

Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência de SHRs pré-hipertensos

Paloma Batista Almeida Fardin

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, junho de 2019



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado da candidata **Paloma Batista Almeida Fardin**, intitulada "Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência de SHRs pré-hipertensos", decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, a candidata cumpriu todos os requisitos descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que a aluna faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 19 de junho de 2019.

**PROF DR JONES BERNARDES
GRACELI**

Presidente da Comissão Julgadora - Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas

PROFª DRª SONIA ALVES GOUVEA
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas

PROF DR DALTON VALENTIM VASSALO
Orientador

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

F219e Fardin, Paloma Batista Almeida, 1992-
Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência de SHRs pré-hipertensos / Paloma Batista Almeida Fardin. - 2019.
96 f. : il.

Orientador: Dalton Valentim Vassallo.
Coorientadora: Maylla Ronacher Simões.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Fisiologia. 2. Mercúrio. 3. Artéria mesentérica. 4. Hipertensão. 5. Sistema cardiovascular. I. Vassallo, Dalton Valentim. II. Simões, Maylla Ronacher. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

*Dedico este trabalho aos meus pais Eline Mara
Batista Almeida e Gilmar Cezar Santos Almeida,
pelo apoio, amor e esforço empreendidos em
toda a minha formação.*

“Meu filho, se entrares para o serviço de Deus, permanece firme na justiça e no temor, e prepara a tua alma para a provação; humilha teu coração, espera com paciência, dá ouvidos e acolhe as palavras de sabedoria; não te perturbes no tempo da infelicidade, sofre as demoras de Deus; dedica-te a Deus, espera com paciência, a fim de que no derradeiro momento tua vida se enriqueça. Aceita tudo o que te acontecer. Na dor, permanece firme; na humilhação, tem paciência. Pois é pelo fogo que se experimentam o ouro e a prata. Põe tua confiança em Deus e ele te salvará; orienta bem o teu caminho e espera nele. Vós, que temeis o Senhor, tende confiança nele, a fim de que não se desvaneça vossa recompensa”.

Eclesiásticos 2:1-8

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permanecer comigo durante as tribulações e por aumentar a minha fé, de modo que hoje creio que para Ele, nada é impossível. “Porque quando estou fraco, então sou forte.” (2 Co 12:10).

Aos meus pais e irmã, que me sustentaram e sempre foram meu abrigo. No coração dos três encontro meu lar. Sem vocês, nada teria sentido e talvez eu nem tivesse conseguido. Muito obrigada por tudo e por tanto! Minhas conquistas divido com vocês. Melhor família eu não poderia ter. Amo vocês!

Ao meu esposo, por andar comigo na estrada da vida, amadurecendo e nos tornando melhores juntos. Também aos meus sogros e Vó, que sempre me acolheram e incentivaram.

Aos meus poucos, mas eternos amigos, que sorriram com meu sorriso e choraram o meu choro, que entenderam minhas ausências (nem sempre, mas tudo certo!) e permaneceram ao meu lado diante todas as mudanças em minha vida. Em especial, Paty, Digo e sua família; as barangas Bah, Laira e Napaula; Regi e Amore; cunha Fabrícia e Cunhadas NSBs.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dalton, por me receber como sua aluna ainda que nunca tivesse me visto antes e por investir tanto em minha formação. Obrigada, Chefe, por acreditar em mim e me ajudar a trilhar meus caminhos.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Maylla, por ter ido além e se tornado refúgio ou ouvinte nas horas difíceis. Obrigada, May, por ampliar meu horizonte.

À Rosi, por toda ajuda fornecida durante o mestrado.

Ao Mr. Anderson, por todo apoio, ajuda e conversas. Devo experimentos e muitos aprendizados a você!

Ao Enildo, por prontamente aceitar em me ensinar a pletismografia e por todas as conversas durante os períodos intermináveis de experimento, tornando o tempo mais veloz.

À Rakel e à Ingridy, minhas parceiras do LEMC. Nós três, com jeitos tão diferentes, conseguimos nos manter unidas e isso me deu forças para continuar a caminhada. Obrigada pelo apoio, amizade, momentos divertidos e também de desespero! Concluir esse mestrado seria uma meta muito mais árdua sem vocês ao meu lado.

Aos demais queridos colegas do LEMC, Filipe, Cindy, Karol Zuqui, Grazi, Camila Almenara, Renatinha, Tati, Sabrina, Emily, Thiago Oliveira, Marito, Bruno, Vinícius pelo convívio e pelas ajudas em eventuais dúvidas que com certeza surgiram.

Aos demais professores do PPGCF/UFES, em especial ao Prof. Dr. Léo, pela contribuição em minha formação.

Aos funcionários do PPGCF/UFES, pelos serviços prestados.

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Mercúrio: propriedades do metal, fontes de exposição e intoxicação	17
1.2. Efeitos do mercúrio nos diversos órgãos e sistemas	23
1.3. Efeitos do mercúrio no sistema cardiovascular	25
1.4. Endotélio vascular	28
1.4.1. Fatores vasodilatadores derivados do endotélio	29
1.4.1.1. Óxido nítrico	29
1.4.1.2. Prostaciclina	31
1.4.1.3. Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)	32
1.4.2. Fatores vasoconstritores derivados do endotélio	32
1.4.2.1. Espécies reativas de oxigênio (EROs)	32
1.4.2.2. Prostaglandinas e tromboxano	34
1.4.2.3. Endotelina e angiotensina II	34
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Animais experimentais.....	37
4.2. Modelo experimental	37
4.3. Medida da pressão arterial e massa corporal.....	38
4.4. Avaliação da hipertrofia cardíaca	38
4.5. Estudo da reatividade vascular “ <i>in vitro</i> ” de artérias mesentéricas de resistência	39
4.5.1. Protocolos experimentais	40
4.5.1.1. Avaliação da integridade do músculo liso e endotélio vascular.....	40
4.5.1.2. Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina	40
4.5.1.3. Influência do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos canais para o potássio e dos prostanóides sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina e sua possível alteração como tratamento com HgCl ₂	41
4.5.1.4. Avaliação da resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio.....	41
4.5.1.5. Detecção vascular <i>in situ</i> da produção de ânion superóxido	42

4.5.1.6. Detecção vascular <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico	43
4.5.1.7. Estudo da expressão proteica pelo método de <i>Western Blot</i>	43
4.5.2. Fármacos e reagentes utilizados	44
4.5.3 Análise estatística.....	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Avaliação da massa corporal e pressão arterial sistólica	46
5.2. Efeitos da exposição crônica ao HgCl ₂ sobre o trofismo do ventrículo esquerdo.....	46
5.3. Efeitos da exposição crônica ao HgCl ₂ sobre a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência	47
5.3.1. Efeitos da exposição crônica ao HgCl ₂ sobre a resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)	47
5.3.2. Efeitos da exposição crônica ao HgCl ₂ sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina e sobre a resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio	47
5.3.3. Influência do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina.....	49
5.3.4. Efeito das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	50
5.3.5. Influência dos canais para potássio na reatividade vascular após a exposição crônica ao cloreto de mercúrio	53
5.3.6. Influência dos prostanoides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	55
6. DISCUSSÃO	59
7. SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS	66
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
9. REFERÊNCIAS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fatores vasoconstritores e vasodilatadores derivados do endotélio.....	29
Figura 2: Cascata de produção de óxido nítrico e ativação da via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio.....	30
Figura 3: Artérias mesentéricas de resistência e câmara para estudo <i>in vitro</i>	40
Figura 4: Representação de protocolo experimental.....	41
Figura 5: Esquema ilustrativo do protocolo de reatividade vascular.....	42
Figura 6: Efeito da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial sistólica.....	46
Figura 7: Efeito da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a sobrecarga do ventrículo esquerdo.....	47
Figura 8: Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre a reatividade vascular de MRAs.....	48
Figura 9: Efeitos da exposição crônica ao mercúrio na resposta vasodilatadora mediada por NO em anéis de MRA.....	49
Figura 10: Exposição crônica ao cloreto de mercúrio aumenta o estresse oxidativo.....	51
Figura 11: Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre os canais para potássio.....	54

Figura 12: O papel da ciclooxigenase na reatividade vascular de MRA em SHRs expostos e não expostos ao mercúrio.....	55
Figura 13: Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre o papel dos prostanóides derivados da COX na reatividade vascular de MRAs.....	57
Figura 14: Sumarização esquemática dos resultados obtidos no presente estudo.....	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

- SH: radical sulfidríla

AA: ácido araquidônico

ATP: trifosfato de adenosina

CAPES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX-1: ciclooxigenase 1

COX-2: ciclooxigenase 2

DHE: dDihidroetídio

EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

EPM: erro padrão da média

EROs: espécies reativas de oxigênio

g: grama

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

Hg²⁺: mercúrio mercúrico

Hg₂⁺⁺: mercúrio mercurioso

HgCl₂: cloreto de mercúrio

Hg⁰: mercúrio elementar ou metálico

i.p: intraperitonal

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

kg: quilograma

L: litro

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster

M: molar

m³: metro cúbicos

mg: miligramas

mL: mililitro

mM: milimolar

nM: nanomolar

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NOS: óxido nítrico sintase

ONOO⁻: peroxinitrito

PAS: pressão arterial sistólica

PGE₂: prostaglandina E₂

PGI₂: prostaciclina

SERCA: Cálcio-ATPase do Retículo Sarcoplasmático

SHR: rato espontaneamente hipertenso

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TXA₂: tromboxano A₂

µg: micrograma

RESUMO

O mercúrio é um metal pesado associado a doenças cardiovasculares. Estudos relataram aumento da reatividade vascular sem alterações na pressão arterial sistólica (PAS) após exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl_2) em ratos normotensos. No entanto, não sabemos se os indivíduos na fase pré-hipertensiva, como os ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) jovens, são suscetíveis ao aumento da pressão arterial. Nós investigamos se a exposição crônica ao HgCl_2 acelera o desenvolvimento da hipertensão em SHRs jovens, através da análise da PAS durante a fase pré-hipertensiva e da função vascular de artérias mesentéricas de resistência (MRAs). SHRs com quatro semanas de idade foram divididos em 2 grupos: o grupo SHR Controle e SHR HgCl_2 . O grupo SHR Controle recebeu injeções intramusculares (i.m.) de solução salina 0,9% por 30 dias, enquanto o grupo SHR HgCl_2 recebeu pelo mesmo tempo injeções i.m. de HgCl_2 , sendo a dose inicial de 4,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e as doses subsequentes de 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, a fim de atingir uma concentração plasmática final de 29nM. Os animais foram submetidos à pletismografia caudal para mensuração indireta da PAS no primeiro dia do tratamento e semanalmente, até o final. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados e eutanaziados, sendo removidos o coração, o leito mesentérico e o sangue, para análise de hipertrofia cardíaca, reatividade vascular e análises bioquímicas. Os resultados mostraram que o tratamento com HgCl_2 acelerou o desenvolvimento da hipertensão; reduziu a reatividade vascular à fenilefrina nas MRAs; aumentou a produção de óxido nítrico (NO); promoveu disfunção vascular aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); aumentou

