^a. Sônia Alves Gouvêa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 2019

Dedico este trabalho às pessoas que mais me incentivaram, Luiz, Ivete, Maylla, Rahone e Abraão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, alegrias, cuidado e amor. Nos momentos de desespero, tristeza, e desânimo sempre estive amparada por Seus cuidados. Obrigada por fazer todas as coisas conforme a Tua vontade! Obrigada por tantas vitórias!

Ao meu pai, Luiz, que orgulho de ser sua filha. Obrigada por sempre me incentivar nessa caminhada, me apoiar, me mostrar o caminho certo a seguir. Mesmo distante fisicamente você se encontra presente a todo momento, obrigada pela paz e segurança que você me passa todas as vezes que te ligo preocupada e ansiosa. Obrigada por tudo. Te amo muito Véin.

A pessoa do coração mais lindo por sempre cuidar de mim, por me apoiar em tudo, por ser calmaria em meio à tempestade. Mãe, obrigada pela leveza que você faz da vida. Como é sensacional ter você comigo. Obrigada pelo amor incondicional. Amo muito você lindona!

A Maylla, minha irmã inteligente, linda e loira, tenho muito orgulho de você. Obrigada por sempre me incentivar, por cuidar de mim como uma filha, por todo carinho e amor. Agradeço pela companhia de sempre, pelos almoços, lanches da tarde, jantares e momentos de lazer. Você é a melhor irmã que Deus poderia me dar. E como Deus foi bom comigo quando colocou na sua vida Rahone, um amor de cunhado, obrigada por tudo Rah. Amo vocês!

Agradeço a Tia Beth, por me adotar como filha nesses dois anos, obrigada pelo cuidado, carinho e amor. Obrigada pelas palavras de incentivo e conselhos. Também não poderia deixar de agradecer pelas comidas gostosas que sempre fazia, o cafezinho da tarde e o bate-papo.

Aos meus familiares, Tias, Tios, Vovó Hilda, Gi, Piu, Belle, Ian, Dada, Mine e Rafa, obrigada pelos momentos em família, amo vocês.

À família Freitas Souza. Ju, Sarinha, Gui e Gigi, por todo apoio, carinho e bons momentos. Amo vocês.

À família Gonzaga Dantas, pelo carinho e momentos maravilhosos. Samuel, Varli, Dona Ana, Nala, Samuel Jr., Bia, Sarinha, Davi, Jonatas, Rita, Lívia, Gabriel, Debora.

Ao Abraão, meu namorado, pelo incentivo, por acreditar em mim mais que eu, pelo carinho, amor, amizade, por alegrar meus dias e por me ajudar com seu talento no resumo gráfico do artigo. Você é especial. À Priscila e Àquila, pela amizade e por me proporcionarem momentos maravilhosos com Henrique. Ele renova as forças, é nossa dose de alegria! É indescritível a paz e alegria que sinto quando estou com esse neném lindo. Tia Kel ama.

Ao Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, a pessoa que mais me cantou na vida, ne Chefito? Foram muitos anos me chamando pra tentar a prova do mestrado. Obrigada pela oportunidade de fazer parte do LEMC, pelo aprendizado diário, orientações, pelos momentos alegres, e principalmente, por acreditar em mim. É admirável conviver com uma que é apaixonada pela pesquisa.

À Alê, por me aceitar como aluna de mestrado. Obrigada pelas colocações e sugestões para que tudo desse certo. Continue transmitindo essa paz a todos seus alunos, isso é muito bom, principalmente nos momentos de desespero. Obrigada por tudo Alê, minha mãe Científica.

À Maylla Ronacher Simões, agora como minha coorientadora, obrigada pelos prazos quase impossíveis de serem cumpridos, pelas exigências, pelos ensinamentos, por ser tão empenhada, prestativa e me ajudar sempre que precisei, obrigada pelas orientações, correções, sugestões, e por sempre cobrar muito de mim, sem você não conseguiria terminar esse mestrado.

Aos professores Ivanita e Léo, pela dedicação ao Laboratório, por demonstrarem amor à ciência, pela contribuição com ideias e observações científicas.

À Paloma pela parceria nos experimentos, por dividir comigo os dias difíceis e assim torná-los mais fáceis. Só nós sabemos o que passamos. Agradeço à Deus por nossa amizade. Obrigada por tudo Palomet.

À Ingridy, pela amizade, pelos ótimos momentos que passamos, por ter me ensinado o protocolo experimental e prisma, pelos dias de estudo na salinha e em casa, pelas conversas, risadas, conselhos e por sempre me ajudar em tudo. Obrigada por tudo.

À Grazi e Felipe, pela amizade, conversas, risadas, por saber que sempre posso contar com vocês.

Ao Thiago Oliveira, pela amizade, conselhos, risadas. Você é, sem dúvida, a pessoa mais prestativa que conheço!

À Tati, por ter me ensinado todos os procedimentos para realização do experimento, sempre com paciência e disponibilidade, obrigada por tudo.

À Priscila Rossi pelos ensinamentos no protocolo da aorta e pela disponibilidade em me ajudar todas as vezes que precisei.

À Sabrina, pelos momentos alegres que passamos e pela amizade.

Ao Bruno (Broc) meu companheiro de maravalha e ração, obrigada pela parceria e risadas durante essas tarefas.

A todos do LEMC pelo conhecimento compartilhado, companhia, por proporcionar dias mais divertidos de trabalho, e por terem me ajudado sempre que precisei: Anna Karolina, Karol Zuqui, Cindy, Renatinha, Camila, Emilly, Elis, Evellyn, Gilson, Gérsica, Felipe Estrela, João, Maritinho, Thiago Lopes, Gustavo, Rogério, Rosi, Samya, Vinicius.

Ao Anderson, por todo apoio nos experimentos, por preparar todas as soluções, diluições dos fármacos necessários nesse trabalho, ajudar nos cálculos, por me ensinar tanto, por me ajudar sempre, por ser esse amigo maravilhoso, e meu psicólogo particular. Obrigada por tudo Mister, você é especial. Sinto sua falta.

Agradeço também a Cintia, pela amizade, e por todas as vezes que me transmitiu segurança e paz quando estava ansiosa antes de alguma apresentação ou com alguma coisa, obrigada pelas palavras doces e por sempre me ajudar com as questões burocráticas. Saudade!

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas pelo conhecimento compartilhado através das disciplinas.

Aos funcionários do Biotério Central da UFES, Rodolpho, Marildo, Jailson e Amaral, pelos animais e por sempre atenderem as demandas de maravalha e ração. Obrigada.

Ao Enildo, por ter me ensinado a usar o pletismógrafo, pelas conversas e por toda ajuda.

Aos alunos dos outros laboratórios da Pós: Edgar, Polli, Glauciene, Mari, Simone, Antônio, Divo, Lais, Nara, Pablo, Ytalo, Eduardo, Fabrício por terem contribuído seja por compartilhar conhecimentos numa disciplina, emprestar/doar fármacos, estudar juntos para a prova, ou pelas palavras de incentivo para a realização desse trabaho.

À CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro.

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 MERCÚRIO	20
1.1.1 ASPECTOS GERAIS, FONTES DE EXPOSIÇÃO E APLICAÇÕES DO MERCÚRIO	20
1.1.2 EFEITOS TÓXICOS DO MERCÚRIO	23
1.1.3 EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE O ORGANISMO	23
1.1.4 EFEITO DO MERCÚRIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	24
1.2. CONTROLE DO TÔNUS VASCULAR	25
1.2.1. ENDOTÉLIO VASCULAR	25
1.2.2. ÓXIDO NÍTRICO	26
1.2.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) E ESTRESSE OXIDATIVO	28
1.2.4. VIA DA CICLOOXIGENASE (COX)	30
1.3 HIPERTENSÃO ARTERIAL	32
1.4 JUSTIFICATIVA	34
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	35
3.2 PRESSÃO ARTERIAL E MASSA CORPORAL	36
3.3 HIPERTROFIA CARDÍACA	37
3.4 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR	37
3.5 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO VASCULAR DE ÂNION SUPERÓXIDO (O₂•−)	41
3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	42
3.7 DROGAS E REAGENTES	44
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4. RESULTADOS	45
4.1 MASSA CORPORAL	45
4.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	45
4.3 HIPERTROFIA CARDÍACA	47
4.4 REATIVIDADE VASCULAR	48
4.4.1 REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA	48
4.4.2 RESPOSTA VASODILATADORA À ACETILCOLINA E AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO) .49
4.4.3 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA VASCULAR FENILEFRINA	À 50
4.4.4 PARTICIPAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NAS RESPOSTAS VASCULAR	ES51

SUMÁRIO

4.4.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE MERCÚRIO NA VIA DA CICLOO	XIGENASE (COX)
	55
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. Isoformas da Óxido Nítrico Sintase. Fonte: Própria......27

Figura 6. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCI e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCI: A) Período de estabilização inicial (45

min permanecendo na tensão de 0,9 a 1,3g para Wistar e 1,4 a 1,7g para SHR); B) Adição de KCI (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCI (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCI (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10⁻⁷ M ou mais até atingir entre 50 e 70% do 2º KCI; J) Adição de acetilcolina (ACh) 10⁻⁵ M; L) Troca de solução Krebs-Henseleit e período de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (modificado de Dias.

Figura 10. Resposta contrátil ao KCI (75mM), em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar e SHR, na ausência (Ct) e presença de HgCl₂. W Ct (n= 32); W HgCl₂

Figura 12. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio na resposta vascular mediada pelo NO em resposta à fenilrefrina. Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 µM) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos da aorta torácica de CJ Wistar (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (D) e SHR Grupos Hg (E) com L-NAME e os respectivos grupos sem intervenção. Diferença na área abaixo das curvas concentração-resposta (dAAC) na presença e ausência de L-NAME para os grupos Wistar (C) e SHR (F). O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. Os resultados (média ± EPM) da resposta da fenilefrina são expressos em percentagem da contração induzida por 75 mMKCI. Two-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 - Wistar Ct vs L-NAME, Wistar Hg vs L-NAME: SHR Ct VS L-NAME SHR Hq VS Lе

Figura 15. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio sobre a liberação de peróxido de hidrogênio (H2O2) na reatividade vascular à fenilefrina. Efeito da catalase (1000 U/ml), varredor enzimático do peróxido de hidrogênio sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (C) e SHR Hg (D) com catalase e os respectivos grupos sem intervenção. Os resultados (média ± EPM) da resposta à fenilefrina são expressos em porcentagem da contração induzida por 75 mM KCl. ANOVA duas por de *P vias seguido pós-teste Bonferroni. >0,05......54

Figura 16. Papel da via da COX na reatividade vascular em aorta após exposição crônica ao mercúrio. Efeito do inibidor não-seletivo de COX, indometacina (10 μ M) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos da aorta torácica de Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (D), SHR Hg (E) grupos com indometacina e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados foi indicado entre parênteses. Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta (dAAC) de anéis de aorta na presença e ausência de Indometacina para os Grupos Wistar (C). Teste *t*-Student. Os resultados (média ± EPM) da resposta à fenilefrina são

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

ACh: Acetilcolina ATP: Trifosfato de adenosina **ATSDR:** Agency for Toxic Substances and Disease Registry CAPES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico **COX:** Ciclooxigenase COX-1: Isoforma da ciclooxigenase tipo 1 COX-2: Isoforma da ciclooxigenase tipo 2 Ct: Controle Cu/Zn SOD; SOD1: Superóxido dismutase cobre/zinco dAAC: Diferença da área abaixo da curva **DHE:** Dihidroetídio EPM: Erro padrão da média EROs: Espécies reativas de oxigênio FE: Fenilefrina g: grama Hg: Mercúrio H₂O: Água H₂O₂: Peróxido de hidrogênio IP: receptor de Prostaciclina KCI: Cloreto de potássio L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster M: Molar mg: miligramas **mL**: mililitro **mM:** milimolar MLV: Músculo liso vascular NADPH - Adenina dinucleotídeo fosfato NPS: Nitroprussiato de sódio nM: Nanomolar NO: Óxido nítrico

NOS: NO sintase

- eNOS: NO sintase endotelial
- ONOO-: Peróxido de nitrito
- O2 --: Ânion superóxido
- OH -: Radical hidroxila
- **PGH2 e PGF2** α : Prostaglandinas H2 e F2 α
- PGI2: Prostaciclina
- **PGE2:** Prostaglandina E2
- **TP:** Receptor de tromboxano A2
- -SH: Grupamento tiol
- SOD: Superóxido dismutase
- °C: Graus célsius
- **µg:** Micrograma
- **µL:** Microlitro
- TXA2: Tromboxano A2
- VE: Ventrículo esquerdo

RESUMO

O mercúrio é um metal pesado amplamente disperso na natureza e, ao entrar em contato com o organismo humano, causa danos aos vasos e ao coração, promovendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estudos anteriores já demonstraram que a exposição crônica ao cloreto mercúrio (HgCl₂) por 30 dias não altera a pressão arterial em ratos normotensos adultos, no entanto, não se sabe quais seriam os efeitos dessa exposição em animais pré-hipertensos. Assim, nosso objetivo foi comparar os efeitos da exposição crônica ao HgCl2 em ratos normotensos e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) jovens. Ratos Wistar e SHR com 4 semanas de idade foram diariamente tratados com HgCl₂ (1^a dose 4,6 µg / kg, doses subsequentes 0,07 µg / kg / dia, i.m. por 30 dias) ou solução salina 0,9%. Em animais normotensos jovens, a exposição ao mercurio não foi capaz de alterar a pressão arterial sistólica (PAS), reatividade vascular à fenilefrina, a produção de ânion superóxido e a via da COX-2. Porém, aboliu modulação da contração de anéis de aorta pelo receptor de prostaciclina (IP). Já em SHR, a exposição ao HgCl₂ acelerou o desenvolvimento de hipertensão e aumentou a reatividade vascular à fenilefrina, ao menos em parte, pelo aumento da participação da via do EP1 e redução da via do IP. Além disso, aumentou o estresse oxidativo, confirmado pela maior produção in situ de ânion superóxido, e reduziu participação de enzimas antioxidantes, corroborado com a diminuição dos níveis de proteína SOD-1 na aorta. O conjunto desses efeitos caracteriza a disfunção endotelial no SHR e esta parece ser a razão pela qual o mercúrio acelera o desenvolvimento da hipertensão nesses animais. Esses achados sugerem que a exposição ao mercúrio altera o curso natural da hipertensão em SHR jovens, sendo um fator de risco cardiovascular para indivíduos pré-hipertensos.

Palavras-chave: exposição por mercúrio; reatividade vascular; aorta; PGE₂; SHR jovem.

ABSTRACT

Mercury is a heavy metal widely dispersed in nature and upon contact with the human body causes damage to the vessels and to the heart, promoting the development of cardiovascular diseases. Chronic exposure to mercury chloride (HgCl₂) for 30 days does not change blood pressure in adult normotensive rats, however, it is unknown what would be the effects of this exposure on prehypertensive animals. Thus, we aimed to compare the effects of chronic exposure to HgCl₂ in normotensive rats and young spontaneously hypertensive rats (SHR). Four-week-old Wistar and SHR were treated daily with HgCl₂ (1st dose 4.6 µg/kg, subsequent dose 0.07 µg/kg/day, im, 30 0.9% days) saline. or In young normotensive animals, mercury exposure did not change systolic blood pressure (SBP), vascular reactivity to phenylephrine, superoxide anion production and the COX-2 pathway. However, it abolished modulation of contraction of a ortic rings by the prostacyclin receptor (IP). In SHR, exposure to HgCl₂ accelerated the development of hypertension and increased vascular reactivity to phenylephrine, at least in part, by increasing the participation of the EP1 pathway and reducing IP pathway. In addition, HgCl₂ increased oxidative stress, confirmed by higher in situ production of superoxide anion, and reduced the participation of antioxidant enzymes, corroborated with the decrease in SOD-1 protein levels in aorta. Together, these effects characterize endothelial dysfunction in SHR and this seems to be the reason why mercury accelerates the development of hypertension in these animals. These findings suggest that mercury exposure changes the natural course of hypertension in young SHR and is a cardiovascular risk factor for pre-hypertensive individuals.

Keywords: mercury exposure; vascular reactivity; aorta; PGE₂; young SHR.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MERCÚRIO

1.1.1 ASPECTOS GERAIS, FONTES DE EXPOSIÇÃO E APLICAÇÕES DO MERCÚRIO

O mercúrio é um metal pesado que, em condições normais de temperatura e pressão, se apresenta no estado líquido, sendo altamente maleável. Isso explica o seu nome, derivado do latim, *hydrargyrum*, que significa prata líquida, metal ao qual se assemelha (HSDB, 2000). Encontrado naturalmente no meio ambiente, o mercúrio (Hg) é um elemento estável que não pode ser degradado ou destruído (WHO, 2010).

De acordo com sua distribuição eletrônica, o mercúrio tem três possíveis estados de valência e existe em várias formas químicas classificadas em três grupos principais: mercúrio elementar, orgânico e inorgânico.

O mercúrio elementar (Hg⁰), é líquido à temperatura ambiente e pouco absorvível pelo organismo, mas quando aquecido acima da temperatura ambiente é muito volátil, sendo liberado na atmosfera como vapor de mercúrio, que é absorvido rapidamente pela circulação pulmonar (CLARKSON; VYAS; BALLATORI, 2007; IBRAHIM, 2006; WHO, 2004). A exposição a essa forma do mercúrio tende a ocorrer em residências e ambientes ocupacionais como laboratórios que utilizam esse metal, uma vez que ele é utilizado na produção de lâmpadas, de termômetros, amálgamas dentárias, além de ser empregado para extração do ouro em garimpos (AZEVEDO, 2003; SYVERSEN; KAUR, 2012).

O mercúrio inorgânico surge da combinação do metal com átomos de cloro, enxofre ou oxigênio, dando origem aos sais de mercúrio (UNEP, 2002). Como o mercúrio apresenta dois estados de oxidação, o íon mercuroso (Hg2²⁺), e mercúrico (Hg²⁺), ao se combinar com átomos de cloro, pode formar cloreto de mercúrio (HgCl2) e cloreto mercuroso (Hg2Cl2). Esses últimos são os principais exemplos de compostos inorgânicos de mercúrio, sendo mais utilizados para a produção de cosméticos, inseticidas e tintas. Embora esses sais de mercúrio provoquem efeitos tóxicos sobre o organismo, intoxicações mais graves são observadas quando o mercúrio inorgânico é lançado na natureza, atingindo correntes de água. Isso porque na água, o mercúrio inorgânico pode ser convertido em metilmercúrio por um processo chamado de biometilação, realizado por microorganismos aquáticos (KASPER et al., 2007; SYVERSEN; KAUR, 2012; YE et al., 2016).

Já a forma orgânica, ocorre quando o átomo de mercúrio se liga a um carbono de um grupo funcional (grupo etil, metil, fenil ou semelhantes), originando, respectivamente, o etilmercúrio, metilmercúrio ou fenilmercúrio (CLARKSON; MAGOS, 2006; KASPER et al., 2007; SYVERSEN; KAUR, 2012). O metilmercúrio (MeHg) bioacumula em espécies aquáticas e biomagnifica na cadeia alimentar, e por isso é considerado a forma mais tóxica do mercúrio (BRANCO et al., 2007; KOJADINOVIC et al., 2006). O mercúrio lançado nas correntes de água, como rios e lagos, entra na cadeia alimentar aquática, de tal forma que o consumo de peixes oriundos de águas contaminadas pode levar ao acúmulo progressivo do mercúrio no organismo humano, uma vez que a espécie humana se encontra no topo da cadeia alimentar (CLARKSON; MAGOS, 2006; KASPER et al., 2007; SYVERSEN; KAUR, 2012) Isso justifica o crescente interesse da comunidade científica a respeito dos efeitos do mercúrio orgânico sobre o organismo, uma vez que, além de apresentar maior poder toxicológico, a intoxicação por esse metal está intimamente associada ao consumo de peixes contaminados (WOLKIN et al., 2012 CHENG et al., 2013; GUSTIN et al., 2017)..

Quando inalado, o vapor do mercúrio elementar é rapidamente absorvido pelas mucosas e pulmões e, apesar de ser oxidado rapidamente, uma parte desse metal é depositada no cérebro (BRIDGES; ZALUPS, 2010), uma vez que o metal atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. Já o metilmercúrio, é facilmente absorvido pelo intestino e depositado em vários tecidos, porém é pouco eficiente em atravessar a barreira hematoencefálica (CLARKSON; VYAS, 2007).

O mercúrio metálico possui diversas propriedades físicas como: alta densidade, baixa viscosidade, superfície refletora e condutância elétrica, e são estes motivos que explicam seu grande número de aplicações (CLARKSON; MAGOS, 2006). O mercúrio é proveniente de várias fontes naturais como desgaseificação do manto e crosta da Terra, atividade vulcânica, erosão, processos geotérmicos, evaporação de solos e sedimentos, incêndios florestais (GIODA et al., 2007; SELIN et al., 2007; OPAS/OMS, 2011). Estima-se que as emissões e re-emissões naturais de mercúrio são de 4800 toneladas por ano e as emissões antropogênicas representam cerca de 2200 toneladas por ano (SELIN et al., 2007). Apesar da redução ao longo dos anos da produção e consumo mundial do mercúrio, grande parte de dejetos desse metal utilizados por indústrias chegam à natureza contaminando solos e rios e, desta forma, atingindo o homem através de várias fontes de exposição (GUZZI; LA PORTA, 2008) (Figura 1).



Figura 1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio. O mercúrio elementar (Hg⁰) é liberado na atmosfera através das emissões naturais e antropogênicas. Na atmosfera, o Hg⁰ vai reagir com oxigênio atmosférico formando o íon mercúrico (Hg²⁺) que se une aos vapores de água e chega aos solo, rios e lagos através da chuva. No solo, o Hg²⁺ se combina com o cloro (Cl), enxofre (S) e oxigênio (O) formando os sais de mercúrio, ou mercúrio inorgânico. Através de processos de erosão/lixiviação o mercúrio inorgânico é carregado ao ambiente aquático, onde sofre um processo de metilação, realizado por microorganismos, e dá origem ao mercúrio orgânico, principalmente o metilmercúrio (CH₃Hg). Este entra na cadeia alimentar aquática contaminando plantas, mariscos, peixes e por fim, o homem. Na água, o CH₃Hg bioacumula em espécies aquáticas e sofre biomagnificação na cadeia alimentar. Fonte: Própria.

Segundo a Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) (1989), nos Estados Unidos da América, o risco de intoxicação pela acumulação de metilmercúrio originário da ingestão de peixe contaminado depende da concentração do contaminante na carne, da frequência de consumo e da quantidade ingerida (em função do tempo de meia-vida). A Food and Drug Administration (FDA), Agência de

Substâncias Tóxicas e Registro de Doença dos Estados Unidos (ATSDR), a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) têm desenvolvido recomendações para o limite de exposição ao MeHg na dieta. Este varia de 0,1 µg/Kg/dia (EPA) a 0,47 µg/Kg/dia (WHO, 2005). Para o pescado, tem sido apontado limites variando entre 0,4 mg/Hg/Kg a 1,0 mg/Hg/Kg. O Brasil fixou em 0,5 mg/Kg para peixes não-predadores e 1,0 mg/Kg para peixes predadores (SVS/MS, 1988). O valor de referência de mercúrio sanguíneo recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), onde a exposição é considerada sem efeito adverso, é de 5,8 ng/ml (USEPA, 1998).

1.1.2 EFEITOS TÓXICOS DO MERCÚRIO

Todas as formas do mercúrio são consideradas tóxicas e não possuem funções fisiológicas para o organismo (OPAS/OMS, 2011). Vários casos de morte por envenenamento por metilmercúrio já haviam sido descritos na Inglaterra no século XIX (1860) quando este foi sintetizado. No entanto, apenas após grandes catástrofes que marcaram o mundo, como o acidente em Minamata na década de 1950 no Japão (ETO, 2000), e no Iraque (BAKIR et al., 1973), é que a sociedade científica deu atenção ao potencial tóxico deste metal. Muitos efeitos neurocomportamentais em humanos foram relacionados à esta contaminação, como por exemplo: tremores, falta de coordenação motora, distúrbios sensoriais, redução do campo visual, entre outros (TSUBAKI; IRUKYAMA, 1976).

1.1.3 EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE O ORGANISMO

O mercúrio exerce seus efeitos sobre o organismo por meio da ligação a radicais sulfidrilas (-SH) (HALBACH et al., 1981; HALBACH, 1990; CLARKSON, 1993), que são essenciais para a função normal de várias proteínas que constituem enzimas, canais iônicos ou receptores (AOKI; OBA; HOTTA, 1985; ABRAMSON; SALAMA, 1989; HALBACH, 1990; HULME; BIRDSALL; BUCKLEY, 1990); levando a alterações no sistema enzimático e no metabolismo celular (OPAS/OMS, 2011). O mercúrio se liga a biomoléculas que contêm grupamentos tiol, tais como glutationa, cisteína, homocisteína, N-acetilcisteína ou albumina (BRIDGES; ZALUPS, 2017). Entre os prováveis mecanismos tóxicos do mercúrio estão a inativação de enzimas,

proteínas estruturais e processos de transporte ou alteração da permeabilidade da membrana celular (STOHS; BAGCHI, 1995). O mercúrio pode influenciar a atividade da colinesterase e monoamino oxidase, enzimas importantes na síntese e degradação de neurotransmissores (BASU et al., 2007). Sua toxicidade também está relacionada a sua capacidade de aumentar as espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido (O₂•-), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil (OH•) (BRANDÃO et al., 2008). A exposição ao mercúrio também pode promover mudanças no sistema de defesa do organismo quando reduz níveis das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e glutationa (GSH), proporcionando uma menor proteção celular em relação ao estresse oxidativo (RIBAROV; BENOV, 1981). Os efeitos indesejáveis dependem da forma química do mercúrio, da severidade e do tempo de exposição (ZAVARIZ; GLINA, 1992).

1.1.4 EFEITO DO MERCÚRIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Segundo Wakita (1987) e Houston (2007) o desenvolvimento e instalação de doenças cardiovasculares (DCV) como aterosclerose, hipertensão arterial, doença da artéria coronária e infarto do miocárdio estão associadas, dentre outras causas, à exposição crônica a metais pesados.

A toxicidade do mercúrio e a correlação entre a poluição ambiental e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares já são bem documentadas na literatura (GUALLAR et al., 2002; SALONEN et al., 1995, 2000; HOUSTON, 2007; VASSALLO et al., 2011). Trabalhos mostram que a exposição ao mercúrio aumenta o risco de infarto do miocárdio, aterosclerose, hipertensão arterial e disfunção coronariana (RHEE; CHOI, 1989; GUALLAR et al., 2002; BASTOS et al., 2005; FILLION et al., 2006). Além disso, o mercúrio leva à inflamação, trombose, agregação plaquetária (HOUSTON, 2007), dislipidemia (SALONEN et al., 1995), disfunção imunológica (LUND; MILLER; WOODS, 1993; SHENKER; GUO; SHAPIRO, 1998), diminuição da hidrólise de ATP (OLIVEIRA et al., 1991), inibição da atividade da Na⁺K⁺-ATPase miocárdica (AHAMMAD-SAHIB, 1988; HALBACH et al., 1981; OLIVEIRA; VASSALLO, 1992) e diminuição da atividade da Ca⁺²-ATPase (KABEER et al., 1988). Altas concentrações de mercúrio deprimem a contratilidade cardíaca (RHEE; CHOI, 1989; MASSARONI, 1995; VASSALLO et al., 1999; DA CUNHA et al., 2000) e em

baixas concentrações este metal tem um efeito inotrópico positivo (VASSALLO et al., 1999; DA CUNHA et al., 2000).

Os efeitos globais do mercúrio nos vasos de ratos Wistar adultos incluem o aumento do estresse oxidativo (DA CUNHA et al., 2000; WIGGERS et al., 2008b), disfunção do músculo liso vascular e disfunção endotelial (KISHIMOTO et al., 1995; ROSSONI et al., 1999; DA CUNHA et al., 2000a; WIGGERS et al., 2008b). Estudos sugeriram que o aumento do estresse oxidativo induzido pelo mercúrio ocorre por redução na atividade de enzimas antioxidantes no tecido vascular (DA CUNHA et al., 2000; HOUSTON, 2007; WIGGERS et al., 2008b; PECANHA et al., 2010; FURIERI et al., 2011). Diversas ações do mercúrio ocorrem por dano endotelial (FARIA et al., 2018; PECANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2018; WIGGERS et al., 2008a, 2016, 2008b), um dos focos deste trabalho. Assim, para melhor compreensão dos efeitos do mercúrio no sistema vascular, faz-se necessário uma breve descrição da função do mesmo, com o foco nas principais vias vasoativas as quais foram investigadas nesse estudo.

1.2. CONTROLE DO TÔNUS VASCULAR

1.2.1. ENDOTÉLIO VASCULAR

Entre o sangue e o músculo liso vascular existe uma camada pavimentosa de tecido denominada endotélio vascular, que funciona como uma barreira semipermeável, e desta forma controla o fluxo de nutrientes e substâncias. O endotélio em seu perfeito estado auxilia na manutenção do tônus vascular, por meio da liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores, além de inibir a adesão leucocitária, a proliferação das células musculares lisas e a agregação plaquetária (CARVALHO et al., 2001). Os fatores vasodilatadores liberados pelo endotélio vascular são: o óxido nítrico, também conhecido como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (TAYLOR et al., 1988; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006), e a prostaciclina (PGI2) (MONCADA; HIGGS; VANE, 1977; VANHOUTTE, 1993). Já os fatores vasoconstritores são: a endotelina-1 (YANAGISAWA et al., 1998), angiotensina II (KIFOR; DZAU, 1987), e os ânions superóxido (O₂--) (FURCHGOTT, 1984; RUBANYI; VANHOUTTE, 1986), os

produtos do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A2 (TxA2), as prostaglandinas H2 e F2 α (PGH2 e PGF2 α) (FROLICH; FORSTERMANN, 1989; VANHOUTTE, 1993).

1.2.2. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é um mediador gasoso responsável por vários fenômenos fisiológicos. A L-arginina é a precursora da síntese do óxido nítrico, na presença de óxido nítrico sintase. O óxido nítrico pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que ele se encontra, e é destruído rapidamente pelo oxigênio (ARCHER, 1993), produzindo nitrito e nitrato (KIECHELE; MALINSKI, 1993). Segundo Adams (1996), o NO é uma substância vasodilatadora, citotóxica, e, dependendo do tipo celular e estímulo, é capaz de modular reações inflamatórias e anti-inflamatórias.

Estudos têm mostrado que o óxido nítrico é um dos fatores mais importantes na regulação do tônus vascular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MARIN; RODRÍGUES-MARTÍNEZ, 1997). Além de produzir vasodilatação, possui capacidade de inibir a agregação e adesão leucocitária e plaquetária à parede vascular (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991), e também inibe a proliferação celular (GARG; HASSID, 1989).

As enzimas responsáveis por catalisar a produção de NO a partir da Larginina no organismo são as Óxido Nítrico Sintases (NOSs) (NATHAN; XIE, 1994; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Até o momento, foram descritas três isoformas da NOS e estas são agrupadas em duas categorias: NOS constitutiva (c-NOS) e a NOS induzível (i-NOS) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MARLETTA, 1994). A isoforma constitutiva precisa da interação com a calmodulina, que é dependente do aumento dos níveis de cálcio, para ser ativada. Há dois tipos de c-NOS, a NOS endotelial (e-NOS) e a NOS neuronal (n-NOS) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MARLETTA, 1994), sendo ativadas em condições saudáveis (XIA; VANHOUTTE, 2011; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Em contraste, a i-NOS só é induzida por estímulos inflamatórios, e sua ativação é independente da concentração intracelular do Ca²⁺ (GHOSH; SALERNO, 2003).



Figura 2: Isoformas da Óxido Nítrico Sintase. Fonte: Própria.

O shear stress e a estimulação dos receptores (da bradicinina, acetilcolina, adenosina difosfato, serotonina, substância P e outros) na membrana das células endoteliais por agonistas, são responsáveis por estimular a síntese do NO em condições fisiológicas, ocorrendo assim o relaxamento (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; MONCADA; HIGGS, 2006). A síntese do NO ocorre pelas células vasculares endoteliais através da enzima eNOS. A eNOS catalisa a produção do NO a partir do aminoácido L-arginina (BIAN; DOURSOUT; MURAD, 2008) que é convertido em Lcitrulina. Então o NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula a guanilato ciclase solúvel (GCs) (CONGER, 1994; LYONS, 1995). A ativação desta enzima vai gerar aumento da taxa de conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) intracelular, ocorrendo assim a diminuição da tensão do músculo liso (JONES et al., 1999) através da redução da liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático pelo GMPc (COLLINS et al., 1986), e também ajuda na restauração do Ca²⁺ para o retículo sarcoplasmático (CORNWELL; PRYZWANSKY; WYATT TA, 1991), levando ao relaxamento das células do músculo liso vascular (CONGER, 1994; LYONS, 1995).

O NO também pode induzir vasodilatação pela estimulação dos canais de potássio na membrana, ao aumentar o efluxo de K⁺ da célula muscular lisa vai gerar uma redução do potencial de membrana e assim a hiperpolarização (BOLOTINA et al., 1994; NELSON et al., 1995; TRIGGLE et al., 2003; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006). Então, ocorre o fechamento dos canais de Ca²⁺ voltagem dependente

presentes na membrana celular e o músculo liso vascular relaxa, ocorrendo a vasodilatação (NELSON et al., 1995). Além disso, o NO também pode estimular a atividade da Na⁺/ K⁺-ATPase (GUPTA; BANSAL; KHANNA, 1996), que é responsável por manter o potencial de membrana celular e por contribuir para a regulação do tônus vascular e pressão arterial (MARÍN; REDONDO, 1999). Desta forma, o NO mantém a função vascular adequada.

1.2.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) E ESTRESSE OXIDATIVO

As EROs são átomos ou moléculas reativas que possuem número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Essa alta reatividade que as caracterizam é dada por esse não emparelhamento de elétrons (SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004). As principais fontes de espécies reativas de oxigênio são a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria e várias oxidases, incluindo a NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, isoenzimas do citocromo P450, glicose oxidase e a NO sintase desacoplada (VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006; PARAVICINI; TOUYZ, 2008; LASSÈGUE; SAN MARTÍN; GRIENDLING, 2012). A principal fonte de EROs na vasculatura é a NADPH oxidase (CAI; HARRISON, 2000, HIGASHI et al., 2009), principalmente nas células do endotélio vascular (MONTEZANO; TOUYZ, 2012).