os níveis proteicos de Gp91Phox e níveis *in situ* de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$); e reduziu a produção de prostanóides vasoconstritores derivados da COX em comparação ao grupo SHR Controle. A exposição ao $HgCl_2$ acelerou o desenvolvimento da hipertensão e somado a isso os animais expostos também exibiram um mecanismo vasoprotetor para contrabalancear o rápido aumento da PAS, diminuindo a reatividade vascular através da superprodução de H_2O_2 e NO. Nossos resultados sugerem que a exposição ao $HgCl_2$ potencializou esse mecanismo vasoprotetor, uma vez que, antes disso, ocasionou o estabelecimento precoce da hipertensão. Portanto, a exposição crônica ao $HgCl_2$ em animais pré-hipertensos pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares, acelerando o desenvolvimento da hipertensão.

Palavras-chave: cloreto de mercúrio, artéria mesentérica de resistência, reatividade vascular, óxido nítrico, hipertensão, SHR.

ABSTRACT

Mercury is a heavy metal associated with cardiovascular diseases. Studies reported increased vascular reactivity without changes in systolic blood pressure (SBP) after chronic mercury chloride (HgCl₂) exposure in normotensive rats. However, we do not know whether individuals in the prehypertensive phase, such as young spontaneously hypertensive rats (SHRs), are susceptible to increased arterial blood pressure. We investigated whether chronic exposure to HgCl₂ in young SHRs accelerates hypertension development by studying the vascular function of mesenteric resistance arteries (MRAs) and SBP in young SHRs during the prehypertensive phase. Four-week-old SHRs were divided into 2 groups: SHR control group and SHR HgCl₂ group. The SHR control group received intramuscular injections of 0.9% NaCl for 30 days, while the SHR HgCl₂ group received intramuscular injections of HgCl₂ for the same period to achieve a final plasma concentration of approximately 29 nM, with an initial dose of 4.6 µg/kg and subsequent doses of 0.07 µg/kg/day. The animals were submitted to caudal plethysmography for indirect measurement of SBP on the first day of treatment and then weekly until the end of the 30-day treatment. At the end of treatment, the animals were anesthetized and euthanized, and the heart, mesenteric bed and blood were removed for analysis of cardiac hypertrophy, vascular reactivity and biochemical analyzes. The results showed that HgCl₂ treatment accelerated the development of hypertension; reduced vascular reactivity to phenylephrine in MRAs; increased nitric oxide (NO) generation; promoted vascular dysfunction by increasing the production of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H₂O₂); increased Gp91Phox protein levels and *in situ* levels of superoxide anion (O₂^{•-}); and reduced vasoconstrictor prostanoids production compared to vehicle treatment. Although HgCl₂ accelerated the development of hypertension, the mercury-exposed animals also exhibited a vasoprotective mechanism to counterbalance the rapid increase in SBP by decreasing vascular reactivity through H₂O₂ and NO overproduction. Our results suggest that HgCl₂ exposure potentiated this vasoprotective mechanism, since, before that, it caused the early establishment of hypertension. Therefore, chronic exposure to HgCl₂ in prehypertensive animals could enhance the risk for cardiovascular diseases, accelerating hypertension development.

Keywords: mercury chloride, mesenteric resistance artery, vascular reactivity, nitric oxide, hypertension, SHR.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Mercúrio: propriedades do metal, fontes de exposição e intoxicação

O mercúrio é um metal pesado e pode ser encontrado naturalmente no meio ambiente. Elemento estável, não se destrói, embora possa ser transformado (WHO, 2010). O mercúrio pode ser lançado para atmosfera através de emissões naturais provenientes de atividades vulcânicas e liberação de gás da crosta terrestre, enquanto a combustão de combustíveis fósseis, desmatamento, queima de lixo e mineração são fontes antropogênicas desse metal (WHO, 2010; LINDBERG et al., 2007; SELIN et al., 2007). Estima-se a emissão natural de 2.000 a 6.000 toneladas de mercúrio por ano para a atmosfera. Somado a isso, as fontes antropogênicas contribuem significativamente para o aumento do nível de mercúrio no ambiente, uma vez que, atualmente, os níveis de mercúrio na atmosfera são 3 a 6 vezes superior aos níveis encontrados antes do processo de industrialização (OPAS, 2011).

O uso de metais pesados está intimamente ligado a história do homem. Ainda na pré-história o homem descobriu o metal como importante material para fabricação de utensílios e ferramentas. Entretanto, os registros referentes aos metais não são somente relativos aos seus benefícios. O contato humano com compostos metálicos, principalmente compostos isentos de atividade fisiológica, mesmo em baixas concentrações, está relacionado com alta toxicidade. O mercúrio, em particular, vem sendo utilizado pela indústria e medicina há séculos (CLARKSON, 2003). Seu uso em atividades humanas é descrito desde 2000 anos a.C. sendo o sulfeto de mercúrio, desde essa época, utilizado para amalgamação. Além disso, alquimistas utilizavam o mercúrio para refino de ouro, para antisepsia e para o tratamento da sífilis, por exemplo (SCHEIDT, 1967; HYLANDER; MEILI, 2003; CLARKSON, 1972; 2007). Atualmente, dentre os principais usos do mercúrio, podemos destacar sua utilização em baterias domésticas, lâmpadas elétricas, incluindo as fluorescentes, em interruptores, termostatos, em instrumentos de pressão, medição e calibração usados em laboratórios de pesquisas (como esfigmomanômetros para mensuração de pressão arterial), em amálgamas dentários, em explosivos, no tratamento de minérios de ouro e prata e para refino desses metais, na produção de ácido

acético, dentre diversos outros usos (HACON; AZEVEDO, 2006). Assim, a utilização do mercúrio leva a riscos de exposição não somente ocupacional, como também acidental (CLARKSON, 2003). Afim de minimizar os riscos à saúde, o Ministério da Saúde proibiu a fabricação, importação e comercialização de termômetros e esfigmomanômetros com coluna de mercúrio para diagnóstico em saúde, segundo a resolução da ANVISA RDC nº 145/2017.

Na natureza, pode ser encontrado sob três formas: mercúrio elementar ou metálico, mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico. O mercúrio elementar (Hg^0) é um metal prateado e brilhante, porém, em temperatura ambiente, encontra-se na forma física líquida, com mínima absorção pelo organismo, oferecendo, assim, menor risco à saúde (WHO, 2010; OPAS, 2011). Em contrapartida, apresenta alta volatilidade, por isso é a forma mais predominante na atmosfera, podendo ser absorvido rapidamente pelos pulmões, embora seja relativamente inerte quando comparado com as outras formas de mercúrio. O mercúrio elementar é mais comumente utilizado na fabricação de amálgamas dentários, termômetros, lâmpadas fluorescentes e garimpo. Dessa maneira, está mais associado a riscos ocupacionais de intoxicação (CLARKSON; VYAS; BALLATORI, 2007; WHO, 2005; HOUSTON, 2007).

Na atmosfera, o mercúrio elementar pode ser oxidado a mercúrio mercúrico (Hg^{2+}) (UNEP, 2008). Além disso, a forma elementar pode se combinar com cloro ou enxofre, formando os compostos inorgânicos de mercúrio, também conhecidos como sais de mercúrio. (OPAS, 2011). O composto inorgânico pode apresentar dois estados de oxidação, o mercurioso (Hg_2^{++}) e o mercúrico (Hg^{2+}). Dentre as formas inorgânicas, destaca-se o cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), muito utilizado em cosméticos, inseticidas e tintas (CLARKSON; MAGOS, 2006; SYVERSEN; KAUR, 2012). Essa forma é pouco volátil, porém altamente solúvel em água e reativa.

A apresentação orgânica se dá quando o mercúrio se liga a um ou dois átomos de carbono, originando, respectivamente, metilmercúrio e etilmercúrio. Das formas orgânicas, o metilmercúrio parece ser a mais tóxica, pois ultrapassa a barreira placentária e hematoencefálica, apresentando grande afinidade pelo sistema nervoso central (SNC). No que diz respeito ao mercúrio inorgânico, ao se depositar em rios e oceanos, sofre um processo de biometilação, transformando-se em metilmercúrio, que se bioacumula ao longo da cadeia

alimentar aquática, e por isso, a principal fonte de contaminação dos seres humanos ao metilmercúrio é através do consumo de peixes contaminados (FERRER, 2003; NASCIMENTO; CHASIN, 2001, CLARKSON, 2003; 2007). Já o etilmercúrio é um composto do timerosal, utilizado como conservante de vacinas (CLARKSON, 2003; CLARKSON; MAGOS, 2006; SYVERSEN; KAUR, 2012).

Todas as formas de mercúrio são tóxicas, porém o grau de toxicidade varia de acordo com o tempo de exposição, a via de exposição e a forma química do metal (ZALUPS, 2000). O principal fator determinante da toxicidade desse metal é sua alta afinidade pelos grupos sulfidril (-SH), encontrados em determinadas enzimas, canais iônicos e receptores, podendo levar a prejuízos de diversos processos enzimáticos e metabólicos (ABRAMSON; SALAMA, 1989; CLARKSON et al., 1993; CLARKSON, 1972; NASCIMENTO; CHASIN, 2001). Portanto, ao se ligar a radicais sulfidril, o mercúrio pode provocar: inibição da síntese proteica mitocondrial, afetando o metabolismo aeróbico; inibição de enzimas essenciais, como a glutatona, catalase e vitamina E, importantes defesas antioxidantes do organismo humano; pode também alterar o transporte de potássio na membrana celular (CHIAMVIMONVAT et al., 1995; OPAS/OMS, 2011; RAMIREZ 2008). Esse complexo formado pela união entre o mercúrio e radicais -SH, além da sua característica lipossolúvel, é justamente o que confere ao metal a capacidade de penetrar os tecidos (BRIDGES et al. 2007; MICARONI et al., 2000).