A principal função da NADPH oxidase é catalisar a transferência de elétrons da NADPH em moléculas de oxigênio através de suas subunidades catalíticas (Nox), sendo as principais isoformas identificadas nos tecidos cardiovasculares: as Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5 (LASSEGUE; CLEMPUS, 2003; NGUYEN DINH CAT et al., 2012). Contaminantes ambientais como os metais pesados aumentam a produção de radicais livres por ativação da enzima NADPH oxidase (YU, 1994; YU et al., 2008). Em seu estudo, Wiggers et al., (2008b) demonstraram em ratos, que a exposição a baixas concentrações de cloreto de mercúrio afeta possivelmente a atividade da NADPH oxidase, e induzem disfunção endotelial em vasos de condutância e resistência. Grande variedade de doenças estão associadas a metais pesados que se acumulam no organismo e exercem efeitos pró-oxidantes e contribuem para a geração de EROs (CAI; GRIENDLING; HARRISON, 2003; PENDYALA; NATARAJAN, 2010). Dentre as principais EROs destacam-se: o radical superóxido (O₂•-), radical hidroxila

(OH•), o peroxinitrito (ONOO-) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O ânion superóxido (O₂•-), além de ser considerado o radical com maior importância na biologia vascular (TANIYAMA; GRIENDLING, 2003), é fundamental para a produção de outras espécies reativas e causa alterações na função vascular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em todos os sistemas biológicos, são encontradas Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio (ERMO). O metabolismo celular aeróbio, em condições fisiológicas, promove redução tetravalente do O₂, com aceitação de quatro elétrons, formando H₂O (Figura 3). No decorrer desse processo, os intermediários reativos são formados, como os radicais superóxido (O₂•-), hidroperoxila (HO₂•) e hidroxila (OH•), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Na maioria das vezes, é na mitocôndria que ocorre a redução completa do O₂, e a entrada dos quatro elétrons neutraliza a reatividade das ERMO (COHEN, 1989).



Figura 3: Redução tetravalente do oxigênio molecular (O₂) na mitocôndria até a formação de água (H₂O). No processo, há formação de várias espécies reativas de oxigênio (Adaptado de Cohen, 1989).

Em concentrações intracelulares baixas, as EROs são responsáveis por regular o tônus vascular fisiológico, o crescimento celular, adesão, diferenciação, senescência e apoptose (CAI; GRIENDLING; HARRISON, 2003; PENDYALA; NATARAJAN, 2010). Já os níveis elevados, podem estar associados ao desenvolvimento de mecanismos patológicos relacionados à disfunção endotelial, reatividade vascular, remodelamento arterial e inflamação vascular (DRUMMOND et al., 2011a; LASSÈGUE; SAN MARTÍN; GRIENDLING, 2012).

O aumento da produção de EROs pode gerar uma diminuição das defesas antioxidantes do organismo, ocasionando o estresse oxidativo (BRANDÃO et al., 2008). Segundo Bianchi e Antunes (1999), o estresse oxidativo pode gerar lesões nas proteínas e ao DNA, provocando várias mudanças na função celular e, assim, tecidual. Na vasculatura, desencadeia processos moleculares que contribuem para lesão vascular (AFONSO; SANT'ANA; MANCINI-FILHO, 2010). Estudos também demonstraram que a exposição ao mercúrio induz estresse oxidativo, que danifica vários órgãos e sistemas (WIGGERS et al., 2008b; RIZZETTI et al., 2017).

1.2.4. VIA DA CICLOOXIGENASE (COX)

A ciclooxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina H sintase ou endoperóxido de prostaglandina sintase (EC1.14.99.1), é uma enzima que limita a velocidade na síntese de prostanóides, que são mensageiros lipídicos bioativos com muitos papéis essenciais na fisiologia e na doença (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004). Possui função de catalisar a conversão de ácido araquidônico à prostaglandina G₂ (PGG₂), pela sua atividade de ciclooxigenase; e de PGG₂ à prostaglandina H₂ (PGH₂), pela sua atividade de peroxidase; e, por isso, é considerada uma enzima bifuncional ligada à membrana (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Foi postulada uma distinção entre as isoformas da COX devido à sua expressão gênica (SEIBERT; MASFERRER, 1994; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). A COX-1 é a isoforma constitutiva, expressa na maioria das células e tecidos onde os prostanoides derivados da COX-1 estão envolvidos nas funções homeostáticas (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). É função da COX-1 manter a função fisiológica normal do aparelho urinário, além de proteger o trato gastrointestinal, sistema nervoso central, sistema reprodutivo e cardiovascular (ANTMAN; DEMETS; LOSCALZO, 2005; GROSSER; FRIES; FITZGERALD, 2006).

Já a COX-2, é geralmente considerada como a isoforma induzível, responsável pelo aumento da produção dos prostanoides em resposta a estímulos inflamatórios e fatores de crescimento durante a inflamação e várias condições patológicas (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). O substrato preferido

da COX-1 são os ácidos graxos, principalmente o ácido araquidônico, a COX-2 utiliza ácido graxos porém pode utilizar substrato diferente como o glicerol 2-araquidonil (SMITH; SONG, 2002).

Para ocorrer a síntese dos prostanoides, as isoformas COX-1 e COX-2 primeiramente transformam o ácido araquidônico em Prostaglandina H₂, em seguida, esta é convertida em prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F₂a (PGF₂a), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina I₂ (PGI₂) ou em TXA₂ por ação de sintetases específicas (MARDINI; FITZGERALD, 2001). Após liberados, os prostanoides se ligam a receptores acoplados a proteína G, estes receptores são: EP1 – EP4, IP, FP, DP e TP. A PGE₂ acoplam-se aos receptores EP, a PGI₂ une-se a receptores IP, a PGF₂a conecta-se ao FP, a PGD₂ se acopla ao DP e o TXA₂ vai se ligar aos receptores TP (FUNK, 2001; WRIGHT et al., 2001).

Existem dois tipos de respostas desencadeadas sobre o leito vascular pelos prostanoides ao se ligarem aos seus respectivos receptores: relaxamento e vasoconstricção do músculo liso vascular. Para promover o relaxamento, os prostanoides ativam os receptores EP₂, EP₄, DP e IP, estes estimulam a adenilato ciclase, que vai aumentar os níveis de AMPc. Já a contração do músculo liso vascular, ocorre por vários mecanismos, os receptores envolvidos são EP₁, EP₃, FP e TP (FUNK, 2001; WRIGHT et al., 2001). Desta forma, os prostanoides estão relacionados ao controle do tônus e reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas (DAVIDGE, 2001; ADEAGBO et al., 2005; ALVAREZ et al., 2005, 2007).

Em pacientes e em diferentes modelos animais de hipertensão há aumento dos prostanoides vasoconstritores derivados da isoforma COX-2, que são responsáveis por aumentar as respostas vasoconstritoras e disfunção endotelial presente nessa doença (WIDLANSKY et al., 2003; ALVAREZ et al., 2007; WONG et al., 2011; TIAN et al., 2012; MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; VIRDIS et al., 2013; AVENDAÑO et al., 2016). Por ser uma doença inflamatória, é visto na hipertensão um aumento da expressão da isoforma induzível (COX-2), tornando o quadro ainda mais grave por estar associado ao aumento da participação de receptores TP e estresse oxidativo. Estudos têm demonstrado a ação dos prostanoides vasoconstritores da COX-2 no aumento da reatividade vascular, pressão arterial e disfunção endotelial em modelos animais de hipertensão (ALVAREZ et al., 2005, 2007). A via da COX-2 é considerada a principal fonte de EROs na hipertensão essencial e em modelos

animais de hipertensão (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; HERNANZ et al., 2014; VIRDIS; TADDEI, 2016).

1.3 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A Hipertensão Arterial (HA) é uma doença crônica, de origem multifatorial (YAZBECK et al., 2009), como aspectos genéticos, nervosos, hemodinâmicos, metabólicos e ambientais (PAGE, 1949). Por apresentar altos custos médicos e socioeconômicos, a HA é considerada como um importante problema de saúde pública. A HA provoca complicações, como: insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana, doença vascular periférica, doença cerebrovascular e insuficiência renal crônica (MACMAHON; PETO; CUTIER, 1995; PIMENTA; OPARIL, 2010).

O desenvolvimento da hipertensão está intimamente associado à reatividade vascular periférica. Comprometimentos funcional na regulação da contração e relaxamento do músculo liso vascular estão, muitas vezes, relacionados ao aumento da resistência vascular periférica (LEE et al., 2015). As Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial determinam que, para serem classificados como normotensos, os indivíduos devem apresentar valores menores que 120 mmHg de pressão arterial sistólica (PAS) e 80 mmHg de pressão arterial diastólica (PAD). Para ser classificados com pré-hipertensão os indivíduos devem apresentar valores acima destes últimos descritos indicam hipertensão arterial (VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial).

A hipertensão arterial pode ser classificada em essencial e secundária. Segundo Lenfant et al., (2003) a hipertensão essencial ou primária é mais frequente em adultos (95%). No entanto, tem seu início na infância (BERENSON et al., 1994; BAO et al., 1995), período em que começa desenvolver as primeiras alterações no sistema arterial, coração e também em outros órgãos (DANIELS; MEYER; LOGGIE, 1990; MCNIECE et al., 2007). Existem fatores intrínsecos e extrínsecos que colaboram para origem e/ou sustentação da hipertensão essencial. Entre os fatores intrínsecos estão: a resistência à insulina, aumento do sistema renina-angiotensina e da atividade simpática, hereditariedade (HARRAP, 1994), a raça (FREIS, 1973), modificações dos parâmetros hemodinâmicos (alterações na resistência vascular periférica e no débito cardíaco) (FOLKOW, 1982; HARRAP, 1994). Já os fatores extrínsecos são: alto consumo de sal, sedentarismo, tabagismo e obesidade (BAKRIS; MENSAH, 2002). Diversos estudos têm demonstrado o aumento da pressão arterial após exposição a metais pesados, como o mercúrio (CARMIGNANI et al., 1992; VASSALLO et al., 2011; DA CUNHA et al., 2000; RIZZETTI et al., 2017), cádmio (GONICK et al., 1997; MASSO; CORREDOR; ANTONIO, 2007; ALMENARA et al., 2013) e chumbo (SIMÕES et al., 2017; VAZIRI et al., 1997). Na hipertensão secundária ocorre o aumento da pressão arterial sistêmica (PA) devido a uma causa identificável. A forma secundária acomete de 5-10% dos pacientes que possuem a hipertensão arterial (MANCIA; FAGARD; NARKIEWICZ et al., 2013).

O músculo liso participa da regulação da PA através do tônus vascular e o endotélio possui participação essencial e ativa no controle e manutenção da PA por ser capaz de liberar substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras, que regulam o crescimento do músculo liso e o tônus vascular. Nota-se que a hipertensão arterial é acompanhada por alterações no papel das células endoteliais. Desta forma, a resistência vascular aumentada é consequência da disfunção endotelial, e vai contribuir para o processo hipertensivo (CANNON III, 1998; TRIGGLE et al., 2003; KOLLURU; SIAMWALA; CHATTERJEE, 2010).

Estudos já confirmaram que na hipertensão há redução da síntese do NO, outros acreditam que há aumento da produção e assim ocorre um mecanismo compensatório ao aumento da pressão arterial (DOHI et al., 1990; ALEXANDER et al., 1999; BRIONES et al., 1999;; ROSSONI et al., 2002; CHANG et al., 2002). Porém, há pesquisadores que descrevem que a síntese e liberação de NO parece não estar alteradas na hipertensão, no entanto, sua biodisponibilidade está reduzida devido à grande formação de ânion superóxido, que agem inativando o NO, e assim reduzem sua ação vasodilatadora e promove vasoconstricção (GRYGLEWSKI; BOTTING; VANE, 1988; SUZUKI et al., 1995). Outros fatores que contribuem para a hipertensão é o desacoplamento da eNOS e aumento da expressão e atividade da NADPH oxidase, o qual contribui para a formação de ânion superóxido, que também tem sido descrito na hipertensão arterial (ZALBA et al., 2000; BESWICK et al., 2001; FORTUNO et al., 2005).

Cosselman; Navas-Acien; Kaufman, (2015) realizaram estudos epidemiológicos que sugeriram associações potenciais entre a exposição ambiental a metais com o aumento da prevalência de hipertensão. Assim, para investigar se essa exposição ao mercúrio causa alterações na pressão arterial de ratos com prédisposição genética para hipertensão arterial, estudamos o modelo genético de hipertensão experimental espontânea, ou seja, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), que constituem o modelo mais semelhante à hipertensão primária no homem (TRIPPODO; FROHLICH, 1981). Essa semelhança se dá pelo fato de apresentarem respostas endócrinas e hemodinâmicas similares às do homem com hipertensão essencial (SEALS et al., 1993). A elevação da pressão arterial no SHR surge a partir da 5ª semana de vida (LEE, 1985), e a hipertensão já é considerada instalada quando o animal encontra-se na 7ª semana (YAMORI, 1994). No entanto, não se sabe se a exposição crônica ao mercúrio poderia alterar o curso natural da hipertensão essencial em SHRs jovens, sendo um fator de risco para indivíduos préhipertensos.

A hipótese do presente estudo é que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio, por 30 dias, poderia antecipar o aparecimento de hipertensão em SHR jovens, e, também, verificar possível correlação entre essa antecipação do aparecimento da hipertensão e disfunção vascular induzida pelo metal nesses animais.

1.4 JUSTIFICATIVA

O mercúrio é considerado um fator de risco cardiovascular. Em ratos adultos normotensos a exposição por 30 dias ao mercúrio não causa hipertensão, embora esse metal promova disfunção vascular. Nada se sabe sobre a ação do mercúrio no desenvolvimento da hipertensão de animais SHR jovens e tão pouco sobre a reatividade vascular desses animais e de animais normotensos jovens. Diante disso, torna-se relevante avaliar o papel do mercúrio após 30 dias de exposição na reatividade vascular em aorta de ratos Wistar e SHR jovens, ou seja, SHR ainda no estágio pré-hipertenso, avaliando se o mercúrio altera a história natural da hipertensão nesses ratos e sua implicação no Wistar jovem.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio por 30 dias sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de aorta de ratos Wistar e SHR jovens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito do tratamento crônico por 30 dias com HgCl₂ sobre a pressão arterial sistólica de ratos Wistar e SHR jovens, através de pletismografia de cauda;
- Verificar se a exposição ao cloreto de mercúrio influencia o ganho de massa dos animais;
- Determinar se o mercúrio promove alteração na sobrecarga do ventrículo esquerdo estimando a hipertrofia cardíaca;
- Investigar se a exposição ao mercúrio promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar e SHR jovens;
- Investigar se o mercúrio altera a participação de fatores endoteliais em resposta à fenilefrina, como: modulação do óxido nítrico, estresse oxidativo, e prostanoides derivados da COX-2;
- Averiguar o efeito do mercúrio sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio em aorta isolada de ratos Wistar e SHR jovens;
- Quantificar a produção vascular in situ de O₂•-, através de análise de fluorescência por DHE após exposição ao HgCl₂;
- Avaliar se o tratamento crônico com cloreto de mercúrio altera a expressão proteica da SOD-1 e COX-2 na aorta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Todos os procedimentos experimentais e o uso e cuidado com esses animais foram realizados de acordo com as normas para pesquisa biomédica conforme declarado pelas Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental, e todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil (CEUA-UFES 09 / 2018).

Foram utilizados para este estudo ratos jovens espontaneamente hipertensos (SHRs) e Wistar, com 4 semanas de idade. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (4 ratos por gaiola), sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso a água e a ração especial para roedores. Os ratos foram divididos em quatro grupos: Wistar Controle (Wistar Ct), Wistar Mercúrio (Wistar Hg), SHR Controle (SHR Ct) e SHR Mercúrio (SHR Hg). Os grupos controle receberam injeções intramusculares de veículo (solução salina, 0,9%) por quatro semanas e os grupos mercúrio receberam injeções intramusculares de cloreto de mercúrio (HgCl₂), sendo a primeira dose 4,6µg / kg e doses subsequentes de manutenção de 0,07 µg / kg / dia, de acordo com Wiggers et al., (2008b). As doses foram ajustadas à massa do rato semanalmente.

3.2 PRESSÃO ARTERIAL E MASSA CORPORAL

A pressão arterial e o massa corporal dos animais foram acompanhados semanalmente com o objetivo de avaliar se a exposição crônica ao cloreto de mercúrio interfere na pressão arterial e no ganho de massa dos animais. Para avaliar a possibilidade de impactos sobre o crescimento ósseo, a tíbia foi medida com auxílio de paquímetro após eutanásia dos animais, ao final do protocolo de tratamento.

A pressão arterial sistólica foi mensurada antes e semanalmente após o início da exposição ao mercúrio ou veículo em ratos acordados, de maneira indireta e não invasiva, utilizando o pletismógrafo de cauda (IITC Life Science - 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA, EUA). Os ratos foram submetidos previamente a ambientação por 3 dias durante 10 min para se adaptarem aos ciclos de deflação-inflação do pletismógrafo antes da primeira mensuração de pressão, com o objetivo de prevenir alterações pressóricas devido ao estresse dos animais frente ao procedimento de obtenção dos valores.

No dia do registro da pressão arterial sistólica, os animais foram colocados em um contentor cilíndrico de acrílico onde permaneceram por 5 a 10 min. A cauda dos animais era conectada ao manguito inflável dotado de sensor de fluxo conectado ao
amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados pressóricos. Os cilindros com os ratos eram colocados no interior de um aparato que promovia um ambiente escuro e aquecido a 33 °C, a fim de promover dilatação da artéria caudal permitindo a aferição da PAS. A média aritmética de três medidas foi utilizada.

3.3 HIPERTROFIA CARDÍACA

Após os 30 dias de exposição ao mercúrio, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal, uma mistura de quetamina (90mg / kg) mais xilazina (10mg / kg), os reflexos foram testados para confirmar a sedação e então, a toracotomia foi realizada e os corações removidos. O ventrículo esquerdo (VE) foi cuidadosamente dissecado, colocado por 24 horas na estufa a 37 °C e depois foi realizado a averiguação da massa seca. A tíbia também foi retirada para estimar o crescimento ósseo, medida com o paquímetro e utilizada para normalização da massa do VE. A razão entre massa seca do VE (mg) e comprimento tibial (mm) foi calculada para estimar a hipertrofia cardíaca.

3.4 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR

Após a anestesia, a aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida utilizando pinça e tesoura, e imersa rapidamente em placa de Petri contendo solução de Krebs- modificada, fria (4°C), composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl_{2.2}H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01. Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seguimentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento (Figura 4). Os anéis de aorta foram montados em banho de órgãos contendo solução de Krebs-Henseleit na temperatura de $36,5 \pm 0,5^{\circ}$ C gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (pH 7,4). Dois fios de aço inoxidáveis, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma a ficar paralelos na luz do vaso. Um triângulo foi fixado à parte inferior do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de força isométrica (TSD125C, CA, U.S.A). Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor que estava conectado a um sistema de aquisição de

dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Barbara, CA, USA) e este a um computador (Figura 5).



Figura 4. (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm (Angeli, 2009).



Figura 5. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular *in vitro*. Fonte: Própria (2019).

Em seguida à montagem, os segmentos vasculares foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,9 a 1,3 gramas para os grupos Wistar controle e Wistar mercúrio, e tensão de repouso entre 1,4 a 1,7 para os grupos SHR controle e SHR mercúrio, reajustadas, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização a uma temperatura de 37º C. Após esse período de estabilização, verificou-se a integridade funcional do músculo liso vascular, induzida por despolarização e posterior aumento de tensão dos anéis aórticos, utilizando o KCI (75mM). Ao atingirem um grama de força a partir do valor basal os anéis aórticos foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit para retornarem a tensão de repouso. Os segmentos que não

atingiram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização, uma nova dose de KCI 75 mM foi adicionada ao banho para aquisição da contração máxima do MLV, sendo aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração. Após esse platô, os anéis foram novamente lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit para atingir o valor basal, e após 30 minutos, esses segmentos foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

A integridade funcional do endotélio foi avaliada através da capacidade da acetilcolina (10⁻⁵ M), agonista muscarínico, induzir relaxamento em anéis de aorta previamente contraídos com fenilefrina (10⁻⁷ a 10⁻⁶ M), um agonista α 1-adrenérgico, até atingir platô de contração mínimo de 50 a 70% da contração do KCI. Posteriormente, a preparação foi lavada três vezes, e após 30 minutos de estabilização da tensão basal, os fármacos que atuam nas vias vasoativas a serem estudadas foram incubados por 30 minutos. Transcorridos esse período foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10⁻¹¹ a 10⁻⁴ M) (Figura 6 e 7).



Figura 6. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCI e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCI: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0,9 a 1,3g para Wistar e 1,4 a 1,7g para SHR); B) Adição de KCI (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCI (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCI (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10⁻⁷ M ou mais até atingir entre 50 e 70% do 2º KCI; J) Adição de acetilcolina (ACh) 10⁻⁵ M; L) Troca de solução Krebs-Henseleit e período de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (Dias, 2007).



Figura 7. Representação dos registros dos experimentos de reatividade vascular em anéis de aorta. A) Contração ao KCI (75 mM); B) teste de integridade do endotélio; C) Incubação com fármaco e curva concentração- resposta à fenilefrina; D) Resposta vascular a acetilcolina/ nitroprussiato de sódio após pré- contração à fenilefrina. Fonte: Própria.

Os seguintes protocolos experimentais foram realizados:

 a) Avaliação da resposta vasoconstrictora à fenilefrina, através da realização de uma curva concentração-resposta (entre 10⁻¹¹ a 10⁻⁴ mol/L) analisando a variação de contração ocorrida a cada concentração.

b) Vasodilatação dependente do endotélio, avaliada por meio da resposta à acetilcolina realizada nas artérias previamente contraídas com fenilefrina. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 10⁻¹² a 10⁻⁴ mol/L) avaliando-se o percentual de redução da tensão em relação ao estado pré-contraído.

c) Vasodilatação independente do endotélio, avaliada por meio da resposta ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (NPS, 10⁻¹² a 10⁻⁴ mol/L) realizada nas artérias previamente contraídas com fenilefrina até atingir platô e após platô, realizouse curvas concentração-resposta ao NPS. Também foi avaliado o percentual de redução da tensão em relação ao estado pré-contraído.

d) Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME,100 μM).

e) Para verificar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil à fenilefrina foi utilizada a Apocinina (Apo, 30 μM), que é uma inibidora da NADPH oxidase, ou seja, inibe uma das principais enzimas formadoras de radicais

livres, e também foi utilizado a Catalase (1000U/ml), um varredor enzimático de peróxido de hidrogênio;

f) Para avaliar a exposição ao cloreto de mercúrio sobre a participação da via do ácido araquidônico- ciclooxigenase na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, os anéis isolados de aorta foram incubados com Indometacina (10 μ M), um inibidor não-seletivo da enzima ciclooxigenase (COX). Também foram utilizados o Celecoxibe (1 mM), um inibidor específico da COX-2; SQ 29,548 (1 μ M), antagonista do receptor tromboxano- prostanoide (TP); e SC 19 220 (10 μ M) antagonista do receptor EP₁ de prostaglandina E₂. Também foi utilizado um antagonista do receptor IP de prostaciclina (PGI₂), Cay 10 441 (100 nM).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO VASCULAR DE ÂNION SUPERÓXIDO $(O_2^{\bullet}-)$

Para verificar a influência da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a produção de O2[•]–, foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE) como descrito anteriormente por Wiggers et al. (2008b). A membrana celular é permeável ao hidroetídio, e na presença de O₂•–, esse componente é oxidado a brometo de etídio, se liga ao DNA, e emite uma coloração vermelha ao ser excitado. O experimento foi realizado em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

Após a dissecção, as aortas foram imersas em *eppendorf* com solução tampão de Krebs-HEPES com 30% de sacarose durante uma hora. A seguir, foram embebidas em meio de inclusão para criostato (Tissue-Tek O.C.T.) e mantidas em -80 °C até o momento de realização dos cortes.

Os segmentos da artéria congelados foram cortados com o criostato em secções de 10 µm de espessura e colocados em lâminas de vidro gelatinizadas. As lâminas foram colocadas em estufa a 37 °C por uma hora para derreter o meio de inclusão. Logo em seguida foram incubados durante 30 min a 37°C em tampão Krebs-HEPES (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 0,24 MgCl₂, 8,3 HEPES e 11 glucose, pH 7,4). Em seguida, o Krebs-Hepes foi escorrido e o excesso foi seco. Posteriormente foi realizada a incubação com uma solução contendo HEPES e DHE (2 µM) por 30 min em uma câmara umidificada protegida contra luz a 37 °C. Decorrido

este tempo, as lâminas foram montadas com meio de montagem cobertas com lamínula e então visualizado com um microscópio de fluorescência invertida (Leica DM 2500, objetiva 40x), com uma câmera fotográfica Leica DFC 310 FX, foram utilizados os mesmos ajustes de imagem em ratos controle e expostos ao cloreto de mercúrio. A fluorescência foi detectada com um filtro de 568 nm. Para quantificação, quatro anéis por animal foram amostrados para cada condição experimental e a média foi calculada. A quantificação das imagens foi realizada pelo *software* ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

A técnica de Western Blotting foi utilizada para determinar a influência da exposição ao cloreto de mercúrio sobre o conteúdo de proteínas-chaves nos processos e vias identificados pelos ensaios funcionais em aorta. Os anéis aórticos foram dissecados em solução nutridora de Krebs-Henseleit e armazenados a -80°C até a homogeneização das amostras. Para extração das proteínas, os segmentos aórticos foram homogeneizados por trituração em solução contendo: Tris - HCI (10 mM, pH 7,4); NaVO₃ (1 mM); SDS, 1 %; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM , pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Inibidor de protease, em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras eram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz, GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, 6.000 rpm a 4°C e, em seguida, o sobrenadante era retirado e feita então a quantificação proteica pelo método de Lowry (Peterson, 1977). Determinou-se a densidade óptica medindo a absorbância num espectrofotómetro multi-canal a λ = 750 nm (Cary Varian. San Diego, CA, USA). Para a quantificação, foi realizada uma diluição da amostra (1:50). Em seguida, o volume necessário para uma carga de 80 µg de proteína foi calculado, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 4X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%), e após centrifugação foram mantidas à temperatura de 95 °C durante 4 minutos.

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 7,5% ou 10% (Tris Hcl 1,5 M pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, persulfato de amônico (APS) 10% e Temed), juntamente com um marcador de peso molecular de

amplo espectro (6 a 180kDa), previamente imersos em uma cuba contendo solução tampão para eletroforese (Tris HCl 25mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%) sendo submetidas à eletroforese aplicando uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPacTM HC, BioRad, Singapura) fazendo com que as amostras (proteínas) passassem pelo gel.

Após o término da eletroforese, foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, foi realizado o método de transferência líquida na qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche em suporte Holder Cassete e acoplado à uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 190mM, SDS 0.1% e Metanol 20%) à 8º C com uma corrente de 60 V, overnight.

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com uma solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas por toda a noite à 4 °C, sob agitação, em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para COX-2 (anticorpo monoclonal 1: 1000; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), SOD-1 (1: 1000, anticorpo monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e α -actina (1: 20.000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) utilizada como controle de carga do mesmo homogenato.

Uma vez finalizada a incubação, as membranas foram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 30 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 10 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente e agitação contínua, com anticorpo secundário IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas por 30 min com solução de TBS-t, para remoção do excesso de anticorpo secundário, e mais 30 min de lavagem com solução TBS (Tris-HCI 10 mM, NaCI 100 mM, pH 7,5), as soluções foram trocadas a cada 5 minutos no TBS-T e a cada 10 minutos no TBS. Os imunocomplexos foram detectados utilizando um sistema de quimioluminescência por meio da exposição da membrana por 5 minutos a um sistema de detecção (ECL Prime, Amersham

International, Little Chalfont, UK). A aquisição de imagens foi realizada utilizando o ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA), e a análise densitométrica das bandas de proteínas nos sinais de imunotransferência foi quantificada usando o programa de computador ImageJ (Imagem V1.56; National Institutes of Saúde, EUA). Os dados de expressão de proteína foram expressos como a razão entre os sinais no immunoblot correspondendo as proteínas de interesse e α-actina.

3.7 DROGAS E REAGENTES

Cloreto de Mercúrio (HgCl₂), Apocinina, Cloridrato de Fenilefrina, Cloreto de Acetilcolina, L-NAME, Indometacina, Nitroprussiato de Sódio e Catalase foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St Louis, USA); Celecoxib, SC 19220, SQ 29 548 e CAY 10441 foram adquiridos pela Cayman Chemical; Cloreto de potássio pela Merck. Quetamina da Vetnil. Xilazina adquirido da Ceva. Sais e reagentes, quando não especificados, foram obtidos da Sigma ou Merk (Darmstadt, Alemanha).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os valores foram expressos como a média ± EPM. Para normalizar as forças obtidas de cada preparação, as respostas vasoconstritoras induzidas pela fenilefrina foram expressas como uma porcentagem da contração induzida pelo KCI 75 mM. A resposta vasodilatadora foi expressa como uma porcentagem da contração prévia de fenilefrina. Para cada curva concentração-resposta, o efeito máximo (Rmax) e a concentração do agonista que produziu metade da Rmax (EC₅₀) foram calculados usando análise de regressão não linear (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). A sensibilidade dos agonistas foi expressa como pD2 (-log EC₅₀). Para comparar os efeitos da incubação de fármacos nas respostas contráteis à fenilefrina, alguns resultados foram expressos como diferenças da área abaixo das curvas de concentração- resposta (dAAC) para os grupos controle e experimental. As AAC foram calculadas a partir dos gráficos individuais de concentração-resposta utilizando um programa de computador (GraphPad Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). As diferenças foram expressas como a porcentagem da dAAC da situação

controle correspondente. Para a expressão da proteína, os dados foram expressos como a razão entre os sinais no immunoblot correspondente à proteína estudada e normalizados com α-actina. A análise estatística dos resultados foi realizada por teste t, pareado e / ou não pareado, e análise de variância (ANOVA), uma e / ou duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizadas. Quando a ANOVA duas vias apresentava significância estatística, o teste post-hoc de Bonferroni foi realizado para comparação entre médias, e o teste de Tukey post-hoc usado para ANOVA uma via. Os dados foram analisados e plotados usando o software GraphPad Prism (versão 6.0, EUA). Os resultados foram considerados significativos para valores de p <0,05.

4. RESULTADOS

4.1 MASSA CORPORAL

Os grupos SHR obtiveram uma massa menor quando comparados aos grupos Wistar, e não houve diferença significativa no ganho de massa entre os grupos Wistar e entre os SHR após a exposição ao mercúrio (Wistar Ct = $287,2 \pm 33,4$ g vs Wistar Hg = $284,6 \pm 37,9$ g / SHR Ct = $178,4 \pm 23,5$ g vs SHR Hg = $184,1 \pm 16,9$ g, P > 0,05).

4.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A pressão arterial sistólica (PAS) não foi alterada nos grupos Wistar durante as semanas de exposição ao mercúrio e foi similar entre os grupos Wistar Ct e Wistar Hg. No grupo SHR Ct, como era de se esperar, observou-se aumento progressivo de PAS a partir da segunda semana, com estabilização da mesma na quarta semana. No entanto, após uma semana de exposição ao mercúrio, já verificou-se aumento da PAS no animais SHR, quando comparados aos animais SHR Ct, sendo que esta diferença se manteve até o final das 4 semanas de exposição ao metal (Figura 8, Tabela 1).

PAS (mmHg)								
Grupos	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4			
Wistar Ct	82,87±3,28	87,74±2,14	92,70±2,97	92,91±2,38	92,37±1,71			
Wistar Hg	82,87±1,50	92,66±2,45	100,47±2,29	95,25±2,82	101,33±2,37			
SHR Ct	98,80±3,24 [#]	100,81±3,30 [#]	116,55±2,59 [#]	134,42±1,95 [#]	141,76±2,52 [#]			
SHR Hg	104,70±1,30*	113,95±2,74*&	129,41±2,04*&	147,75±3,16*&	148,87±2,7* ^{&}			

Tabela 1. Evolução temporal dos valores da PAS medidos por pletismografia de cauda em SHR préhipertensos e Wistar jovens.

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni: * P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; & P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Ct. N=8, em cada grupo.



Figura 8. Influência da exposição crônica ao mercúrio sobre a PAS de SHR pré- hipertensos e Wistar jovens. Evolução temporal dos valores da PAS medidos por pletismografia da cauda em Wistar Ct (n = 8), Wistar Hg (n = 8), SHR Ct (n = 8) e SHR Hg (n = 8) por quatro semanas. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni: * P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; & P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Ct e Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; & P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Ct e Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; & P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; % P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; % P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; % P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; % P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; % P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; % P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg; % P <0,05 - SHR Ct vs SHR Hg. # P <0,05 - Wistar Ct e Wistar Hg vs SHR Hg.

4.3 HIPERTROFIA CARDÍACA

A morfometria cardíaca foi avaliada nestes animais porque existe uma relação entre hipertrofia cardíaca e aumento na sobrecarga de pressão, que é uma resposta adaptativa a condições patológicas como a hipertensão (COOPER IV, 1987). Não houve diferença significativa na relação massa do VE / comprimento da tíbia nos grupos Wistar e SHR na ausência ou presença de exposição ao mercúrio (Figura 9, Tabela 2).



Figura 9. Análise da hipertrofia cardíaca dos ratos Wistar (A) e SHR (B), na ausência (Ct) e presença de HgCl₂ analisados pela razão massa (g) ventrículo esquerdo úmido pelo comprimento da tíbia (mm). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados estão expressos em média ± EPM. Teste t não pareado.

Tabela 2. Parâmetros ponderais, massa VE, comprimento tíbia e relação do massa do VE/ comprimento tíbia para se estimar hipertrofia cardíaca nos grupos expostos ao mercúrio e nos seus respectivos grupos controle.