Algumas catástrofes chamaram a atenção da comunidade científica e das agências de saúde para os efeitos tóxicos desse metal. No Japão, na década de 1950, uma fábrica despejou dejetos industriais contendo grande quantidade de mercúrio na Baía de Minamata, resultando na contaminação dos peixes da região e a população local, que dependia do consumo de peixe em sua dieta, também foi contaminada. Foram observados alguns efeitos tóxicos do metal em recém-nascidos cujas mães foram expostas, como paralisia cerebral, ataxia e perdas da audição e visão, constituindo a doença denominada Doença de Minamata, diagnosticada em cerca de 2000 casos na época (GOCHFELD, 2003; WHO, 2010).

Outro importante incidente aconteceu no Iraque na década de 1970, onde cerca de 6.500 pessoas foram hospitalizadas por intoxicação após consumirem

pão produzido com trigo tratado com fungicidas contendo mercúrio. Dessas pessoas hospitalizadas, 459 morreram (BAKIR et al., 1973; WHO, 2010). Nesses casos, os efeitos tóxicos foram evidentes em concentração sanguínea de mercúrio de 1 µg/mL e, nos casos de morte, foram observadas concentrações acima de 3 µg/mL (BAKIR et al., 1973). Mesmo após esses incidentes alguns países, como o Brasil, continuam utilizando o mercúrio em determinadas atividades. A região da Amazônia ocupa lugar de destaque em problemas de contaminação ambiental e exposição humana associados ao mercúrio, sendo estimado o descarte de 5 kg de mercúrio para cada kg de ouro extraído, o que coloca em risco os garimpeiros e a população ribeirinha, principalmente (OPAS, 2011).

Estudos mostram que a população em geral está exposta a principalmente três vias de intoxicação por mercúrio: tanto o uso (usuários) quanto a manipulação (dentistas) de amálgamas dentários, consumo de peixes contaminados e vacinas contendo timerosal (CLARKSON, 2002; 2003).

Atualmente, os amálgamas dentários são a principal fonte de exposição ao mercúrio inorgânico para a população, tanto para as pessoas que possuem obturação dentária, quanto para aquelas que trabalham em consultórios odontológicos, como os dentistas ou técnicos, que estão envolvidos na produção e manipulação desse produto (OPAS, 2011; CLARKSON, 2002). Para a fabricação do amálgama, utiliza-se uma liga de metais como prata, cobre e estanho, sendo que aproximadamente 50% dessa liga é composta por mercúrio (WHO, UNEP 2008). A exposição de dentistas e dos usuários pode ser pela inalação de vapor de mercúrio, na sua forma elementar, encontrado na cavidade bucal ou no ambiente dos consultórios no momento de produção ou manipulação dos amálgamas (NASCIMENTO; CHASIN, 2001; SCHUURS et al., 1999). Uma vez inalado, cerca de 80% do mercúrio é absorvido rapidamente pelo sistema respiratório (ATSDR 1999; LANGWORTH et al., 1997), conseguindo atingir a corrente sanguínea com concentração de até 18 nM/L, de onde parece ser transportado e depositado preferencialmente nos rins e cérebro (BJORKMAN et al., 1997; EIDE; WESENBERG, 1993). Após a inalação, o mercúrio ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica e placentária. Nas hemácias, o mercúrio elementar sofre oxidação, sendo transformado em mercúrio inorgânico, que tem menor lipossolubilidade e, portanto, menor capacidade de ultrapassar

membranas celulares ficando, assim, retido nos órgãos (ASANO et al., 2000; CLARKSON, 2007).

Além do mercúrio adentrar o organismo humano pela inalação de seu vapor, o ato da mastigação em pessoas com amálgamas também pode liberar partículas de mercúrio na cavidade bucal e existe um relação diretamente proporcional entre o número de amálgamas e a quantidade de mercúrio absorvida (LEISTEVUO et al., 2001; SANDBORGH-ENGLUND et al., 1998; HALBACH et al., 2008). Nesses indivíduos, a concentração sanguínea de mercúrio após a mastigação pode chegar a 10 µg/dia, mais que a encontrada na atmosfera (LORSCHIEDER; VIMY, 1990). Apesar disso, ainda não está bem estabelecido se o uso desses amálgamas deve ou não ser contraindicado. Enquanto um órgão americano encoraja o uso (AMERICAN DENTAL ASSOCIATION, 2003), órgãos de outros países recomendam evitá-lo ou, até mesmo, banir o uso de restaurações com amálgamas contendo mercúrio (BRITISH DENTAL HEALTH FOUNDATION, 2003; SATO et al., 2006; HYLANDER et al. 2006).

Embora de acordo com a Environmental Protection Agency (EPA, 1997), um único amálgama libere 3 a 17 µg/dia de vapor de mercúrio, um estudo evidenciou que concentração sanguínea de mercúrio inorgânico encontrada em pessoas usuárias dessas restaurações é de aproximadamente 4,3 µg/L de sangue, o que é equivalente a cerca de 16 nM. Também de acordo com a EPA dos EUA, a dose de referência diária aconselhada para o cloreto de mercúrio seria de 0,3 µg/kg/dia e para o vapor de mercúrio seria 0,3 µg/m³ de ar (WHO; UNEP 2008). Já aqui no Brasil, a dose máxima de mercúrio inorgânico recomendada é 4 µg/kg de peso corporal por semana (OPAS, 2011).

O mercúrio emitido tanto por fontes naturais quanto antropogênicas tende a se depositar em cursos de água, como oceanos e rios, e lá é convertido em metilmercúrio por um processo denominado biometilação. O metilmercúrio se acumula em peixes e frutos do mar que, muitas vezes, são consumidos pela população em geral. Dessa forma, além do mercúrio proveniente dos amálgamas dentários, outra fonte de exposição comum aos seres humanos é o consumo de peixes e frutos do mar contaminados com metilmercúrio (CLARKSON, 2002; 2003). Devido à via de consumo, o metilmercúrio é absorvido pelo trato gastrointestinal e, por atravessar facilmente a barreira

hematoencefálica e placentária, alcança o cérebro e o feto. Ataxia, perda da visão e audição e parestesia são sinais neurológicos observados em adultos expostos (ETO, 2002; WHO, 2004).

Há muito tempo o consumo de peixes é recomendado por possuírem óleos que tem propriedades de proteção contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BURR et al., 1989). Porém essa recomendação não é unânime, uma vez que estudos mostraram a relação direta entre alto consumo de peixes, acúmulo de mercúrio e efeitos cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio, hipertensão e aterosclerose (VIRTANEN et al., 2005; GRANDJEAN et al., 2004; SALONEN et al., 1995; WAKITA, 1987; VASSALLO et al., 1999). A EPA dos EUA considera que níveis de metilmercúrio sanguíneo de 5 µg/L ou 21 nM, equivalente a 1 µg/kg de peso corporal, são aceitáveis e sem efeitos deletérios para o organismo, sendo aconselhado a pessoas que excedem esses valores, principalmente gestantes ou mulheres que pretendem engravidar, a redução do consumo de peixes (STERN, 2005).

Diante dessas controvérsias, as agências de alguns países estabeleceram limites aceitáveis de metilmercúrio na ingesta ou no organismo. Enquanto a organização mundial da saúde preconiza um limite de ingesta de 0,47 µg/kg/dia de metilmercúrio e a National Research Council uma dose de referência de 0,1 µg/kg/dia, o FDA estabelece uma referência diária aceitável de 0,43 µg/kg/dia (FDA, 2004). No Brasil, a ANVISA recomenda alimentar-se de peixes não-predadores com limite máximo de metilmercúrio de 0,5 µg/ e de 1,0 µg/kg quando predadores. Ainda no Brasil, o valor de referência para ingesta semanal mercúrio orgânico é de 1,6 µg/kg de peso corporal por semana (Ministério da Saúde, 1998), seguindo os valores tolerados de ingesta do Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (FAO/WHO, 2006). No caso de adultos, o Comitê considerou que a ingestão de até cerca de duas vezes o valor de 1,6 µg/kg de peso corporal não representa risco de neurotoxicidade, embora no caso de mulheres em idade fértil, crianças e adolescentes, esse valor não deve ser ultrapassado, pois são mais sensíveis à toxicidade do mercúrio.

Estudos realizados na Bacia Amazônica observaram que dentre os consumidores de peixe, a população ribeirinha apresenta maior concentração de mercúrio e, portanto, está mais exposta, sendo encontradas concentrações de

mercúrio entre $38,6 \pm 14,4 \mu\text{g/g}$ e $65 \pm 58 \mu\text{g/g}$ de cabelo (EVE; OLIVEIRA; EVE, 1996). Já os consumidores urbanos de peixe são notavelmente menos expostos, com níveis de mercúrio no cabelo em torno de $2,4 \mu\text{g/g}$, $2 \mu\text{g/g}$ e $1,9 \mu\text{g/g}$ (WEBB et al., 2004; SANTOS et al., 2002; PASSOS et al., 2003).

A terceira principal fonte de exposição humana ao mercúrio é o timerosal, um composto utilizado desde 1930 como conservantes para vacinas, que contém etilmercúrio e ainda hoje é encontrado com essa finalidade (MAGOS, 2001; CLARKSON et al., 2002; GEIER et al., 2007). Embora sua toxicidade seja considerada similar ao metilmercúrio (FDA, 2008; CLARKSON et al., 2002), o etilmercúrio possui menor tempo de meia vida, sendo mais rapidamente convertido em mercúrio inorgânico no organismo (PICHICHERO et al., 2002). Alguns estudos apontaram desordens neurológicas em pessoas expostas ao timerosal (GEIER et al., 2008; GEIER; GEIER 2003; BASKIN, 2003), porém a ausência de associação entre o etilmercúrio e efeitos tóxicos também foi mostrada (HERON; GOLDING, 2004; PARKER et al., 2004). Devido a essas evidências contraditórias, a suspensão de vacinas contendo timerosal ainda não é incontestável (FDA, 2004) e os limites aceitáveis de etilmercúrio são os mesmos estabelecidos para metilmercúrio (WHO, 1996).