	Wistar Ct	Wistar Hg	SHR Ct	SHR Hg
Massa corporal (g)	287,2±33,4	284,6±37,9	178,4±23,5	184,1±16,9
Massa VE (mg)	0,119±0,004	0,116±0,005	0,106±0,005	0,103±0,004
Comprimento tíbia (mm)	32,58±0,71	32,46±0,86	29,58±0,59	30,17±0,51
VE (mg)/ tíbia (mm)	3,63±0,10(9)	3,67±0,13(6)	3,57±0,10(8)	3,42±0,14(10)

Efeitos da exposição ao mercúrio sobre os parâmetros ponderais. *P<0.05 vs animais controles no teste t Student não-pareado. Número amostral está indicado entre parênteses.

4.4 REATIVIDADE VASCULAR

4.4.1 REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA

A exposição crônica ao mercúrio não afetou a resposta ao KCI nos anéis aórticos isolados dos grupos estudados (Wistar Ct: 2,38 \pm 0,06 g, n = 34; Wistar Hg: 2,45 \pm 0,06 g, n = 33, SHR Ct: 1,88 \pm 0,05 g, n = 24; SHR Hg: 1,98 \pm 0,04 g, n = 26, *P> 0,05 vs animais controles por teste t Student não-pareado) (Figura 10).



Figura 10. Resposta contrátil ao KCI (75mM), em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar e SHR, na ausência (Ct) e presença de HgCl₂. W Ct (n= 32); W HgCl₂ (n= 35); SHR Ct (n= 24) e SHR HgCl₂ (n= 27). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCI.

A fenilefrina induziu resposta contrátil, concentração-dependente, em anéis isolados de aorta de todos os grupos estudados. No entanto, a exposição ao mercúrio promoveu aumento dessa resposta em aorta isolada de animais SHR quando comparados aos seus controles SHR Ct (Figura 11 B, Tabela 3). Já nos animais Wistar, não foram evidenciadas alterações na resposta à fenilefrina (Figura 11 A).

	FE			
Grupos	Rmax (%)	pD2		
Wistar Ct	79.66±3.67	-5.96±0.16	_	
Wistar Hg	75.10±3.38	-5.83±0.18		
SHR Ct	78.48±4.38	-5.79±0.22		
SHR Hg	93.53±4.27*	-6.51±0.15*		

Tabela 3. Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD2) da curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) sobre anéis aórticos de Wistar e SHR jovens na ausência e presença do HgCl₂ (Hg).

Os dados foram expressos como a média \pm EPM. Os valores de Rmax foram expressos como uma porcentagem da resposta máxima induzida por 75 mM de KCI. pD2, -log da metade do Rmax. Teste t não pareado entre os grupos de mesma linhagem. * P <0,05; Rmax: Wistar Ct vs Wistar Hg; SHR Ct vs SHR Hg.



Figura 11. Reatividade vascular na aorta de ratos Wistar e SHR jovens tratados com cloreto de mercúrio. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica nos grupos Wistar Ct e Wistar Hg (A) e SHR Ct e SHR Hg (B). O número de animais utilizados está indicado entre parênteses. Os resultados (média ± EPM) são expressos como a porcentagem de contração induzida pelo KCI 75 mM. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 - vs SHR Ct.

4.4.2 RESPOSTA VASODILATADORA À ACETILCOLINA E AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO

Para verificar se a exposição crônica ao mercúrio afetou o relaxamento dependente e independente do endotélio, foram realizados experimentos com acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente. Tanto a acetilcolina quanto o nitroprussiato de sódio promoveram relaxamento concentração-dependente nos segmentos isolados de aorta em todos os grupos estudados. Além disso, a resposta máxima induzida pela acetilcolina ou nitroprussiato de sódio não foi diferente entre os grupos (Rmax (%): ACh, Wistar Ct: 92,71 \pm 2,08; Wistar Hg: 95,20 \pm 1,33; SHR Ct: 95,94 \pm 3,30; SHR Hg: 98,59 \pm 1,89. NPS, Wistar Ct: 102,7 \pm 0,74; Wistar Hg: 102,3 \pm 0,57; SHR Ct: 106,4 \pm 3,30; SHR Hg: 100,4 \pm 1,17).

4.4.3 EFEITO DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA VASCULAR À FENILEFRINA

Para determinar se a participação do óxido nítrico na resposta contrátil à fenilefrina foi afetada pela exposição crônica ao mercúrio, os anéis aórticos isolados foram incubados com L-NAME (100 µM), um inibidor não-específico da NOS. O L-NAME aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em todos os grupos. A magnitude do efeito avaliado através da %dAAC não foi diferente entre os grupos Wistar Ct e Wistar Hg, e SHR Ct e SHR Hg (Figura 12).



Figura 12. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio na resposta vascular mediada pelo NO em resposta à fenilrefrina. Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 µM) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos da aorta torácica de Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (D) e SHR Grupos Hg (E) com L-NAME e os respectivos grupos sem intervenção. Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta (dAAC) de anéis de aorta na presença e

ausência de L-NAME para os grupos Wistar (C) e SHR (F). O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. Os resultados (média ± EPM) da resposta da fenilefrina são expressos em percentagem da contração induzida por 75 mMKCI. Two-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 - Wistar Ct vs L-NAME, Wistar Hg vs L-NAME; SHR Ct vs L-NAME e SHR Hg vs L-NAME.

Também avaliamos a variação percentual da produção de NO pela magnitude do efeito do L-NAME através da %dAAC comparando entre os grupos Wistar e SHR. Assim, encontramos maior magnitude no grupo SHR quando comparado ao Wistar, tanto no controle quanto após exposição ao mercúrio. Isso sugere que os SHRs apresentam maior biodisponilidade de NO em resposta à fenilefrina (Figura 13A e B).



Figura 13. Variação percentual da produção de NO entre os grupos Controle e expostos ao mercúrio, na ausência e presença do L-NAME. Diferença na área abaixo das curvas concentraçãoresposta (dAAC) na presença e ausência de L-NAME para os grupos: (A) Wistar Ct vs SHR Ct; (B) Wistar Hg vs SHR Hg. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses. Teste t não pareado. * P <0,05. * SHR Ct + L-NAME vs Wistar Ct + L-NAME; SHR Hg + L-NAME vs Wistar Hg + L-NAME.

4.4.4 PARTICIPAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NAS RESPOSTAS VASCULARES

Para esclarecer o que estava influenciando o aumento da reatividade vascular no grupo SHR Hg, o envolvimento dos radicais livres foi investigado. Para determinar se a exposição ao mercúrio aumentou o estresse oxidativo pelo aumento da participação da NADPH oxidase, o anel aórtico isolado de cada grupo foi incubado com apocinina (30 µM). A apocinina reduziu as respostas à fenilefrina apenas nos segmentos aórticos de SHR expostos ao mercúrio, sem alterar essa resposta nos outros grupos (Figura 14). A fluorescência emitida pelo DHE foi maior em aorta isolada

de animais SHR expostos ao mercúrio, sugerindo maior liberação de ânion superóxido (Figura 14 E).

Para uma investigação mais detalhada do papel do estresse oxidativo local sobre as alterações presentes em aortas de animais expostos ao mercúrio, foi realizado estudo de expressão/conteúdo proteico de uma enzima antioxidante, a SOD. O conteúdo dessa proteína foi determinado através da análise por western blotting. Como evidenciado na Figura 14 F, houve redução significativa do conteúdo proteico da SOD no SHR Ct quando comparado ao Wistar Ct, sugerindo que a pré-hipertensão modifica a expressão/conteúdo proteico da SOD entre os grupos SHR Ct e SHR Hg, assim a exposição ao mercúrio não teve interferência na expressão/conteúdo da SOD. Porém, no grupo Wistar exposto ao mercúrio houve redução significativa quando comparado ao seu respectivo grupo controle, sugere-se que a exposição ao mercúrio altera a expressão/conteúdo protéico da SOD em ratos normotensos jovens.



Figura 14 . Efeitos da exposição crônica ao mercúrio na modulação de EROs na reatividade vascular à fenilefrina. Efeito do inibidor da NADPH oxidase Apocinina (30 μ M) sobre a curva

concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (C) e SHR Hg (D) com Apocinina e os respectivos grupos sem intervenção. Em E, produção vascular de ânion superóxido e (F) análise densitométrica do Western blot para expressão da proteína superóxido dismutase (SOD) na aorta de ratos controle e expostos ao mercúrio de grupos Wistar e SHR. Os blots representativos também são mostrados. Número de animais utilizados é indicado entre parênteses. Os resultados (média ± EPM) da resposta à fenilefrina são expressos em porcentagem da contração induzida por 75 mM KCI. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 - vs SHR Hg. **P <0,05 pelo teste t de Student - vs SHR Ct e #P <0,05 - vs Wistar Ct

Com o propósito de avaliar se a exposição ao cloreto de mercúrio estaria influenciando a produção de H₂O₂ e assim estaria contribuindo, ainda mais, para o aumento do estresse oxidativo, e consequentemente no aumento da resposta vascular à fenilefrina nos animais SHR Hg, investigamos a participação do H₂O₂ na resposta contrátil à fenilefrina em anéis aórticos isolados de todos os grupos através da incubação com o "varredor" de peróxido de hidrogênio, Catalase (1000 U / mL). Observou-se que a catalase não alterou a resposta vascular à fenilefrina em nenhum grupo, sugerindo que o H₂O₂ não está envolvido no aumento da reatividade vascular em resposta à exposição ao mercúrio em aorta isolada de SHR (Figura 15).



Figura 15. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio sobre a liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na reatividade vascular à fenilefrina. Efeito da catalase (1000 U/ml), "varredor" do peróxido de hidrogênio sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (C) e SHR Hg (D) com catalase e os respectivos grupos sem intervenção. Os resultados (média ± EPM) da resposta à fenilefrina são expressos em porcentagem da contração induzida por 75 mM KCI. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * P >0,05.

4.4.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE MERCÚRIO NA VIA DA CICLOOXIGENASE (COX)

Considerando que os compostos derivados da COX são capazes de aumentar a reatividade vascular, e além disso, há aumento desses prostanoides tanto na exposição ao mercúrio quanto em situações inflamatórias, como na hipertensão, investigamos o papel dos prostanóides na resposta exacerbada à fenilefrina induzida pelo mercúrio. Os anéis aórticos foram incubados com o inibidor não-seletivo da ciclooxigenase, a indometacina (10 µM). A incubação com indometacina aumentou de forma similar as respostas vasoconstritoras à fenilefrina nos anéis aórticos de ratos Wistar controle e expostos ao mercúrio (Figura 16A e B), sugerindo a liberação de um vasodilatador derivado da via da COX. No entanto, nos anéis aórticos de SHR expostos ao mercúrio, a indometacina reduziu a resposta à fenilefrina, sugerindo a liberação de LBM expostos ao mercúrio rinduzido por essa exposição ao metal (Figura 16D e E).



Figura 16. Papel da via da COX na reatividade vascular em aorta após exposição crônica ao mercúrio. Efeito do inibidor não-seletivo da COX, indometacina (10 μ M) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos da aorta torácica de Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (D), SHR Hg (E) grupos com indometacina e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados foi indicado entre parênteses. Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta (dAAC) de anéis de aorta na presença e ausência de Indometacina para os Grupos Wistar (C). Teste *t*-Student. Os resultados (média \pm EPM) da resposta à fenilefrina são expressos em percentagem da contração induzida por 75 mM KCI. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 - vs Wistar Ct, Wistar Hg, SHR Ct e SHR Hg.

Para esclarecer se havia o envolvimento da COX-2 em tais efeitos da exposição ao mercúrio, os anéis foram incubados com o inibidor da COX-2, o Celecoxibe (1 mM). O celecoxibe reduziu as respostas vasoconstritoras à fenilefrina nos anéis aórticos dos SHRs (Figura 17C e D), sem modificar essa resposta no grupo Wistar (Figura 17A e B). No entanto, a magnitude desse efeito foi maior nos SHRs expostos ao mercúrio, conforme indicado pela dAAC (Figura 17E). Confirmando tais resultados, a análise de Western Blot indicou uma expressão aumentada de proteína da COX-2 em anéis aórticos de SHRs expostos ao mercúrio comparado ao SHR Ct. Entretanto, não houve alteração de tal expressão proteica entre os grupos Wistar Ct e Wistar Hg (Figura 17 F).



Figura 17. Envolvimento da COX-2 na reatividade vascular após exposição crônica ao mercúrio. Efeito do inibidor específico da COX-2, o Celecoxibe (1 mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica nos grupos Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (C), SHR Hg (D) com celecoxibe e os respectivos grupos sem intervenção. Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta (dAAC) de anéis de aorta na presença e ausência de celecoxibe para os Grupos SHR Hg (E). O conteúdo proteico de COX-2 (F) foi analisado por Western blotting em homogenatos de aorta e normalizados pelo conteúdo de α -actina. Número de animais utilizados foi indicado entre parênteses. Os resultados (média ± EPM) da resposta à fenilefrina são expressos em percentagem da contração induzida por 75 mM KCI. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 - vs SHR Ct. #P <0,05 - vs SHR Ct pelo teste t de Student.

De modo a identificar qual o prostanoide vasoconstritor derivado da COX-2 estava envolvido na redução das respostas à fenilefrina nos grupos SHR, os anéis aórticos foram incubados com o SQ 29,548, antagonista do receptor de tromboxano

A₂ (TP) e o SC 19220, antagonista do receptor de prostaglandina E2 (EP1). O SQ 29,548 reduziu de forma semelhante as respostas à fenilefrina nos dois grupos SHR (Figura 18C, D e E), sem modificar a resposta à fenilefrina nos grupos Wistar (Figura 18A e B).



Figura 18. Papel do receptor TP (TXA₂) na reatividade vascular da aorta após exposição crônica ao mercúrio. Efeito do SQ 29,548 (1 μM), antagonista do receptor TXA₂, sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica nos grupos Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (C), SHR Hg (D) com SQ 29,548 e os respectivos grupos sem intervenção. Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta (dAAC) de anéis de aorta na presença e ausência de SQ 29,548 para o grupo SHR Hg (E). Teste t de Student. Número de animais utilizados indicado entre parênteses. Os resultados (média ± EPM) da resposta à fenilefrina são expressos em percentagem da contração induzida por 75 mM KCI. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 -

vs SHR Ct e SHR Hg. Diferenças na área abaixo das curvas concentração-resposta (dAAC) em segmentos com e sem intervenção.

A incubação com o SC 19220 reduziu as respostas vasoconstritoras à fenilefrina somente nos anéis aórticos de SHR expostos ao metal (Figura 19 D) e não modificou as respostas nos grupos Wistar (Figura 19A e B).



Figura 19. Papel do receptor EP1 na reatividade vascular da aorta após exposição crônica ao mercúrio. Efeito do antagonista do receptor EP1, SC 19220 (10 μM), na curva concentração-resposta para fenilefrina em segmentos da aorta torácica de Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (C) e SHR Hg (D) grupos com SC 19220 e os respectivos grupos sem intervenção.Os resultados (média ± EPM) da resposta à fenilefrina são expressos em percentagem da contração induzida por 75 mM KCI. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 - vs SHR Hg.

Outro prostanoide derivado da COX é a prostaciclina (PGI₂) que, em doenças cardiovasculares, como na hipertensão, pode atuar em receptores TXA₂ e de prostaglandinas promovendo vasoconstrição (GLUAIS et al., 2005; LIU et al., 2015). Para averiguar se havia o envolvimento do prostanoide prostaciclina influenciando as respostas à fenilefrina, os anéis aórticos de todos os grupos foram incubados com

CAY 10441 (100 nM), um antagonista do receptor da IP (PGI₂). A incubação com o CAY 10441 aumentou a resposta vascular à fenilefrina em anéis de ratos Wistar e SHR não expostos ao mercúrio (Figura 20A e C), sugerindo que a PGI₂ está atuando como vasodilatador nos ratos Wistar e SHR controle, mas nos ratos Wistar e SHR expostos ao mercúrio essa resposta foi abolida (Figura 20B e D).



Figura 20. Papel do receptor IP (PGI₂) na reatividade vascular após exposição crônica ao mercúrio. Efeito do antagonista do receptor IP (PGI₂), CAY 10441 (100 nM) na curva concentraçãoresposta à fenilefrina em segmentos da aorta torácica dos grupos Wistar Ct (A), Wistar Hg (B), SHR Ct (C) e SHR Hg (D) com CAY 10441 e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados está indicado entre parênteses. Os resultados (média ± EPM) da resposta à fenilefrina foram expressos como uma porcentagem da contração induzida por 75 Mm de KCI. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * P <0,05 - vs Wistar Ct e SHR Ct.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo demonstraram que a exposição crônica ao mercúrio acelera o desenvolvimento da hipertensão em SHR jovens, mas não modifica a pressão arterial em ratos normotensos jovens. A exposição ao mercúrio aumentou a reatividade vascular à fenilefrina na aorta de SHRs através do aumento do estresse oxidativo associado à redução da participação de enzimas antioxidantes, aumento da liberação de prostanoides vasoconstritores derivados da via da COX-2 e modulação da vasoconstrição reduzida exercida pelos receptores IP. Além disso, o efeito do NO foi superado pelo efeito dos fatores_vasoconstritores. No grupo Wistar, a exposição ao mercúrio não alterou a produção de ânion superóxido e a via COX-2. O grupo Wistar Ct mostrou aumento da participação dos receptores IP, mas este efeito foi abolido na presença de mercúrio.