A EPA considera seguro valores de mercúrio sanguíneo no homem inferiores a $5,8 \mu\text{g/L}$ em pessoas expostas, enquanto segundo a NRC (2000) esse valor não deve ultrapassar $2 \mu\text{g/L}$ em pessoas não expostas. Já aqui no Brasil, são considerados seguros os valores de 5 a $10 \mu\text{g/L}$ em pessoas expostas e 1 a $8 \mu\text{g/L}$ em pessoas não expostas (WHO, 2008; MS, 2010). Os danos causados pela exposição ao mercúrio podem repercutir em vários órgãos e tecidos.

1.2. Efeitos do mercúrio nos diversos órgãos e sistemas

Enquanto a intoxicação aguda pelo mercúrio ocorre em um curto período de tempo e em concentrações elevadas, a intoxicação crônica é caracterizada por ocorrer em período prolongado, de semanas a anos, e a baixas concentrações. Essas diferentes formas de intoxicação podem levar a diferentes apresentações de quadro clínico (PACHECO-FERREIRA, 2008). Geralmente, os efeitos tóxicos do mercúrio são observados primeiramente no SNC, rins e no sistema cardiovascular, mas também podem ser encontradas alterações no

sistema respiratório, imunológico, reprodutivo e gastrointestinal (RICE; BARONE, 2000; ATSDR, 1999; UNEP, 2002; FDA, 2006).

O SNC geralmente é alvo das formas elementar e orgânica do mercúrio. Ao atravessar a barreira hematoencefálica, o mercúrio elementar tende a atingir principalmente a substância negra e os lobos occipital e parietal. Assim, é possível observar diminuição da capacidade cognitiva, tremor, polineuropatia, paresia e hiperreflexia (EPA, 1997; WHO, 2004). Já o metilmercúrio afeta principalmente os giros pré e pós-central, temporal superior, na porção central do cerebelo, e gânglios da base (ETO, 2002). Seus efeitos no SNC, alvo primário, ocorrem pela sua alta capacidade de ligação aos radicais -SH e cisteína, culminando em: inativação de enzimas e danos estruturais às proteínas (YEE; CHOI, 1994); alteração direta do DNA pela inibição da organização dos microtúbulos, fator importante para o desenvolvimento do SNC (CLARKSON, 1987) e, por último, inibição de diferentes receptores com consequente bloqueio dos canais de cálcio em neurônios ganglionares (WEINSBERG et al., 1995; SIMMONS-WILLIS et al., 2002). Passos e Mergler (2008) observaram efeitos neurotóxicos com concentrações de mercúrio capilar abaixo de 50 µg/g em adultos da Amazônia. Atraso psicomotor e diminuição da acuidade visual foram demonstrados (PINHEIRO et al., 2007; da COSTA et al., 2008). Embora os efeitos do mercúrio inorgânico no SNC humano ainda não sejam bem esclarecidos, já foi observado que o cloreto de mercúrio aumenta a produção de EROs e promove alterações celulares compatíveis com as encontradas em doenças como Esclerose Lateral Amiotrófica e Alzheimer (KONIGSBERG et al., 2001; BEAL, 2002; CHONG et al., 2005).

Como a excreção de compostos mercuriais é mediada pelos rins, estes órgãos também se tornam alvo, principalmente do mercúrio inorgânico (ZALUPS, 2000; VAN VLEET; SCHNELLMANN, 2003; HODGSON et al., 2007), que é absorvido pelos rins devido a sua ligação com a glutatona e cisteína (ZALUPS; LASH, 2006). Foi observado que um dos mecanismos de ação lesivo do cloreto de mercúrio em ratos se dá através do aumento da produção de EROs, como o peróxido de hidrogênio (GSTRAUNTHALER et al., 1983; LUND et al., 1993). Assim, a administração de antioxidantes parece ter efeito protetor contra os efeitos deletérios do metal no sistema renal (AUGUSTI et al., 2007). Além disso, o aumento da peroxidação lipídica (LUND et al., 1993) e prejuízos

da função mitocondrial (STACCHIOTTI et al., 2004; CARRANZA-ROSALES et al., 2005) também constituem vias de nefrotoxicidade pelo mercúrio. O resultado final dessas alterações muitas vezes é a falência renal, observada tanto em humanos como em animais experimentais, principalmente como consequência de lesões nos túbulos proximais (ZALUPS, 2000) e lesão glomerular (BAGENSTOSE et al., 1999; CARMIGNANI et al., 1989) causadas pelo mercúrio.

O mercúrio também exerce efeitos tóxicos sobre o sistema respiratório. Foi observado em humanos que a inalação e vapor de mercúrio elementar causou congestão pulmonar e insuficiência respiratória (BLUHM et al., 1992; ZHENG; MONESTIER, 2003; AZEVEDO, 2003). Além disso, a administração aguda de cloreto de mercúrio em ratos experimentais levou a hipertensão pulmonar (ROSSONI et al, 1999). Também foi observada supressão do sistema imunológico e aumento da ocorrência de câncer em indivíduos expostos ao mercúrio (GÓMEZ et al., 2007; GLEICHMANN et al., 1989), redução da fertilidade em homens expostos ao metilmercúrio (CHOY et al., 2002), aborto, infertilidade e mal formação congênita em mulheres (SCHUURS, 1999), além de alguns efeitos no trato gastrointestinal. Quando em contato com a mucosa do trato gastrointestinal, os compostos mercuriais podem levar a estomatites, diarreia, vômitos, hematêmese e úlceras (GRAEME; POLLACK, 1998; BANDO et al., 2005).

1.3. Efeitos do mercúrio no sistema cardiovascular

No sistema cardiovascular, a exposição crônica ou aguda ao mercúrio tem sido associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como hipertensão, aterosclerose e infarto agudo do miocárdio (SALONEN et al., 1995; 2000; VIRTANEN et al., 2005; HOUSTON, 2011).

O estudo de Salonen et al. (1995) avaliou por seis anos a concentração de mercúrio capilar de homens que apresentavam em sua dieta a ingestão diária de peixes e concluiu que os indivíduos com concentração de mercúrio maior que 2,0 µg/g no cabelo apresentaram risco duas vezes maior de infarto agudo do miocárdio (IAM) que homens com concentrações menores. Além disso, alto teor de mercúrio capilar foi associado à probabilidade de desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) e morte por qualquer outra causa. O aumento do risco de IAM foi relacionado ao fato de o mercúrio causar diminuição do efeito protetor

de ácidos graxos, como o ômega 3, abundante em peixes (SALONEN et al., 1995; VIRTANEN et al., 2005). Mais estudos também relacionaram a exposição ao mercúrio ao aumento do risco de desenvolvimento de IAM e DAC (GUALLAR et al., 2002; VIRTANEN et al., 2007). Além disso, aumento na pressão arterial foi observada com níveis de mercúrio capilar abaixo de 0,83 µg/g em homens na Coreia (LIM et al., 2010). Porém, recentemente, Downer et al. (2017) não encontraram relação entre exposição ao metilmercúrio e doenças cardiovasculares em adultos. Também foi observado que a exposição pré-natal ao metilmercúrio não alterou a pressão arterial de crianças e adolescentes (THURSTON et al., 2007). Sendo assim, a toxicidade do metilmercúrio sobre o sistema cardiovascular ainda é controversa.

Foi observado que a exposição aguda a elevadas concentrações de HgCl₂ em ratos experimentais promoveu arritmia, bloqueio átrioventricular, redução da força de contração isovolumétrica e da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (MASSARONI et al., 1995; ROSSONI et al., 1999; VASSALLO et al., 1999). Além disso, foi observado aumento da pressão sistólica ventricular direita e disfunção diastólica dos dois ventrículos, com conseqüente aumento da resistência vascular pulmonar (ROSSONI et al., 1999) e redução da força de contração dos músculos papilares pela inibição da atividade da ATPase miosínica (VASSALLO et al., 1999), ambos após exposição aguda a altas doses de HgCl₂. Em contrapartida, de acordo com Assis et al. (2003), a exposição aguda a 20 nM de HgCl₂ em corações isolados aumentou a pressão diastólica do ventrículo esquerdo.

Alguns estudos exploraram os efeitos do mercúrio nos leitos vasculares e observaram alterações de reatividade que parecem estar associadas principalmente a alterações na função endotelial. É bem conhecido que os desequilíbrios entre a formação de EROs e a capacidade antioxidante causam disfunção endotelial (KISHIMOTO et al., 1995a; 1995b; FÉLETOU, 2006; TOUYZ, 2004). Estudos mostraram que a exposição ao mercúrio, aguda ou crônica aumenta a formação de EROs, aumentando assim o estresse oxidativo (CHEN et al., 2005; HUANG; CHENG; LIN, 1996; MAHBOOB et al., 2001; REUS et al., 2003). Isso acontece, pois o mercúrio tem afinidade pelo grupamento –SH de alguns peptídeos, como a cisteína e glutatona, que são importantes antioxidantes em nosso organismo. Ao se ligar a elas, o mercúrio promove

inativação, favorecendo assim, o estresse oxidativo (HALBACH et al., 1981; YIN et al., 2008). Essas substâncias possuem importante impacto no sistema cardiovascular, uma vez que a exposição crônica ao HgCl₂ em ratos normotensos aumentou a reatividade vascular e reduziu a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) devido ao aumento da produção de EROs em artérias de condutância como a aorta e mesentérica de resistência (WIGGERS et al., 2008b; FURIERI et al., 2011; LEMOS et al., 2012). Somado a isso, as EROs podem acarretar em peroxidação lipídica, que também leva à disfunção do endotélio vascular, comprometendo assim, sua função modulatória (FÉLETOU; VANHOUTTE, 2006; HEINECKE, 1998; WITZTUM, 1994). A disfunção endotelial, por sua vez, está presente em doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose, IAM e DAC (HOUSTON 2007; SALONEN 2000; VIRTANEN 2005). Esses achados suportam o estudo de Salonen et al. (2000), que acompanhou por quatro anos homens com ingestão diária de peixes contaminados com mercúrio e concluiu que o acúmulo desse metal no organismo está associado a não só o desenvolvimento, como também à progressão acelerada de aterosclerose em carótidas desses indivíduos pela oxidação do LDL.

Também foi observado em ratos normotensos que a exposição crônica ao mercúrio a doses similares às aquelas encontradas em humanos expostos aumenta a reatividade vascular através do aumento da produção de prostanoídes vasoconstritores derivados da via da ciclooxygenase 2 (COX-2) (PEÇANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2013).

Tais efeitos deletérios do metal aumentam a resistência vascular e conseqüentemente induzem hipertensão arterial, como já foi demonstrado após exposição crônica ao mercúrio (WAKITA, 1987; CARMIGNANI; BOSCOLO, 1992; HOUSTON, 2007). Porém, os achados sobre impacto da exposição ao mercúrio sobre a pressão arterial sistólica (PAS) ainda são controversos e parecem depender da forma e da dose de exposição. Enquanto MASSARONI et al. (1995) e Rossoni et al. (1999), após exposição aguda a altas doses de cloreto de mercúrio, observaram redução na PAS, Machado et al. (2007) demonstraram efeito oposto. Por outro lado a exposição crônica de ratos normotensos ao HgCl₂ por 30 dias não promoveu alteração na PAS (WIGGERS et al., 2008b; LEMOS et al., 2012; RIZZETTI et al., 2017). Em contrapartida, o tratamento por 60 e 180

dias aumentou significativamente a PAS (CARMIGNANI; BOSCOLO 1992; RIZZETTI et al., 2017). Estes estudos mostram o impacto da exposição ao mercúrio em ratos previamente normotensos.

Para o melhor entendimento das alterações encontradas no presente estudo e como elas influenciam na reatividade vascular e pressão arterial, a seguir temos uma breve revisão sobre o endotélio vascular e seus fatores moduladores do tônus vascular.

1.4. Endotélio vascular

O endotélio vascular é constituído por uma camada de células encontradas entre o sangue e o músculo liso vascular (MLV) e é responsável por diversas funções: controle do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária, ação anti-inflamatória, inibição da adesão e migração de leucócitos e da proliferação de células musculares lisas (MONCADA et al., 1977; FÖRSTERMANN, 2006; DONATO et al., 2009). A regulação do tônus do MLV mediada pelo endotélio se dá por intermédio da liberação de fatores vasoativos com ação vasodilatadora ou vasoconstritora, portanto o endotélio é capaz de interferir na resistência vascular (RUBANYI, 1993). Os fatores vasodilatadores derivados do endotélio são o NO, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI₂). Já os fatores vasoconstritores derivados do endotélio são a angiotensina II, endotelina-1 e os metabólitos derivados da via do ácido araquidônico como tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandinas E₂ (PGE₂) e F₂ α (PGF₂α), além das EROs (FURCHGOTT; VANHOUTE, 1989; 1999; MONCADA et al., 1977; RUBANYI; VANHOUTTE, 1986; KIFOR; DZAU, 1987; FROLICH; FORSTERMANN, 1989). O desequilíbrio entre os fatores produzidos pelo endotélio é chamado de disfunção endotelial (MATURANA et al., 2007). Dessa forma, alterações na função endotelial podem levar à alterações na resistência vascular e, conseqüentemente, pressão arterial (RIZZONI et al., 1996; ROSSI et al., 1997) (Figura 1).

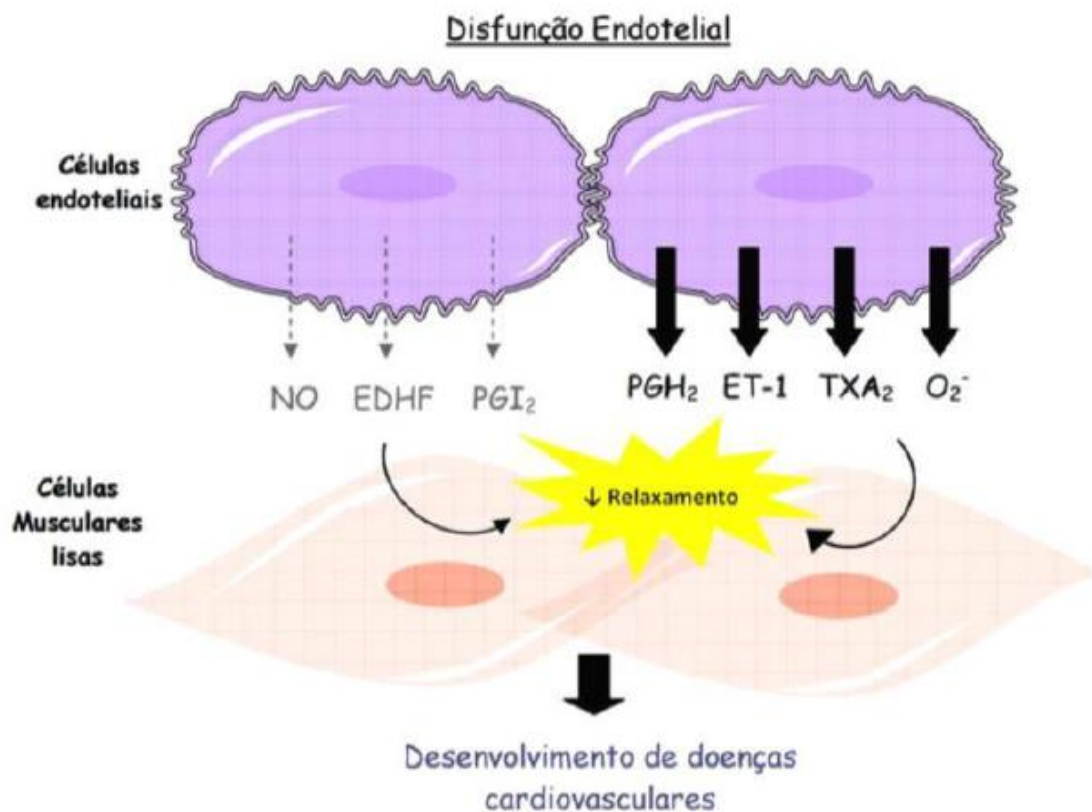


Figura 1: Ilustração demonstrando desequilíbrio entre a produção de fatores vasodilatadores (menor) e vasoconstritores (maior) derivados do endotélio como fator de risco para doenças cardiovasculares. (Botelho, 2016).

1.4.1. Fatores vasodilatadores derivados do endotélio

1.4.1.1. Óxido nítrico

O NO é uma molécula de gás com capacidade de difusão livre pelas membranas celulares e é considerado um radical livre (PALMER et al., 1987; MONCADA et al., 1989). Ele é formado a partir da L-arginina e oxigênio que, por ação da óxido nítrico sintase (NOS), é oxidada em L-citrulina. Essa reação pode ser catalisada pelas três formas existentes de NOS: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), ambas consideradas formas constitutivas e, por último, a óxido nítrico sintase indutível (iNOS), cuja expressão e atividade é induzida por estímulos inflamatórios (FORSTEMANN et al., 1994; XIE et al., 1992; DUSSE et al., 2003). A reação de produção do NO depende da presença de cofatores como NAD(P)H (adenina dinucleotídeo fosfato) e tetrahidropterina (BH₄) (MAYER; HEMMENS, 1997;

(FÖRSTERMANN, 2010; MUTCHLER; STRAUB, 2015). Esse evento é dependente do aumento da concentração de cálcio intracelular, que pode ser desencadeado pela estimulação de receptores (como os receptores de acetilcolina e bradicinina) de membrana das células endoteliais ou pelo aumento da força de cisalhamento sobre as células endoteliais, causando o *shear stress*, ativação da NOS e, conseqüentemente, geração de NO (LE MELLAY et al., 1997; CARVALHO et al., 2001).

O NO produzido no endotélio é prontamente difundido para as células do MLV. Neste local, ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que, por sua vez, converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento do GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), o que resulta em relaxamento do MLV por diversos mecanismos (Figura 2): diminuição da entrada de cálcio para o interior da célula pela ativação de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} ; aumento do sequestro de cálcio para o retículo sarcoplasmático pela ativação da SERCA; fosforilação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), provocando sua inibição; aumento da saída do Ca^{2+} pelo trocador Na^+/Ca^{2+} (DUSSE et al., 2003; IGNARRO; KADOWITZ, 1985; LINCOLN et al., 2001).

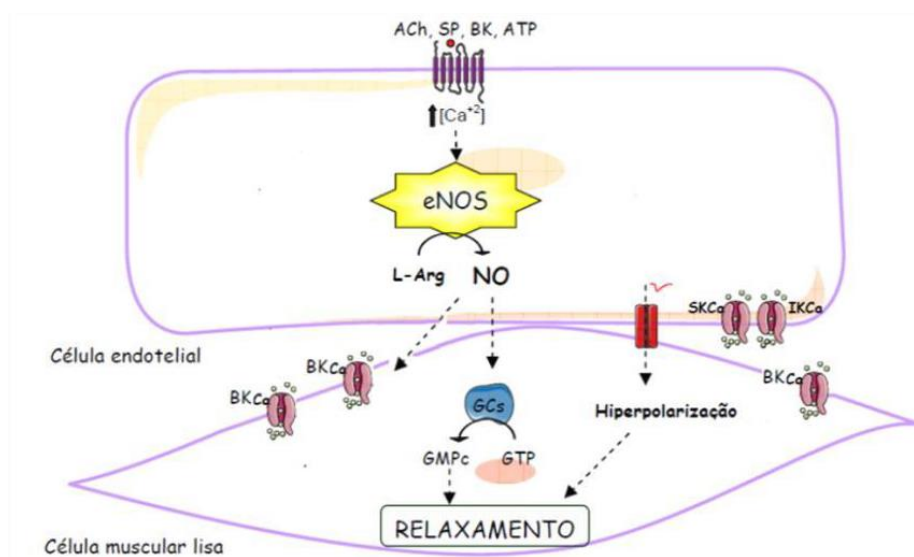


Figura 2: Cascata de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS e ativação da via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), culminando em relaxamento das células musculares lisas (Botelho, 2016).