A exposição ao mercúrio já é reconhecida por produzir conseqüências toxicológicas na população humana (CASTRO-GONZÁLEZ; MÉNDEZ-ARMENTA, 2008; DRISCOLL et al., 2013; KIM; KABIR; JAHAN, 2016). Tais consequências se devem ao aumento da concentração de mercúrio no meio ambiente nas últimas décadas, em decorrência da industrialização e urbanização (BASTAMI et al., 2014; BOSCH et al., 2016; PIAZZOLLA et al., 2015). O desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) como aterosclerose, hipertensão, doença arterial coronariana e infarto do miocárdio está associado à exposição crônica a metais pesados, incluindo o mercúrio (HOUSTON, 2007; SALONEN et al., 1995; WAKITA, 1987). O endotélio vascular é afetado por concentrações baixas e altas de mercúrio (VASSALLO et al., 2011), resultando em disfunção endotelial e disfunção do músculo liso vascular (KISHIMOTO et al., 1995; DA CUNHA et al., 2000; WIGGERS et al., 2008b; PECANHA et al., 2010; FURIERI et al., 2011; AZEVEDO et al., 2016).

No presente estudo, utilizamos um modelo experimental de exposição controlada ao mercúrio, conforme descrito anteriormente por Wiggers et al., (2008b). Este modelo experimental de exposição crônica controlada leva a uma concentração sanguínea de mercúrio de 8 ng / mL. Essa concentração é próxima aos níveis encontrados em humanos expostos ao mercúrio (7 – 10 ng/ mL) e está ligeiramente acima da concentração estabelecida como limite seguro pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (5,8 ng/ mL) (USEPA, 1998). Para o Brasil, a Organização

Mundial de Saúde considera como limites seguros a concentração sanguínea média de 5 a 10 ng/mL (WHO; UNEP, 2008).

Foi demonstrado por nosso grupo de estudo, que a exposição crônica ao mercúrio induz disfunção endotelial nas artérias aorta, mesentérica, basilar e coronariana de ratos adultos normotensos enquanto a pressão arterial permaneceu inalterada (FURIERI et al., 2011; IBARRA et al., 2006; PECANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2013; WIGGERS et al., 2008a, 2016). No entanto, não se sabe se os animais pré-dispostos à hipertensão seriam mais suscetíveis aos efeitos da exposição crônica ao mercúrio em comparação aos animais normotensos jovens. Portanto, no presente estudo, utilizamos a mesma exposição ao mercúrio realizada por Wiggers et al., (2008b) para avaliar o efeito da exposição ao mercúrio por 30 dias sobre a pressão arterial de ratos jovens SHR e Wistar.

O ganho de massa ao decorrer das semanas foi semelhante entre os grupos normotensos, corroborando com estudo feito por Wiggers et al., (2008b), no qual ratos normotensos adultos após exposição crônica ao mercúrio (semelhante a utilizada neste trabalho) não apresentaram alteração no ganho de massa corporal. Ao comparar Wistar com o modelo experimental SHR, o ganho de massa do Wistar foi muito maior. Isso pode ser atribuído, segundo Kristek e Gerova (2004), às progenitoras desses animais que, por serem hipertensas, comprometeram o suprimento de sangue para o feto.

Utilizamos animais com 4 semanas de idade, com base em estudos anteriores, que demonstraram que SHRs desenvolvem aumento de pressão arterial entre a 5^a -7^a semanas de idade (LEE, 1985; PUZSEROVA et al., 2014) e a hipertensão já pode ser considerada instalada após a oitava semana de idade (YAMORI, 1994; DICKHOUT; LEE, 1998). Como demonstrado em nossos resultados, não observamos alterações na pressão arterial de ratos normotensos após exposição crônica ao mercúrio, o mesmo foi observado por Azevedo et al., (2012) e Wiggers et al., (2008) em ratos normotensos adultos. No entanto, demonstramos que na primeira semana de exposição, o mercúrio acelerou o desenvolvimento da hipertensão em SHR jovens, sugerindo que após exposição crônica a essas doses de mercúrio esses animais seriam mais suscetíveis a um aumento da pressão arterial em comparação a animais normotensos. Nosso resultado sugere que a exposição ao mercúrio pode alterar a história natural da hipertensão em ratos pré-hipertensos. No entanto, em SHRs adultos esses achados não foram observados, como demonstrado por Vassallo

et al., (2018) que acompanharam a evolução da PAS em SHRs adultos expostos à mesma concentração de HgCl₂ utilizada em nosso estudo e, após 30 dias, não observaram diferença na PAS entre os grupos.

Apesar de nossos resultados mostrarem que a exposição ao mercúrio acelera a hipertensão nos SHRs, nenhuma alteração na relação massa do VE / comprimento da tíbia foi observada nos grupos SHR ou Wistar, sugerindo que não houve hipertrofia cardíaca após exposição ao mercúrio. Achados semelhantes foram observados por Furieri et al., (2011) em ratos adultos normotensos após semelhante exposição crônica ao mercúrio. Uma vez que a exposição ao mercúrio tenha acelerado o desenvolvimento da hipertensão em SHR jovens, também poderia acelerar a disfunção vascular?

Tem sido demonstrado que nos estágios pré-hipertenso e hipertenso precoce em SHR que a reatividade vascular a agentes constritores é preservada ou mesmo diminuída (IBARRA et al., 2006; CACANYIOVA et al., 2016). Da mesma forma, a vasodilatação dependente ou independente do endotélio é preservada ou aumentada em SHR jovens (RADAELLI et al., 1998; TÖRÖK et al., 1998; PUZSEROVA et al., 2014). Nossos achados mostraram que após a exposição ao mercúrio, a resposta induzida pela fenilefrina foi aumentada apenas no grupo SHR, sugerindo uma possível aceleração da disfunção vascular nestes animais. A resposta à acetilcolina ou ao nitroprussiato de sódio não foi diferente entre os grupos, mostrando que os relaxamentos dependente e independente do endotélio estão preservados. Curiosamente, a exposição ao mercúrio não modificou a reatividade vascular na aorta de ratos Wistar jovens, ao contrário do que foi observado em ratos adultos (FARIA et al., 2018; FURIERI et al., 2011; IBARRA et al., 2006; PECANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2013; WIGGERS et al., 2008a, 2016). A idade é um fator de risco altamente preditivo para futuras DCV (LAKATTA; LEVY, 2003; NAJJAR; SCUTERI; LAKATTA, 2005). O envelhecimento vascular causa alterações nas células do músculo liso, na função e estrutura do endotélio, e também nas vias de comunicação entre essas duas camadas que formam a parede vascular (EL ASSAR; ANGULO; RODRÍGUEZ-MAÑAS, 2013). Além disso, a idade prejudica a vasodilatação endotelial que é uma manifestação clínica da disfunção vascular (SEALS et al., 2006). Assim, sugere-se que a idade dos animais normotensos possa interferir nos efeitos vasculares induzidos pelo mercúrio.

Estudos anteriores utilizando anéis aórticos de ratos adultos normotensos demonstraram que a exposição ao mercúrio (30 dias) diminuiu a biodisponibilidade do óxido nítrico (AZEVEDO et al., 2016; FURIERI et al., 2011; PECANHA et al., 2010; WIGGERS et al., 2008a, 2008b). Baseado nesses achados, avaliamos se a exposição ao mercúrio altera a modulação do óxido nítrico nas respostas à fenilefrina, especialmente em SHRs. A incubação com L-NAME aumentou as respostas à fenilefrina em todos os grupos, porém a exposição ao mercúrio não alterou a modulação do óxido nítrico quando comparado ao seus respectivos grupos controle. No entando, ao comparar os controles pré-hipertensos e normotensos jovens, evidenciamos aumento do óxido nítrico no SHR (controle e exposto ao mercúrio) pela maior variação percentual da modulação de NO quando comparado ao grupo Wistar, sugerindo maior produção desse vasodilatador (Figura 13). Esse aumento na produção de óxido nítrico pode estar relacionado a um processo adaptativo causado pela hipertensão, apoiando o conceito de aumento da produção do NO no início do estado hipertensivo (ARRIBAS et al., 2008; CACANYIOVA et al., 2016; TÖRÖK et al., 2006). Mas é importante enfatizar que ela não foi modificada pela exposição ao mercúrio.

Está estabelecido que a toxicidade do mercúrio é associada a um aumento do estresse oxidativo com danos oxidativos subsequentes em vários órgãos e sistemas (AZEVEDO et al., 2016; FURIERI et al., 2011; ITO; TORII; SUZUKI, 1995; PECANHA et al., 2010; WIGGERS et al., 2008a, 2016, 2008b). Em ratos Wistar adultos a exposição ao mercúrio aumenta a produção vascular de O2•- pelo aumento da atividade da NADPH oxidase (AZEVEDO et al., 2016; RIZZETTI et al., 2013, 2017), os níveis plasmáticos de malondialdeído e o status antioxidante total (WIGGERS et al., 2008b). Além disso, estudos anteriores demonstraram que a expressão e a atividade da NADPH oxidase estão aumentadas na hipertensão (BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2010; DRUMMOND et al., 2011b; TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). Sendo a NADPH oxidase uma importante fonte de EROs na vasculatura, e o ânion superóxido a principal espécie reativa de oxigênio a causar danos teciduais (BRIONES; TOUYZ, 2010; DRUMMOND et al., 2011a), investigamos o papel da NADPH oxidase sobre a hiper-reatividade à fenilefrina identificada no grupo SHR Hg. Para isso, incubamos anéis de aorta com apocinina. A apocinina reduziu significativamente a resposta contrátil dos anéis no grupo SHR exposto ao mercúrio, porém não houve alteração entre os grupos Wistar, sugerindo a ativação precoce desta via pelo mercúrio em SHR jovens, e a participação de ânion superóxido na hiperreatividade vascular apenas no SHR Hg. Desta forma, o aumento do estresse oxidativo poderia ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da reatividade vascular no grupo SHR Hg, mesmo na ausência de alteração na liberação de NO em reposta à fenilefrina.

Para confirmar esse dado funcional nas aortas, foi realizada uma avaliação *in situ* com DHE, observando aumento significativo da fluorescência no grupo SHR Hg. Avaliamos também, nas aortas dos animais, o conteúdo proteico da SOD-1, através da análise por Western Blotting. Foi demonstrado nos animais normotensos, que a exposição ao mercúrio reduziu a expressão da SOD-1 quando comparado ao grupo Wistar Ct, embora não tenha sido observado aumento concomitante de ânion superóxido através da fluorescência DHE. Já os grupos SHR Ct e SHR Hg não apresentaram diferença na expressão da SOD-1, porém, quando comparado ao Wistar Ct, apresentam uma expressão reduzida. Um estudo anterior observou que animais SHR apresentam uma fração citosólica significativamente menor da atividade da SOD em comparação com WKY (ITO; TORII; SUZUKI, 1995). E em outros estudos foi demonstrado que indivíduos hipertensos apresentam diminuição da SOD em relação a pessoas normotensas (KUMAR; DAS, 1993; PAWLUK et al., 2017; PEDRO-BOTET et al., 2000), o que poderia justificar o resultado encontrado.

Assim, em nosso estudo, uma redução nas defesas antioxidantes também contribuiria para o aumento do estresse oxidativo observado após o tratamento com mercúrio, especialmente em SHR jovens, contribuindo para a hiper-reatividade vascular à fenilefrina, como visto em nossos resultados. Contrariamente ao que observamos em animais normotensos jovens, Wiggers et al. (2008b) observaram um aumento da expressão da proteína SOD-3 plasmática e aórtica em ratos Wistar adultos após a exposição ao mercúrio e Rizzetti et al. (2017) também demostraram aumento da capacidade antioxidante após administração de cloreto de mercúrio por 30 e 60 dias em Wistar adultos. Portanto, a idade dos animais e a duração da exposição ao mercúrio parecem interferir na modulação do sistema antioxidante.

Alguns estudos têm demonstrado que o peróxido de hidrogênio pode desencadear alterações no vaso como relaxamento (BARLOW; EL-MOWAFY; WHITE, 2017; FÉLÉTOU, 2009; IESAKI et al., 2017) ou contração (PARK et al., 2019; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1998; SILVA et al., 2017), dependendo do sítio de ligação, concentração, tipo de vaso e protocolos experimentais utilizados

(RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1998; CSEKO, 2004; CAI, 2005a, 2005b; THAKALI et al., 2006). Segundo Silva et al., (2017), em ratos hipertensos pode ocorrer uma maior produção de H₂O₂ que pode aumentar a vasoconstrição induzida pela COX em vez do relaxamento induzido pela eNOS e, assim, contribuir para agravar a hipertensão. Além disso, o peróxido de hidrogênio pode ser formado diretamente pela enzima NADPH oxidase ou através da dismutação do ânion superóxido (DRUMMOND et al., 2011). Então, avaliamos a participação do peróxido de hidrogênio na reatividade vascular com a incubação da Catalase nos anéis de aorta. Entretanto, não foi observada alteração da resposta vascular em nenhum dos grupos, sugerindo que o peróxido de hidrogênio não apresenta grande participação na modulação das respostas contráteis à fenilefrina nos anéis aórticos de animais jovens apesar da maior ativação da NADPH oxidase e do aumento da produção de ânion superóxido.

Além do aumento do estresse oxidativo, os prostanoides vasoconstritores derivados da COX também poderiam promover hiper-reatividade vascular e disfunção endotelial em anéis aórticos de SHRs jovens após a exposição ao mercúrio. Estudos anteriores demonstraram o aumento de prostanoides vasoconstritores derivados da COX após exposição ao mercúrio em artérias de Wistar adultos (DA CUNHA et al., 2000; PECANHA et al., 2010; AZEVEDO et al., 2016; RIZZETTI et al., 2017). Porém, são escassos esses estudos em SHR.

Portanto, para averiguar os efeitos da exposição ao mercúrio na via da COX de ratos normotensos e hipertensos jovens, os anéis foram incubados com indometacina, um inibidor não-seletivo da COX. Vale ressaltar que, em ratos Wistar, a indometacina aumentou de maneira semelhante a reatividade vascular tanto nos anéis provenientes de ratos tratados com mercúrio quanto dos controles, sugerindo que em Wistar jovens os prostanoides vasodilatadores modulam a contração induzida pela fenilefrina. No entanto, nos SHR jovens não expostos, a indometacina não produziu alterações na resposta à fenilefrina, mas houve redução da reatividade nos segmentos vasculares dos SHR após exposição ao mercúrio. Este resultado sugere que a exposição ao mercúrio induz a liberação de prostanoides vasoconstritores derivados da via da COX.

Já foi demonstrado por trabalhos anteriores que a exposição a metais, como o cloreto de mercúrio, pode influenciar a liberação de prostanoides vasoconstritores derivados da isoforma COX-2 (PECANHA et al., 2010; FURIERI et al., 2011; RIZZETTI et al., 2017). Dessa forma, buscando verificar se havia contribuição da isoforma COX- 2 para o aumento da reatividade vascular encontrado nos animais estudados utilizamos o Celecoxibe, um inibidor específico da COX-2. Como observado, os resultados não mostraram alteração da resposta contrátil à fenilefrina nos grupos Wistar, sugerindo que a exposição ao mercúrio não afetou a função da COX-2 nesses animais jovens. Em contraste, um estudo realizado por Peçanha et al., (2010) em Wistar adultos expostos à mesma concentração de mercúrio utilizada em nosso trabalho, demonstrou participação da COX-2 no aumento da reatividade vascular após a incubação com um inibidor específico. Entretanto, no presente estudo, nos grupos SHR Ct e Hg, após a incubação com celecoxibe, notou-se uma redução da resposta à fenilefrina, sugerindo que há presença de estímulos inflamatórios nesses animais pré-dispostos à hipertensão arterial, porém, no grupo exposto ao mercúrio, a redução da curva-resposta à fenilefrina foi significativamente maior, sugerindo que o mercúrio tem influência no aumento da liberação de prostanoides vasoconstritores derivados da COX-2 nos animais pré-hipertensos. Corroborando este achado, encontramos aumento da expressão da proteína COX-2 em SHR expostos ao mercúrio, através do método de Western Blotting.

Alguns autores têm observado em modelos experimentais de hipertensão uma maior expressão da COX-2 e participação dos prostanoides vasoconstritores derivados da COX-2 na resposta á fenilefrina (ADEAGBO et al., 2005; ANTMAN; DEMETS; LOSCALZO, 2005; TOMIDA et al., 2003; ALVAREZ et al., 2005, 2007; TIAN et al., 2012; MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; VIRDIS et al., 2013). Também há relatos do aumento da expressão vascular de COX-2 em situações patológicas associadas a hipertensão (ADEAGBO et al., 2005; ALVAREZ et al., 2005; ANTMAN; DEMETS; LOSCALZO, 2005). De fato, isso é verdadeiro quando se analisa a resposta do celecoxibe nos animais Wistar Ct (que não apresentaram alteração da curva- resposta á fenilefrina), embora quando comparado a expressão da COX-2 entre Wistar Ct e SHR Ct não houve diferença significativa. Diante desses resultados, podemos sugerir que nos grupos Wistar Ct e exposto ao mercúrio, o aumento da resposta contrátil à fenilefrina após a incubação com a Indometacina foi ocasionado pela isoforma COX-1, pois a incubação com Celecoxibe não alterou a resposta contrátil à fenilefrina.

Diante das evidências da presença dos prostanoides derivados da COX-2 na resposta contrátil a fenilefrina em anéis de aorta dos SHR expostos ao mercúrio, investigamos se estes prostanoides agiam ao ativarem os receptores TP ou EP₁.