A ação do NO pode ser prejudicada pela redução em sua geração, de forma indireta. As EROs podem diminuir a expressão ou atividade da eNOS através da interação com seus co-fatores e substratos (PEPINE, 2009; DE GENNARO et al., 2009). A ação do NO ainda pode ser prejudicada pela redução da sua biodisponibilidade, de forma direta, uma vez que o NO produzido no endotélio pode ser degradado ao interagir com as EROS, em especial o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Essa reação dá origem ao peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante (RUBANY; VANHOUTE, 1986; GAO; MANN, 2009). Alterações na síntese ou biodisponibilidade do NO está associada a fisiopatologia de doenças cardiovasculares, como a hipertensão (CHATTERJEE; CATRAVAS, 2008; BRIONES et al, 1999; CHANG 2002).

1.4.1.2. Prostaciclina

A PGI₂ é um prostanóide derivado da via da ciclooxigenase (COX). Existem duas isoformas da COX, a do tipo 1 (COX-1), considerada constitutiva e expressa na maioria das células, e a do tipo 2 (COX-2), induzida por estímulos inflamatórios (SMITH et al., 1996; WU, 1995; VANHOUTTE et al., 2005). A COX-1 e COX-2 são responsáveis por converter o ácido araquidônico (AA) em prostaglandina H₂ (PGH₂) que, por sua vez, pode ser convertida por ação de fosfolipases em PGI₂, PGE₂, PGF_{2a} e TXA₂, sendo os três últimos agentes vasoconstritores (MARDINI; FITZGERALD, 2001).

Em contrapartida, a PGI₂ contribui para a vasodilatação dependente do endotélio pois, ao se ligar ao seu receptor IR acoplado à proteína G, ocorre ativação da adenilato ciclase e consequente formação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; 2009). O aumento dos níveis de AMPc ativa a proteína quinase ativada por AMPc (AMPK) e a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), presente no MLV. A PKA reduz a atividade da quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), reduzindo a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC). Já a AMPK induz o relaxamento vascular pela abertura de canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), canais para potássio ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca}), canais de potássio retificadores de influxo (K_{IR}) e os canais de potássio ativados por voltagem (K_V) (CHANG et al., 1987; PARKINGTON et al., 1995; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; 2009).

1.4.1.3. Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Além do NO e da prostaciclina, existe um outro fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), o EDHF. A identidade do EDHF ainda é discutida, mas sabe-se que ele promove o relaxamento por meio da hiperpolarização das células do MLV, sem depender de aumentos intracelulares de GMPc, mas sim de Ca^{+2} intracelular. A vasodilatação ocorre pela ativação canais para potássio ativados por cálcio e a Na^+K^+ -ATPase (CARVALHO et al., 2001; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006). Os diferentes tipos de canais para potássio envolvidos no EDHF são os K_v , além dos canais para potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) de baixa (SK_{Ca}) e intermediária (IK_{Ca}) condutância, que estão localizados nas células endoteliais, e os de alta condutância (BK_{Ca}), localizados nas células do MLV (JACKSON, 2005; LEDOUX et al., 2006). O aumento das concentrações de Ca^{+2} intracelular ativa os SK_{Ca} e IK_{Ca} nas células endoteliais, gerando hiperpolarização do MLV através: da transmissão da hiperpolarização das células endoteliais para as células do MLV pelas *gap junctions*; aumento de K^+ extracelular pela hiperpolarização das células endoteliais, levando a ativação de BK_{Ca} no MLV; aumento de K^+ extracelular levando a ativação da bomba de Na^+K^+ -ATPase (ZYGUMUNT et al., 1997; SHIMOKAWA; MATOBA, 2004; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006). É importante ressaltar que, em vasos de resistência, dentre todos os EDRFs, o EDHF é o principal contribuinte para a vasodilatação dependente do endotélio (URAKAMI-HARASAWA et al., 1997). Assim, alterações na função dos canais para potássio também podem constituir a fisiopatologia de doenças cardiovasculares, como a hipertensão, fato já observado (KO et al., 2008).

1.4.2. Fatores vasoconstritores derivados do endotélio

1.4.2.1. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As EROs são metabólitos gerados principalmente pela mitocôndria. Portanto, sua geração ocorre tanto em condições fisiológicas, em decorrência da respiração celular, como também em condições patológicas (LEE; WEI, 2007). Porém, a mitocôndria não é a única fonte de EROs, podendo também ser gerada por enzimas como NAD(P)H oxidases, xantina oxidase, eNOS, lipooxigenases e

ciclooxigenases (CAI; HARRINSON, 2000; KOH et al., 2009). Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a síntese e a degradação das EROs. No entanto, em condições patológicas, o aumento em sua produção pode levar proliferação das células do MLV, aumento do tônus vascular, migração de mediadores inflamatórios e remodelamento vascular (MÜNDEL et al., 1999; TANIYAMA; GRIENDLING, 2003; SZASZ, 2007).

São exemplos de EROs o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), o ONOO^- , o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o $\text{O}_2^{\bullet-}$. Este último é considerado o mais importante radical livre, sendo formado pela redução de 1 elétron do O_2 a partir da NAD(P)H oxidase nos vasos, principalmente, e com importante característica vasoconstritora (WU et al, 2001; HAMILTON et al, 2001). A NAD(P)H oxidase é um complexo composto pelo citocromo b_{558} , que possui duas subunidades, a p22-phox e a Gp91Phox, também conhecida como NOX (ZALBA et al., 2001). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ formado pode interagir com NO, originando o ONOO^- (RUBANY; VANHOUTE, 1986; GAO; MANN, 2009) ou pode ser dismutado pela superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), superóxido dismutase citoplasmática (Cu, Zn-SOD) ou superóxido dismutase extracelular (EC-SOD), produzindo H_2O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O H_2O_2 pode ser metabolizado em H_2O e O_2 pela catalase ou em glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) pela glutathiona peroxidase (GPx). Pode também reagir com metais de transição, formando o $\text{OH}\cdot$ (GRIENDLING; USHIO-FUKAI, 2000). De todas as EROs, o H_2O_2 apresenta uma peculiaridade: pode ser um agente vasoconstritor ou vasodilatador e o que determina isso é o leito vascular e a concentração de peróxido (HAYABUCHI, 1998; FÉLÉTOU, 2009). O H_2O_2 , a depender das condições, pode ativar canais para potássio, induzindo relaxamento (FÉLÉTOU, 2009). Quando ocorre uma produção excessiva de EROs ou a capacidade antioxidante se torna insuficiente, tem-se o estresse oxidativo (PARAVICINI, 2008).

Estudos evidenciaram que o mercúrio, além de aumentar a produção de EROs por catalisar a reação de Fenton, também leva à depleção de importantes enzimas antioxidantes pela sua afinidade pelos radicais sulfidríla (SU et al., 2008; VALKO et al., 2006). Assim, o mercúrio pode ser caracterizado como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MAHBOOB et

al., 2001; REUS et al., 2003; HOUSTON, 2007; CLARKSON, 2003; VIRTANEN et al., 2005; KISHIMOTO et al., 1995a).

1.4.2.2. Prostaglandinas e tromboxano

As prostaglandinas PGE₂, PGF_{2α} e o TXA₂ são eicosanóides derivados da via da COX e, assim como a PGI₂, são formados a partir da conversão da PGH₂ por fosfolipases específicas (MARDINI; FITZGERALD, 2001). Uma vez produzidos, esses prostanóides vão se ligar aos seus receptores metabotrópicos específicos. Normalmente, a PGE₂ liga-se aos receptores EP₁ e EP₃, a PGF_{2α} liga-se ao receptor FP e o TXA₂ ao seu receptor, o TP. Ao se ligarem aos seus receptores, promovem vasoconstrição do MLV por dois mecanismos: aumento de Ca²⁺ intracelular, ou inibição da adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc (DAVDGE, 2001; WRIGHT et al., 2001). O tromboxano é o mais potente vasoconstritor derivado da COX (DAVDGE, 2001). É importante ressaltar que, embora o receptor TP tenha especificidade para o TXA₂, ele também pode ser ativado pela ligação a PGI₂, PGE₂, PGF_{2α} (WILLIAMS *et al.*, 1994; VANHOUTTE 2008).

Estudos prévios associaram a exposição crônica ao cloreto de mercúrio com o aumento da produção de vasoconstritores derivados da COX (PEÇANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2013).

1.4.2.3. Endotelina e angiotensina II

A endotelina é um peptídeo sintetizado por células endoteliais e células do MLV, que se apresenta em três possíveis isoformas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). A isoforma de maior relevância é a ET-1, pois é a única isoforma produzida pelo endotélio vascular. A ET-1 pode se ligar a dois tipos de receptores: o ET_A, localizado no MLV e o ET_B, localizado no endotélio. Quando a ET-1 se liga ao seu receptor específico ET_A, inicia a cascata de ativação da fosfolipase C, proteína quinase (PKC) e dos canais de Ca⁺² voltagem-dependentes, aumentando a concentração de Ca⁺² e, como resultado final, tem-se a vasoconstrição do MLV (BATLOUNI, 2001; SCHIFFRIN, 2005).

A angiotensina II é um produto do sistema renina-angiotensina e sua liberação está associada com o controle do tônus vascular e pressão arterial (GEISTERFER et al., 1988; BATLOUNI, 2001). Ela é liberada a partir de uma

cascatas de eventos. Quando ocorre queda da pressão arterial ou alteração do equilíbrio eletrolítico, as células justaglomerulares localizadas nos rins liberam renina, que converte angiotensinogênio em angiotensina I. Nos pulmões é produzida a enzima conversora de angiotensina (ECA) que, por sua vez, converte angiotensina I em angiotensina II. Uma vez formada, a angiotensina II pode exercer seus efeitos através da sua ligação a dois tipos de receptores: AT₁ ou AT₂ e, conseqüentemente, desencadear efeitos nos vasos sanguíneos, coração, sistema endócrino e rins. Portanto, tem a capacidade de regular a pressão arterial (DESCHEPPER, 1994; CRACKOWER, 2002). As ações mais relevantes da angiotensina II se dão pela sua ligação ao receptor AT₁ que ativará fosfolipases e lipooxigenases, resultando em: aumento do Ca²⁺ intracelular; produção de AA e de prostanóides derivados da COX e formação de leucotrienos vasoconstritores. Além disso, angiotensina II contribui para a formação de EROs por estimular a NAD(P)H oxidase. Esse conjunto de mecanismos induz vasoconstrição do MLV (BATLOUNI, 2001; SUZUKI et al., 2005; USHIO-FUKAI et al., 1999). Em contrapartida, a estimulação dos receptores AT₂ com relaxamento do MLV (BATLOUNI, 2001; STECKELINGS et al., 2005).

Assim, alteração no funcionamento do sistema renina-angiotensina podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a exposição crônica ao mercúrio parece favorecer esse mecanismo (GRIENGLING et al., 2000; WIGGERS et al., 2008a; PEÇANHA et al., 2010; GIUBERTI et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A alteração dos fatores descritos anteriormente pode contribuir para a disfunção endotelial, porém poucos estudos avaliaram a função endotelial em ratos jovens e nenhum estudo investigou o papel do mercúrio em SHRs com essa mesma idade. Cacanyiova et al. (2016) e Torok et al. (2006) compararam o papel do NO sobre o tônus vascular de segmentos de aorta torácica em ratos Wistar e SHR jovens sem nenhum tipo de tratamento, com idade de 4 semanas, e concluíram que a aorta dos ratos pré-hipertensos jovens apresenta menor poder de contratilidade e maior ativação de mecanismos vasodilatadores dependentes do endotélio, como o NO, mesmo ainda não existindo diferença na pressão arterial entre esses dois grupos.

Sabe-se que, em doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial sistêmica, ocorrem alterações na função e estrutura das artérias (PAULIS et al., 2012). No estudo de Cacanyiova et al. (2016) e Arribas et al. (2008) essas alterações foram encontradas ainda na fase pré-hipertensiva dos SHR, sugerindo que se trata de um processo adaptativo para a fase hipertensiva. É importante ressaltar também que existem poucos estudos que utilizam um modelo de exposição ao mercúrio semelhante ao processo de exposição humana, caracterizada por ser crônica e de baixas doses.

Diante da limitação de estudos e da capacidade agressiva do metal nos diversos órgãos e sistemas, torna-se relevante avaliar o papel do mercúrio na reatividade vascular e pressão arterial de ratos jovens, principalmente seus efeitos sobre os SHR durante a fase pré-hipertensiva. Embora esse estudo seja conduzido em animais, é possível, através dele, despertar a atenção dos órgãos públicos e da população para os efeitos deletérios do metal em questão, principalmente em indivíduos pré-hipertensos. A nossa hipótese é que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio possa acelerar o desenvolvimento de hipertensão arterial e alterar a reatividade vascular em SHRs jovens.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial sistólica e a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência de SHRs jovens, em estágio pré-hipertenso.

3.2. Objetivos específicos

- Estudar se a exposição crônica ao cloreto de mercúrio altera a evolução temporal da PAS, o ganho ponderal e a sobrecarga do ventrículo esquerdo;
- Investigar se a exposição crônica ao cloreto de mercúrio promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina e se modifica a participação de fatores endoteliais como o óxido nítrico, prostanóides, de canais para potássio e espécies reativas de oxigênio nessa resposta vascular em artérias mesentéricas de resistência;

- Verificar se a exposição crônica ao HgCl_2 afeta o relaxamento dependente do endotélio;
- Averiguar se a exposição crônica ao cloreto de mercúrio afeta o relaxamento independente do endotélio;
- Avaliar se o tratamento crônico com cloreto de mercúrio altera a expressão proteica da eNOS, da subunidade da NADPH oxidase, a Gp91Phox, da catalase e COX-2 nas artérias mesentéricas de resistência;
- Avaliar se o tratamento crônico com cloreto de mercúrio altera a produção vascular *in situ* de NO e $\text{O}_2^{\bullet-}$, através de análise de fluorescência por DAF-2 e DHE, respectivamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Em nosso estudo utilizamos animais da linhagem SHRs, com quatro semanas de idade, recém-desmamados. Os ratos foram cedidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro de 12-12 horas, com livre acesso a água e ração. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes de pesquisa estabelecidas pela Federação de Sociedades de Biologia Experimental e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA 09/2018).

4.2. Modelo experimental

Os animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos: o grupo SHR Controle (veículo) e o grupo SHR HgCl_2 . O grupo SHR Controle recebeu injeções intramusculares de NaCl 0,9% por 30 dias, enquanto o grupo SHR HgCl_2 recebeu injeções intramusculares de HgCl_2 pelo mesmo período com uma dose inicial de 4,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e doses subseqüentes de 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, para alcançar uma concentração plasmática final de aproximadamente 8 $\mu\text{g}/\text{L}$ de acordo com o

modelo de Wiggers et al. (2008a). Essa concentração foi a mesma encontrada em pessoas expostas e é considerada segura pelas agências de toxicovigilância. As doses foram ajustadas semanalmente com base nos pesos dos ratos.

4.3. Medida da pressão arterial e massa corporal

Para avaliar a evolução dos níveis pressóricos nos grupos experimentais, os animais foram submetidos à mensuração indireta da PAS no primeiro dia de tratamento (início) e, em seguida, semanalmente, até o final do tratamento de 30 dias (semana 1, 2, 3 e 4), de acordo com o método de Grizzo e Cordelline (2008). As medidas foram realizadas com o pletismógrafo de cauda (IITC Life Science–23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Antes do início das medidas pressóricas, os animais foram submetidos a um período de 3 dias para aclimação. Esta adaptação foi efetuada colocando-se os animais na estufa, de forma a mimetizar o método de mensuração da pressão arterial, a fim de reduzir o estresse dos animais e, conseqüentemente, amenizar as possíveis interferências durante o momento de obtenção dos valores pressóricos. Também foi investigado se o tratamento com HgCl₂ interferiu no ganho ponderal normal. Para isso, os ratos foram pesados semanalmente. Após avaliação da última pressão arterial os animais foram anestesiados com Ketamina (50mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) administrada por via intraperitoneal e eutanaziados para que fossem removidos o coração, o leito mesentérico e coletado o sangue para as análises funcionais e bioquímicas.

4.4. Avaliação da hipertrofia cardíaca

Para avaliar a presença ou não de hipertrofia cardíaca, foi realizada uma toracotomia e, posteriormente, o isolamento do coração. Em seguida, o ventrículo esquerdo (VE) foi cuidadosamente removido do coração, acondicionado em uma estufa a 37°C por 24 horas e, por fim, pesado em balança de alta precisão com a finalidade de se obter o peso seco do VE. A tibia foi retirada após a extração do leito mesentérico e seu comprimento mensurado com paquímetro, a fim de estimar o crescimento ósseo, sendo o peso seco do VE corrigido pelo comprimento da tibia do respectivo rato. A razão entre o peso do VE (g) e o comprimento da tibia (mm) foi calculada.

4.5. Estudo da reatividade vascular “*in vitro*” de artérias mesentéricas de resistência

Após a eutanásia, o leito mesentérico foi removido e acondicionado em uma placa de petri contendo solução gelada de Krebs-Henseleit a 4°C (em mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄.7H₂O, 2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 11,1 glicose e 0,01 Na₂EDTA). Posteriormente, com auxílio de um microscópio, o ramo de terceira ordem da artéria mesentérica, que corresponde à artéria mesentérica de resistência, foi dissecado e limpo de tecido adiposo e, em seguida, cortado em segmentos com aproximadamente 2 mm de comprimento (Figura 3). Estes segmentos foram montados em pequenas câmaras de miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca), entre dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) inseridos em seu lúmen para estudos de tensão isométrica, sendo um fio conectado a um transdutor de tensão, de forma a captar qualquer alteração do diâmetro do vaso.

O miógrafo foi conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e este, por sua vez, a um computador. Após 30 minutos de equilíbrio em solução de Krebs-Henseleit gaseificada com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂, pH 7,4) e aquecida a 37° C, os segmentos foram estirados a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada artéria a relação tensão:diâmetro interno foi calculada e a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mm Hg para um vaso relaxado *in situ* (L₁₀₀) foi determinada (Mulvany e Halpern, 1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna (L₁), calculado como $L_1 = 0,90 \times L_{100}$, circunferência na qual, o desenvolvimento de força é máximo (Mulvany e Halpern, 1977).

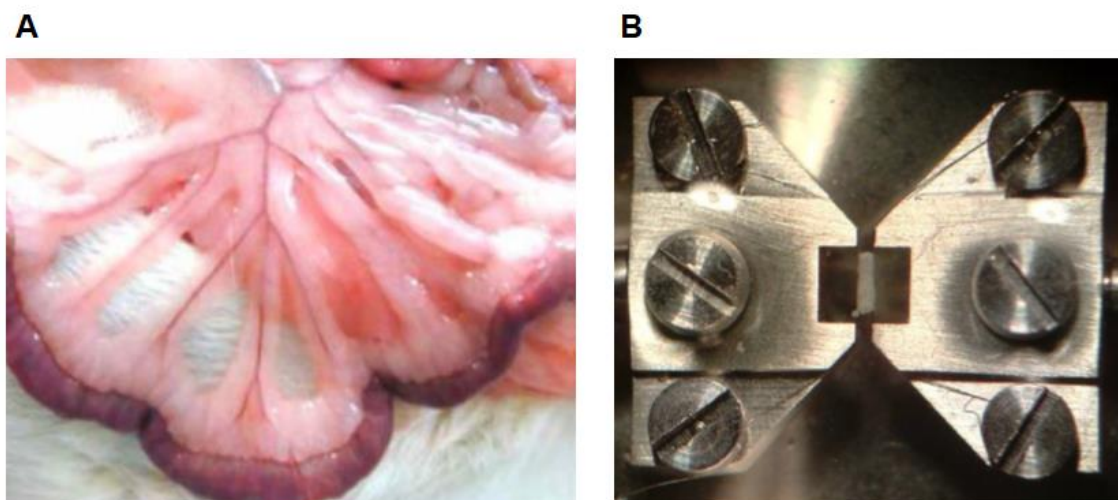


Figura 3: Artérias mesentéricas de resistência e câmara para estudo in vitro. Dissecção das artérias mesentéricas de resistência e ramos de terceira ordem indicados pelas setas pretas (A). Anel da artéria montado (2 mm de comprimento) em câmara do miógrafo (B) para análise de reatividade (Adaptado de Bertoli, 2017).