Assim os experimentos de reatividade vascular foram realizados com incubações com o SQ 29,548, antagonista do receptor TP e o SC 19220, um antagonista do receptor EP1. Como observado em nossos resultados, podemos sugerir que a exposição ao mercúrio não alterou a modulação da contração à fenilefrina mediada pelos receptores TP ou EP1 em ratos normotensos jovens, que poderiam ser resultado de ativação por prostanoides provenientes da COX-1 ou 2. Entretanto, em ratos normotensos adultos, os mecanismos envolvidos na alteração vascular promovida pelo mercúrio abrangem a participação da PGE₂ e TXA₂ (PECANHA et al., 2010). Nos animais SHR a incubação com o SC 19220 não alterou as respostas vasculares no grupo SHR Ct, entretanto, a exposição ao mercúrio reduziu a resposta à fenilefrina no SHR, sugerindo maior participação da via do PGE2. Já a incubação com o SQ 29,548, reduziu a resposta contrátil à fenilefrina tanto no grupo controle quanto no exposto ao mercúrio, porém não houve diferença significativa entre os grupos, como observado na dAAC, sugerindo que o receptor TP não participa do aumento da reatividade observada no grupo SHR Hg. Estudos mostram o envolvimento dos prostanoides vasoconstritores com o aumento da reatividade vascular, pressão arterial e disfunção endotelial em modelos animais de hipertensão (ADEAGBO et al., 2005; ALVAREZ et al., 2007; MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; VIRDIS et al., 2013).

Avaliamos também a via da prostaciclina, um prostanóide que pode atuar como vasodilatador ou vasoconstritor, dependendo da sua concentração (XAVIER et al., 2004). Investigamos se o CAY 10441, um antagonista do receptor IP da prostaciclina, altera a reatividade à fenilefrina na aorta de ratos jovens normotensos e hipertensos, expostos ou não ao mercúrio. A incubação com o CAY 10441 aumentou a reatividade vascular nos anéis aorticos dos grupos SHR Ct e Wistar Ct, portanto, podemos sugerir que os receptores IP modulam negativamente as respostas contráteis à fenilefrina nos grupos controle. Esses achados estão de acordo com Virdis et al., (2007) que mostraram, sob condições fisiológicas, que a atividade da COX-1 parece estar envolvida na produção de PGI2 que possui efeitos vasodilatadores. Nossos achados no grupo SHR controle pré-hipertensos corroboram com Liu et al., (2015), que observaram que pode ocorrer o aumento da síntese de PGI2 endotelial na hipertensão ou pré-hipertensão. No entanto, os anéis dos animais expostos ao mercúrio, após a incubação do CAY 10441, não apresentaram alteração na reatividade vascular, ou seja, o mercúrio aboliu a ação do receptor IP sobre a resposta à fenilefrina.

Juntos, nossos resultados sugerem que o SHR jovem tem uma atividade aumentada da via da COX-2 e a exposição ao mercúrio estimula ainda mais essa via, promovendo maior ativação da via do receptor EP₁ (PGE₂), como sugerido na Figura 19 D. Avendaño et al., (2016), propôs que a PGE₂ derivada da COX-2 ao agir através dos receptores EP₁ é uma via importante na modulação do dano vascular associado à hipertensão por aumentar a rigidez vascular e deposição de matriz extracelular no vaso, induzir o aumento de respostas vasoconstritoras, disfunção endotelial e inflamação vascular.

6. CONCLUSÃO

Nossos achados demonstraram, pela primeira vez, que a exposição mercúrio acelerou o desenvolvimento de hipertensão em SHR pré-hipertensos, mas não em ratos Wistar jovens. Além disso, a exposição ao mercúrio produziu um efeito importante no aumento da reatividade aórtica dos SHRs, aumentando o estresse oxidativo associado à redução da participação de enzimas antioxidantes, ativação da via COX-2, aumento da modulação das respostas vasculares pelos receptores EP1 e redução da participação de agentes vasodilatadores, como a prostaciclina. Ressaltamos que a modulação do NO sobre a constrição induzida pela fenilefrina foi maior no SHR, embora não tenha sido afetada pela exposição ao mercúrio induz disfunção endotelial e aceleraram o desenvolvimento da hipertensão em SHR jovens. Esses achados fornecem evidências de que a exposição ao mercúrio é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, aumentando o desenvolvimento de hipertensão em indivíduos pré-hipertensos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, J. J.; SALAMA, G. Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 21, n. 2, p. 283–294, 1989.

ADAMS, H. . Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **J Am Med Assoc**, v. 209, p. 1297–302, 1996.

ADEAGBO, A. S. O. et al. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 5, p. 1025–1036, 2005.

AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (Rosmarinus officinalis L.). **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 35, n. 1, p. 129–148, 2010.

AHAMMAD-SAHIB, K. I. Isoproterenol potentiation of methyl mercury effects in vivo on cardiac ATPases and 3H-dopamine uptake. **Bull Environ Contam Toxicol.**, v. 40, n. 2, p. 249–254, 1988.

ALEXANDER, M. Y. et al. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves nitric oxide dependent endothelial function in a hypertensive rat model. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 798–807, 1999.

ALMENARA, C. C. P. et al. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013.

ALVAREZ, Y. et al. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 4, p. 767–777, 2005.

ALVAREZ, Y. et al. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 321, n. 1, p. 381–388, 2007.

ANTMAN, E. M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation.**, v. 112, p. 759–70, 2005a.

ANTMAN, E. M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**, v. 112, p. 759–770, 2005b.

AOKI, T.; OBA, T., HOTTA, K. Hg2+-induced contracture in mechanically fibers of frog skeletal muscle. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 63, n. 9, p. 1070–1074, 1985.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB J**, v. 7, p. 349– 60, 1993.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (ATSDR). Toxicological profile for mercury. Atlanta, U. S. Public Health Service. Anais...1989

AVENDAÑO, M. S. et al. Role of COX-2-derived PGE2on vascular stiffness and function in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 9, p. 1541–1555, 2016.

AZEVEDO, B. F. et al. Chronic mercury exposure at different concentrations produces opposed vascular responses in rat aorta. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 7, p. 712–719, 2016.

AZEVEDO, F. A. DE. Toxicologia do Mercúrio. São Carlos: RiMa: [s.n.].

BAKIR, F., DAMLUJI, S. F., AMIN-ZAKI, L., MURTADHA, M., KHALIDI, A., AL-RAWI, N. Y., TIKRITI, S., DHAHIR, H. I., CLARKSON, T. W., SMITH, J. C., AND DOHERTY, R. A. Methyl mercury poisoning in Iraq. **An interuniversity report. Science**, v. 181, p. 230–241, 1973.

BAKRIS, G. L.; MENSAH, G. A. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. **Cardiol Clin**, v. 20, n. 2, p. 195–206, 2002.

BAO, W. et al. Hipertensão essencial prevista pelo rastreamento da pressão arterial elevada desde a infância até a idade adulta: o estudo do coração da bogalusa. **Am J Hypertens**, v. 8, p. 657–665, 1995.

BARLOW, R. S.; EL-MOWAFY, A. M.; WHITE, R. E. H 2 O 2 opens BK Ca channels via the PLA 2 -arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle . **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 2, p. H475–H483, 2017.

BASTAMI, K. D. et al. Distribution and ecological risk assessment of heavy metals in

surface sediments along southeast coast of the Caspian Sea. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 81, n. 1, p. 262–267, 2014.

BASTOS, W. R. et al. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 368, n. 1, p. 344–351, 2005.

BASU, N. et al. Cholinesterase and monoamine oxidase activity in relation to mercury levels in the cerebral cortex of wild river otters. **Human and Experimental Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 213–220, 2007.

BERENSON, G. S. et al. Epidemiologia da hipertensão primária precoce e implicações para a prevenção: o estudo do coração da bogalusa. **J Hum Hypertens**, v. 8, p. 303–311, 1994.

BESWICK, R. A. et al. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p. 1107–11, 2001.

BIAN, K.; DOURSOUT, M. F.; MURAD, F. Vascular system: Role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 10, n. 4, p. 304–310, 2008.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123–30, 1999.

BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. **Nature**, v. 368, p. 850–853, 1994.

BOSCH, A. C. et al. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 32–48, 2016.

BRANCO, V. et al. Mercury and selenium in blue shark (Prionace glauca, L. 1758) and swordfish (Xiphias gladius, L. 1758) from two areas of the Atlantic Ocean. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 3, p. 373–380, 2007.

BRANDÃO, R. et al. Diphenyl diselenide protects against hematological and immunological alterations induced by mercury in mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 22, n. 5, p. 311–319, 2008.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. NADPH oxidases in
cardiovascular disease. Free Radical Biology and Medicine, v. 49, n. 5, p. 687–706, 2010.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. The Aging Kidney and the Nephrotoxic Effects of Mercury Christy. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev.**, v. 20, n. 2, p. 55–80, 2017.

BRIDGES, C.; ZALUPS, R. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev.**, v. 13, n. 5, p. 385–410, 2010.

BRIONES, A. M. et al. Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 1, p. 111–120, 1999.

BRIONES, A. M.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress and hypertension: Current concepts. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 2, p. 135–142, 2010.

CACANYIOVA, S. et al. The adaptive role of nitric oxide and hydrogen Sulphide in vasoactive responses of thoracic aorta is triggered already in young spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 501–512, 2016.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research**, v. 68, n. 1, p. 26–36, 2005a.

CAI, H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. **Circulation Research**, v. 96, n. 8, p. 818–822, 2005b.

CAI, H.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 9, p. 471–478, 2003.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 2000.

CANNON III, R. O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1809–1819, 1998.

CARMIGNANI, M., BOSCOLO, P., ARTESE, L., DEL ROSSO, G., PORCELLI, G., FELACO, M., VOLPE, A.R., GIULIANO, G. et al. Renal mechanisms in the

cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 49, p. 226–232, 1992.

CASTRO-GONZÁLEZ, M. I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 263–271, 2008.

CHANG, H. R. et al. Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: A comparison between rats with normotension and hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 4, p. 275–280, 2002.

CHENG, Z. et al. Dietary exposure and risk assessment of mercury via total diet study in Cambodia. **Chemosphere**, v. 92, n. 1, p. 143–149, 2013.

CLARKSON, T. W. Molecular and ionic mimicry of toxic metals. **Annu. Rev. Phnrmacol. Toxicol**, v. 32, p. 545–571, 1993.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit. Rev. Toxicol**, v. 26, n. 8, p. 609–662, 2006.

CLARKSON TW, VYAS JB, B. N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, n. 10, p. 757–764, 2007.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocar- dial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med**, v. 111, p. 918–931, 1989.

COLLINS, B. Y. P. et al. College of Medicine, p. 427–437, 1986.

CONGER, F. Endothelial regulation of vascular tone. **Hosp Pract**, v. 15, p. 117–126, 1994.

COOPER IV, G. Cardiocyte adaptation to chronically altered load. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 49, p. 501–518, 1987.

CORNWELL TL, PRYZWANSKY KB, WYATT TA, L. T. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cy- clic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**, v. 40, p. 923–31, 1991.

COSSELMAN, K. E.; NAVAS-ACIEN, A.; KAUFMAN, J. D. Environmental factors in cardiovascular disease. **Nat. Rev. Cardiol.**, v. 12, p. 627–664, 2015.

CSEKO, C. Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via

activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 3, p. 1130–1137, 2004.

DA CUNHA, V. et al. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 39, n. 1, p. 124–30, 2000a.

DA CUNHA, V. et al. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 39, n. 1, p. 124–30, jul. 2000b.

DANIELS, S. D.; MEYER, R. A.; LOGGIE, J. M. H. Determinants of cardiac involvement in children and adolescentes with essential hypertension. **Circulation**, v. 82, p. 1243–1248, 1990.

DAVIDGE, S. T. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circ Res**, v. 89, p. 650–660, 2001.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 3 Pt 2, p. H794-800, 1998.

DOHI, Y. et al. Acti- vation of the endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. **Hypertension**, v. 16, p. 170–179, 1990.

DRISCOLL, C. T. et al. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and E ff ects. **Environmental Science and Technology**, v. 47, p. 4967–4983, 2013.

DRUMMOND, G. et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discover**, v. 10, n. 6, p. 453–471, 2011a.

DRUMMOND, G. R. et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 6, p. 453–471, 2011b.

EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 380–401, 2013.

ETO, K. Minamata disease. **Neuropathology**, v. 20(Suppl), p. S14–S19, 2000.

FARIA, T. O. et al. Xanthine Oxidase Activation Modulates the Endothelial (Vascular) Dysfunction Related to HgCl2 Exposure Plus Myocardial Infarction in Rats. **Cardiovascular Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 161–174, 2018.

FDA. Table of Contents. What You Need to Know About Mercury in Fish and Shellfish. 2004 EPA EPA-823-R-04-005 and FDA Advice For: Women Who Might Become Pregnant Women, Who are Pregnant Nursing, Mothers Young Children. **FDA Consumer Magazine**, 1994.

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: Therapeutic options? **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 4, p. 545–562, 2009.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Where Are We Now? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, p. 1215–125, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos E Mecanismo De Lesão. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61–69, 1997.

FILLION, M. et al. Environmental Health : A Global Minor psychiatric disorders among Brazilian ragpickers : a cross-sectional study. **Methods**, v. 10, p. 1–10, 2006.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiol Rev.**, v. 62, p. 347–504, 1982.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FORTUNO, A. et al. Oxidative stress and vascular remodelling. **Exp Physiol**, v. 90, n. 4, p. 457–62, 2005.

FREIS, E. Age, race and sex and other indices of risk in hypertension. **Am J Med**, v. 55, p. 275–280, 1973.

FROLICH, J.; FORSTERMANN, V. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistence. **Adv Prostaglandin Tromboxane and Leukotriene Research**, v. 19, p. 211–215, 1989.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p. 1871–1875, 2001.

FURCHGOTT, R. T.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of ar terial smooth muscle by acetylcoline. **Nature**, v. 288, p. 373–6, 1980.

FURCHGOTT, R. F. THE ROLE OF ENDOTHELIUM IN THE RESPONSES OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE TO DRUGS Robert. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 24, p. 175–197, 1984.

FURIERI, L. B. et al. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 8, p. 1819–1831, 2011.

GARG, U. C.; HASSID, A. Nitric Oxide-generating Vasodilators and 8-Bromo-Cyclic Guanosine Monophosphate Inhibit Mitogenesis and Proliferation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 1774–1777, 1989.

GHOSH, D. K.; SALERNO, J. C. NITRIC OXIDE SYNTHASES: DOMAIN STRUCTURE AND ALIGNMENT IN ENZYME FUNCTION AND CONTROL. Frontiers in Bioscience, v. 8, p. 193–209, 2003.

GIODA, A. et al. A pilot study to determine mercury exposure through vapor and bound to PM10in a dental school environment. **Toxicology and Industrial Health**, v. 23, n. 2, p. 103–113, 2007.

GLUAIS, P. et al. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: The Janus face of prostacyclin. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 6, p. 834–845, 2005.

GONICK, H. C. et al. Lead Induce Hypertension. Interplay of nitric oxide and reactive oxygen species. **Hypertension**, v. 30, n. 6, p. 1487–1492, 1997.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inihibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest.**, v. 116, p. 4–15, 2006.

GRYGLEWSKI, R. J.; BOTTING, R. M.; VANE, J. R. Mediators produced by the endothelial cell. **Hypertension**, v. 12, p. 530–548, 1988.

GUALLAR, E. et al. Mercury, Fish Oils, and the Risk of Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1747–1754, 2002.

GUPTA, M.; BANSAL, J. K.; KHANNA, C. M. Blood mercury in workers exposed to the preparation of mercury cadmium telluride layers on cadmium telluride base. **Ind Health**, v. 34, n. 4, p. 421–425, 1996.

GUSTIN, K. et al. Methylmercury exposure and cognitive abilities and behavior at 10 years of age. **Environment International**, v. 102, p. 97–105, 2017.

GUZZI, G.; LA PORTA, C. A. M. Molecular mechanisms triggered by mercury. **Toxicology**, v. 244, n. 1, p. 1–12, 2008.

HALBACH, S.; SCHONSTEINER, G.; EBNER, F.; REITER, M. The effects of pchloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBS) on force of contraction of mammalian myocardium and on ATP hydrolysis by sarcolemmal ATPase. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 318, p. 121–129, 1981.

HALBACH, S. Mercury compounds: lipophilicity and toxic effects on isolated myocardial tissue. **Archives of Toxicology**, v. 64, p. 315–319, 1990.

HARRAP, S. Hypertension: genes versus environment. **Lancet**, v. 344, p. 169–171, 1994.

HELENA, M. et al. Hipertensão arterial : o endotélio e suas múltiplas funções. v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

HERNANZ, R. et al. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. **Clinical Science**, v. 126, n. 2, p. 111–121, 2014.

HIGASHI, Y. et al. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Circ J**, v. 73, p. 411–418, 2009.

HOUSTON, M. C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Alternative therapies in health and medicine**, v. 13, n. 2, p. S128-33, 2007.

HSDB. **Mercury, elemental.** Disponível em: https://toxnet.nlm.nih.gov/cgibin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+7439-97-6.

HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J. M.; BUCKLEY, N. J. Muscarinic receptor subtypes. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 30, p. 633–673, 1990. IBARRA, M. et al. Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. **Archives of Medical Research**, v. 37, n. 3, p. 334–341, 2006.

IBRAHIM, D. ET AL. Heavy metal poisoning: Clinical presentations and Pathophysiology. **Clin Lab Med**, v. 6, n. 1, p. 67–97, 2006.

IESAKI, T. et al. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H 2 O 2. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 277, n. 3, p. H978–H985, 2017.

ITO, H.; TORII, M.; SUZUKI, T. Decreased superoxide dismutase activity and increased superoxide anion production in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 17, n. 5, p. 803–816, 1995.

JONES, K. A. et al. cGMP modulation of Ca2+ sensitivity in airway smooth muscle. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 1 Pt 1, p. L35-40, 1999.

KABEER, I. A. S. ET AL. Bulletin of environmental contamination and toxicology. [s.l: s.n.].

KASPER, D., BOTARO, D., PALERMO, E. F. A., & MALM, O. Mercúrio em peixes e fontes e contaminação. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 228–239, 2007.

KIECHELE, F.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol**, v. 100, p. 567–75, 1993.

KIFOR, I.; DZAU, V. J. Endothelial Renin-Angiotensin Pathway: Evidence for Intracellular Synthesis and Secretion of Angiotensins. **Circulation Research**, v. 60, n. 3, p. 422–429, 1987.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. **Journal of Hazardous Materials**, v. 306, p. 376–385, 2016.

KISHIMOTO, T. et al. Inhibitory effect of methylmercury on migration and tube formation by cultured human vascular endothelial cells. **Archives of Toxicology**, v. 69, n. 6, p. 357–361, 1995.

KOJADINOVIC, J. et al. Mercury content in commercial pelagic fish and its risk assessment in the Western Indian Ocean. **Science of the Total Environment**, v. 366, n. 2–3, p. 688–700, 2006.

KOLLURU, G. K.; SIAMWALA, J. H.; CHATTERJEE. eNOS phosphorylation in health and disease. **Biochimie**, v. 30, p. 1–13, 2010.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide : An endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. June, p. 4651–4655, 1991.

KUMAR, K. V.; DAS, U. N. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? **Free Radic Res Commun.**, v. 19, n. 1, p. 59–66, 1993.

LAKATTA, E. G.; LEVY, D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. **Circulation**, v. 107, p. 139–146, 2003.

LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD (P) H oxidases : specific features, expression, and regulation. **Ameican Journal of Physiology**, v. 285, p. R277–R297, 2003.

LASSÈGUE, B.; SAN MARTÍN, A.; GRIENDLING, K. K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 110, n. 10, p. 1364–1390, 2012.

LEE, L. K. et al. A review of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and its relevance for cardiovascular physiotherapy research. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 27, n. 1, p. 303–307, 2015.

LEE, R. M. Vascular changes at the prehypertensive phase in the mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **Blood vessels**, v. 22, n. 3, p. 105–26, 1985.

LENFANT, C. et al. Sétimo relatório do Comitê Nacional Conjunto para a Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Pressão Arterial Elevada (JNC 7): Redefinindo as velas de hipertensão . **Hipertensão**, v. 21, p. 1178–1179, 2003.

LIU, D. et al. A vasoconstrictor response to COX-1-mediated prostacyclin synthesis in young rat renal arteries that increases in pre-hypertensive conditions. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, p. 804–811, 2015.

LUND, B. O.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg(II)-induced H2O2 formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, n. 10, p. 2017–2024, 1993.

LYONS, C. The role of nitric oxide in inflamation. **Adv Immunol**, v. 60, p. 323–355, 1995.

MACMAHON, S.; PETO, R.; CUTIER, J. Blood pressure, stroke and coronary heart disease: effects of prolonged differences in blood pressure-evidence from nine prospective observational studies corrected for dilution bias. **Lancet.**, v. 335, p. 765–774, 1995.

MANCIA G, FAGARD R, NARKIEWICZ K, REDÓN J, ZANCHETTI A, BÖHM M, CHRISTIAENS T, CIFKOVA R, DE BACKER G, DOMINICZAK A, GALDERISI M, GROBBEE DE, JAARSMA T, KIRCHHOF P, KJELDSEN SE, LAURENT S, MANOLIS AJ, NILSSON PM, RUILOPE LM, SCHMIEDER RE, SIRNES PA, SLEIG, Z. F. T. F. M. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **J Hypertens.**, v. 31, n. 7, p. 1281–357, 2013.

MARDINI, I. A.; FITZGERALD, G. A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a group class of anti-inflamatory drugs. **Mol Interv**, v. 1, p. 30–38, 2001.

MARÍN, J.; REDONDO, J. Vascular sodium pumpendothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 84, n. 3, p. 249–271, 1999.

MARIN, J.; RODRÍGUES-MARTÍNEZ, A. Role of Vascular Nitric Oxide in Physiological and Pathological Conditions. **Pharmacol. T&r. Vol.**, v. 75, n. 2, p. 111–134, 1997.

MARLETTA, M. A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. In: **Cell**. [s.l: s.n.]. v. 78p. 927–930.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 1, p. 51–65, 2013.

MASSARONI, L. ET AL. Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects

of mercury in anaesthetized rats and in langendorff perfused rat hearts. **Pharmacologicul Research**, v. 32, n. l, p. 27–36, 1995.

MASSO, E. L.; CORREDOR, L.; ANTONIO, M. T. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/ or cadmium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 210–216, 2007.

MCNIECE, K. L. et al. Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Adolescents Analysis of Risk by 2004 National High Blood Pressure Education Program Working Group Staging Criteria. **Hypertension**, v. 50, n. 2, p. 392–395, 2007.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. SUPPL. 1, p. 193–201, 2006.

MONCADA, S.; HIGGS, E.; VANE, J. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin), a potent inhibitor of platelet aggregation. **Lancet**, v. 1, p. 18–21, 1977.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: Experimental evidence and clinical controversies. **Annals of Medicine**, v. 44, n. SUPPL. 1, p. 2–16, 2012.

NAJJAR, S. S.; SCUTERI, A.; LAKATTA, E. G. Arterial aging: Is it an immutable cardiovascular risk factor? **Hypertension**, v. 46, n. 3, p. 454–462, 2005.

NATHAN, C.; XIE, Q. WEN. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 915–918, 1994.

NELSON, M. T. et al. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. 799–822, 1995.

NGUYEN DINH CAT, A. et al. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 10, p. 1110–1120, 2012.

OLIVEIRA, E. M. et al. Anais da VI reunião anual da FESBE. abstract, v. 1, n. 92, p.

42, 1991.

OLIVEIRA, E. M.; DV, V. Effects of mercury on the contractility of isolated rat cardiac muscle. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 10, p. 1037–40, 1992.

OPAS/OMS. COOPERAÇÃO TÉCNICA ENTRE BRASIL, BOLÍVIA E COLÔMBIA: Teoria e Prática para o Fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas ao Mercúrio. [s.l: s.n.].

PAGE, I. H. Pathogenesis of arterial hypertension. **JAMA**, v. 140, n. 5, p. 451–458, 1949.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the Biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524–6, 1987.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidase, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, p. S170–S180, 2008.

PARK, H. J. et al. Hydrogen peroxide constricts rat arteries by activating Na + - permeable and Ca 2+ -permeable cation channels. **Free Radical Research**, v. 53, n. 1, p. 94–103, 2019.

PAWLUK, H. et al. Biomarkers of antioxidant status and lipid peroxidation in elderly patients with hypertension. **Redox Report**, v. 22, n. 6, p. 542–546, 2017.

PECANHA, F. M. et al. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 29–36, 2010.

PEDRO-BOTET, J. et al. Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 14, n. 6, p. 343–345, 2000.

PENDYALA, S.; NATARAJAN, V. Redox regulation of Nox proteins. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 174, n. 3, p. 265–271, 2010.

PIAZZOLLA, D. et al. Trace-metal enrichment and pollution in coastal sediments in the

northern Tyrrhenian Sea, Italy. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 69, n. 4, p. 470–481, 2015.

PIMENTA, E.; OPARIL, S. Prehypertension: epidemiology, consequences and treatment. **Nature Review Nephrology.**, v. 6, n. 1, p. 21–30, 2010.

PUZSEROVA, A. et al. Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

RADAELLI, A. et al. Nitric oxide-dependent vasodilation in young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 32, n. 4, p. 735–739, 1998.

RHEE, H. M.; CHOI, B. H. Hemodynamic and electrophysiological effects of mercury in intact anesthetized rabbits and in isolated perfused hearts. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 50, n. 3, p. 281–290, 1989.

RIBAROV, S. R.; BENOV, L. C. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. **BBA - Biomembranes**, v. 640, n. 3, p. 721–726, 1981.

RICCIOTTI, E., & FITZGERALD, G. A. . NIH Public Access. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2011.

RIZZETTI, D. A. et al. Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low Concentrations of Mercury. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

RIZZETTI, D. A. et al. The cessation of the long-term exposure to low doses of mercury ameliorates the increase in systolic blood pressure and vascular damage in rats. **Environmental Research**, v. 155, p. 182–192, 2017.

RIZZETTI, D. A. et al. Mercury-induced vascular dysfunction is mediated by angiotensin II AT-1 receptor upregulation. **Environmental Research**, v. 162, n. February, p. 287–296, 2018.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A. et al. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 6, p. 1329–1335, 1998.

ROSSONI, L. V. et al. Effects of mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 8, p. 989–997,

1999.

ROSSONI, L. V et al. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, p. H2110–H2118, 2002.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate relaxing factor. **Am J Physiol**, v. 250, p. H820–H827, 1986.

SALONEN, J. T. et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. **Circulation**, v. 91, n. 3, p. 645–55, 1 fev. 1995.

SALONEN, J. T. et al. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: A population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 2, p. 265–273, 2000.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–318, 2004.

SEALS, D. R. et al. Enhanced left ventricular performance in endurance trained older men. **Circulation**, v. 89, n. 1, p. 198–205, 1993.

SEALS, D. R. et al. Modulatory influences on ageing of the vasculature in healthy humans. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 5, p. 501–507, 2006.

SEIBERT, K.; MASFERRER, J. L. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. **Receptor.**, v. 4, p. 17–23, 1994.

SELIN, N. E. et al. Chemical cycling and deposition of atmospheric mercury: Global constraints from observations. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, v. 112, n. 2, p. 1–14, 2007.

SHENKER, B. J.; GUO, T. L.; SHAPIRO, I. M. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: Evidence of mitochondrial dysfunction. **Environmental Research**, v. 77, n. 2, p. 149–159, 1998.

SILVA, B. R. et al. Endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase are activated by hydrogen peroxide in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of**

Pharmacology, v. 814, p. 87–94, 2017.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol Rev**, v. 56, p. 387–437, 2004.

SIMÖES, M. R. et al. Low-level Chronic Lead Exposure Impairs Neural Control of Blood Pressure and Heart Rate in Rats. **Cardiovascular Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 190–199, 2017.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 145–182, 2000.

SMITH, W. L.; SONG, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases 1- and –2. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68–69, p. 115–28, 2002.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical Biology and Medicine, v. 18, n. 2, p. 321–336, 1995.

SUZUKI, H. et al. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 25, p. 1083–1089, 1995.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 4, p. 215–226, 2012.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075–1081, 2003.

TAYLOR, S. G. et al. Endothelium-dependent effects of acetyl-choline in rat aort: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. **Br. J. Pharmacol.**, v. 94, p. 853–863, 1988.

THAKALI, K. et al. Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 482–487, 2006.

TIAN, X. Y. et al. Oxidative Stress-Dependent Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin F2a Impairs Endothelial Function in Renovascular Hypertensive Rats. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 16, n. 4, 2012.

TOMIDA, T. et al. Inhibition of COX-2 prevents hypertension and proteinuria associated with a decrease of 8-iso-PGF2Æ formation in L-NAME-treated rats. **Journal of Hypertension**, v. 21, p. 601–609, 2003.

TÖRÖK, J.; HOLÉCYOVÁ, A.; KYSELÁ, S.; BERNÁTOVÁ, I.; PECHÁŇOVÁ, O. Changes in reactivity of pulmonary and systemic arteries in chronic NO-deficient hypertension. **Kardiológia.**, v. 7, p. 30–36, 1998.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M.; SEDEEK, M. NOX Isoforms and Reactive Oxygen Species in Vascular Health. **Molecular intervention**, v. 11, n. 1, p. 27–35, 2011.

TRIGGLE, C. R. et al. The endothelium in health and disease-- a target for therapeutic intervention. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 69, n. 6, p. 249–267, 2003.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circ Res.**, v. 48, n. 3, p. 309–19, 1981.

TSUBAKI, T.; IRUKYAMA, K. Minamata Disease. Tokyo: Kodansha LTDA, 1976.

UNEP. UNEP Chemicals. Current exposure and impacts of mercury on human health. **Global mercury assessment. Switzerland**, 2002.

USEPA, U. S. E. P. A. Mercury health effects. Washington, v. (EPA 600/8, 1998.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Ver Pharmacol Toxicol., v. 38, p. 97–120, 1998.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 38, n. 1, p. 97–120, 2002.

VANHOUTTE, P. Other endothelium-derived vasoactive factores. **Circulation**, v. 87, p. (Suppl V): V9-V7., 1993.

VASSALLO, D. V. et al. Effects of Chronic Exposure to Mercury on Angiotensin-Converting Enzyme Activity and Oxidative Stress in Normotensive and Hypertensive Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 374–380, 2018.

VASSALLO, D. V. et al. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 156, n. 2, p. 113– 118, 1999.

VASSALLO, D. V. et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 939–946, 2011.

VAZIRI, N. D. et al. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical

activity in lead-induced hypertension: Effect of lazaroid therapy. **Kidney International**, v. 52, n. 4, p. 1042–1046, 1997.

VAZIRI, N. D.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of Disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, n. 10, p. 582–593, 1 out. 2006.

VIGILâNCIA, S.-M. DA S. S. DE. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos. Diário Oficial da União. Anais...1988Disponível em: <https://www.univates.br/unianalises/media/imagens/Anexo_XI_61948_11.pdf>

VIRDIS, A. et al. Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice. **Hypertension**, v. 49, n. 3 PART 2 SUPPL., p. 679–686, 2007.

VIRDIS, A. et al. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: Role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 337–344, 2013.

VIRDIS, A.; TADDEI, S. Endothelial Dysfunction in Resistance Arteries of Hypertensive Humans: Old and New Conspirators. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 67, n. 6, p. 451–457, 2016.

WAKITA, Y. Hypertension induced by methyl mercury in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 144–147, 1987.

WHO. World Health Assembly. Global strategy on diet, physical activity and health. Geneva. **World Health Organization**, 2004.

WHO. Children 's Exposure to Mercury Compounds. **World Health Organization**, 2010.

WHO, W. H. O.; UNEP, U. N. E. P. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure Geneva: World Health Organization, Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases. Geneva: [s.n.].

WIDLANSKY, M. E. et al. Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. **Hypertension**, v. 42, p. 310–315, 2003.

WIGGERS, G. A. et al. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 147, n. 2, p. 252–260, 2008a.

WIGGERS, G. A. et al. Cerebrovascular endothelial dysfunction induced by mercury exposure at low concentrations. **NeuroToxicology**, v. 53, p. 282–289, 2016.

WIGGERS, G. A et al. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 295, n. 3, p. H1033–H1043, 2008b.

WOLKIN, A. et al. Blood mercury levels among fish consumers residing in areas with high environmental burden. **Chemosphere**, v. 86, n. 9, p. 967–971, 2012.

WONG, S. L. et al. Pivotal role of protein kinase Cdelta in angiotensin II-induced endothelial cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, p. 1169–1176, 2011.

WRIGHT, D. H. et al. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, p. R1343–R1360, 2001.

XAVIER, F. E. et al. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in α-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 215–225, 2004.

XIA, Z.; VANHOUTTE, P. M. Nitric Oxide and Protection against Cardiac Ischemia. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1774–1782, 2011.

YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR), the strokeprone SHR (SHRSP) and their various substrain models for hypertension- related cardiovascular disease. **Elsevier.**, v. 16, p. 346–364, 1994.

YANAGISAWA, H. et al. Altered expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of rats with HgCl 2 -induced acute renal failure. **Toxicology Letters 98**, v. 98, p. 181–188, 1998.

YAZBECK, C THIEBAUGEORGES, O MOUREAU, T. et al. Maternal blood lead levels

and the risck of pregnancy-induced hypertension: The EDEN cohort study. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 1527–1530, 2009.

YE, B. J. et al. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. **Annals of Occupational and Environmental Medicine**, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2016.

YU, B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.**, v. 74, p. 139–162, 1994.

YU, Z. et al. Excessive copper induces the production of reactive oxygen species, which is mediated by phospholipase D, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and antioxidant system. **J Integr Plant Biol**, v. 50, n. 2, p. 157–167, 2008.

ZALBA, G. et al. Vascular NADH/NADPH Oxidase Is Involved in Enhanced Superoxide Production in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 35, n. 5, p. 1055– 1061, 2000.

ZAVARIZ, C.; GLINA, D. M. R. Avaliação clínico-neuro-psicológica de trabalhadores expostos a mercúrio metálico em indústria de lâmpadas elétricas TT - Neuro-psychological clinical assessment of workers in an electric lamp factory exposed to metallic mercury. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 5, p. 356–365, 1992.