4.5.1. Protocolos experimentais

4.5.1.1. Avaliação da integridade do músculo liso e endotélio vascular

Após a normalização e um período de estabilização de 30 minutos, as artérias foram contraídas com solução de cloreto de potássio (KCl, 120 mM), a fim de avaliar a integridade do músculo liso vascular. Após o retorno a tensão basal, as artérias foram pré-contraídas com fenilefrina (10^{-7} a 10^{-6} M), até pelo menos 50% da contração máxima produzida por 120 mM de KCl, e em seguida uma única dose de acetilcolina (10^{-4} M) foi administrada a fim de comprovar a integridade do endotélio, que foi considerada aceitável quando o relaxamento à acetilcolina era maior que 80% (Figura 4).

4.5.1.2. Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para investigar o efeito do tratamento com HgCl_2 sobre a resposta vasoconstritora, após mais 30 minutos de estabilização foi realizada a curva dose-resposta à fenilefrina (10^{-8} a 10^{-3} M). A resposta vasoconstritora foi normalizada em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl, que foi considerada 100 % da resposta contrátil (Figura 4).

4.5.1.3. Influência do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos canais para o potássio e dos prostanóides derivados da COX sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina e suas possíveis alterações na exposição ao HgCl₂

O efeito do NO sobre a contração induzida por fenilefrina foi avaliado através da utilização de L-NAME (100 μ M), inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase. Para avaliar se a exposição ao HgCl₂ interfere na participação das espécies reativas do oxigênio sobre a resposta contrátil ao fenilefrina, artérias mesentéricas de resistência foram incubadas com Apocinina (30 μ M, um inibidor da NADPH oxidase) e Catalase (1000 U/ml, um “varredor” de peróxido de hidrogênio). Para avaliar a influência dos canais para o potássio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina, as artérias foram incubadas com tetraetilamônio (TEA, 2 mM), um bloqueador inespecífico de canais para potássio. Para avaliar o efeito do tratamento com HgCl₂ sobre a participação da via da COX na resposta contrátil à fenilefrina, as artérias foram incubadas com Indometacina (inibidor específico da COX, 5 μ M), CAY 10441 (antagonista de receptor de prostaciclina, 1 mM), SQ 29.548 (antagonista de receptor de tromboxano A₂, 1 μ M) e SC 19.220 (antagonista do receptor 1 de prostaglandina E₂, 10 μ M). (Figura 4).

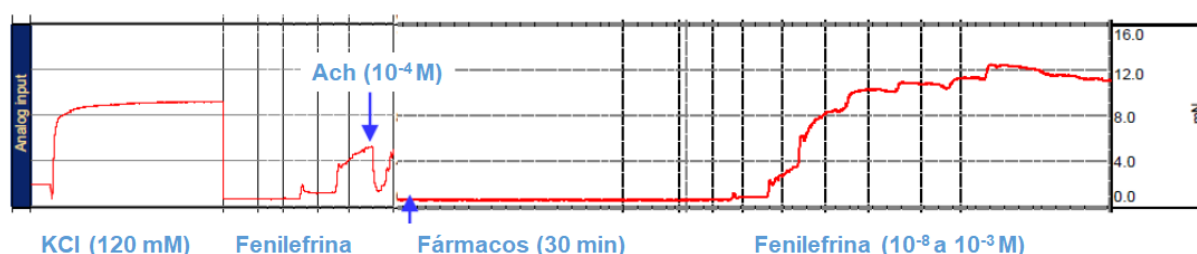


Figura 4: Representação do protocolo experimental. Esquema representativo do protocolo experimental realizado para avaliar a integridade do músculo liso, do endotélio e a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos. KCl = cloreto de potássio; Ach = acetilcolina (adaptado de Simões, 2015).

4.5.1.4. Avaliação da resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio

Para avaliar a resposta vasodilatadora dependente do endotélio foram realizadas curvas dose resposta à acetilcolina (10^{-11} a 10^{-5} M) em artérias previamente contraídas com fenilefrina, avaliando-se o percentual de redução da

tensão em relação ao estado pré-contraído. A vasodilatação independente do endotélio foi avaliada por meio da resposta ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-11} a 10^{-5} M), também realizada nas artérias previamente contraídas com fenilefrina, avaliando-se o percentual de redução da tensão em relação ao estado pré-contraído (Figura 5).

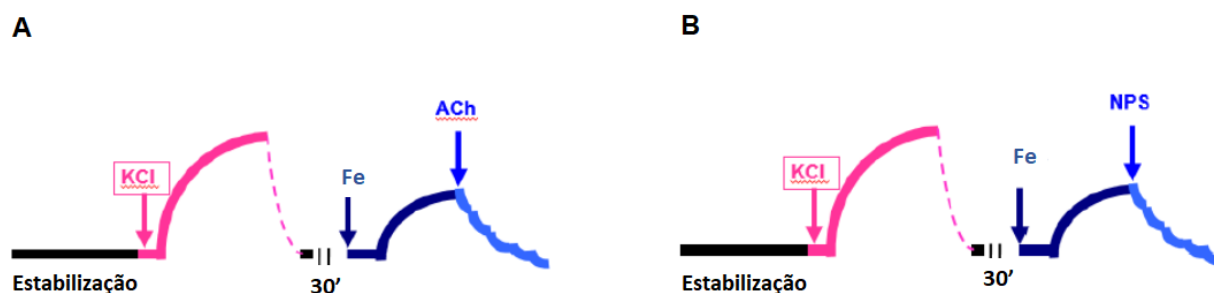


Figura 5: Esquema ilustrativo do protocolo de reatividade vascular. Resposta vasodilatadora dependente do endotélio demonstrada em A e resposta vasodilatadora independente do endotélio demonstrada em B. KCl = cloreto de potássio; Fe = fenilefrina; Ach = acetilcolina; NPS = nitroprussiato de sódio (Adaptado de Bertoli, 2017).

4.5.1.5. Detecção vascular *in situ* da produção de ânion superóxido

O corante fluorescente oxidativo dihidroetidio (DHE) foi utilizado para avaliar a produção vascular do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) *in situ*, como descrito anteriormente (WIGGERS et al., 2008b). Os ramos de MRA foram tratados com sacarose 30% e congelados em meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek - OCT (Bayer) a $-80^{\circ}C$. Em seguida, foram cortados transversalmente em um criostato (CM 1900) em anéis de 10 μm de diâmetro. Os anéis foram dispostos em lâminas de vidro por 30 min a $37^{\circ}C$ 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, após um período de secagem, eles foram expostos a um banho com DHE (2 μM) e incubados por 30 min em uma câmara úmida a $37^{\circ}C$. Imagens digitais foram adquiridas com uma ampliação de 400x por microscopia óptica de fluorescência (Nikon Eclipse Ti, Melville, NY, EUA). Imagens dos grupos SHR Controle e HgCl₂ foram obtidas com os mesmos ajustes e analisadas pelo software MetaMorph (Molecular Devices LLC, São José, Califórnia, EUA). A média das densidades das fluorescências foi calculada

4.5.1.6. Detecção vascular *in situ* da produção de óxido nítrico

A produção *in situ* de NO foi determinada utilizando 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), conforme descrito por Ribeiro Júnior et al. (2016). Os ramos de MRA foram tratados com sacarose 30% e congelados em meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek - OCT (Bayer) a -80°C. Em seguida, foram cortados transversalmente em um criostato (CM 1900) em anéis de 10 µm de diâmetro. Os anéis foram dispostos em lâminas de vidro por 30 min a 37°C em tampão de fosfato (0,1 M) contendo CaCl₂ (0,45 mM). Em seguida, após um período de secagem, eles foram incubados por 30 min em uma câmara úmida a 37°C com DAF-2 (8 mM) em tampão fosfato (0,1 M) contendo CaCl₂ (0,45 mM). Após 30 min, imagens digitais foram adquiridas com uma ampliação de 400x por microscopia óptica de fluorescência (Nikon Eclipse Ti, Melville, NY, EUA). As imagens foram analisadas usando o software MetaMorph.

4.5.1.7. Estudo da expressão proteica pelo método de *Western Blot*

Amostras congeladas de MRAs foram sonicadas com tampão RIPA gelado (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). Os homogeneizados foram centrifugados a 6000 rpm, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). A solução de Laemmli foi adicionada a alíquotas contendo 40 µg de proteína de cada animal e as amostras foram carregadas em 7,5, 10 ou 12% acrilamida TGX Stain-Free Gels (Bio-Rad). As proteínas foram separadas por eletroforese em um sistema de células Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad) por 2 horas a 120 V em tampão contendo 140 mM de glicina, 37 mM Tris base e 1% de dodecil sulfato de sódio (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). Os géis foram então activados por irradiação com UV (Sistema de Imagiologia ChemiDoc XRS +, Bio-Rad) durante 1 minuto, o que produziu um sinal fluorescente a partir dos resíduos de triptofano presentes nas proteínas. As proteínas separadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) durante 18 horas a 0,25 A numa solução de transferência arrefecida com gelo contendo glicina 140 mM, base Tris 37 mM e 20% de metanol. O teor total de proteína para cada amostra foi determinado por imagiologia da emissão de fluorescência (ChemiDoc XRS +, Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé) em solução Tris-tamponada (25 mM,

NaCl 137 mM) com Tween 20 (0,2%, TBST) por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente e incubadas com anticorpos primários diluídos em TBST, incluindo anti-Gp91Phox (1: 700 , BD Transduction Laboratories, San Jose, EUA), anti-COX 2 (1: 800, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), catalase (1: 14000, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e anti-peNOS Ser1177 (1: 500, BD Transduction Laboratories, San Jose, EUA), sob agitação durante a noite a 4 °C. Depois de cuidadosamente lavadas, as membranas foram incubadas com conjugado de StrepTactin-HRP (1: 5000) e anti-camundongo (1: 5000, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) ou anti-coelho (1: 5000, Sigma-Aldrich , St. Louis, EUA), anticorpos secundários, em albumina de soro bovino a 3% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) em TBST durante 1 h com agitação antes de serem novamente lavados com TBST. Um substrato quimioluminescente (ácido cumárico 0,2 mM, luminol 1,25 mM, Tris-HCl 0,1 M e peróxido de hidrogênio a 0,06%) foi adicionado às membranas e as imagens foram obtidas com um sistema ChemiDoc XRS +. A intensidade da luminescência foi quantificada e normalizada pelo conteúdo total de proteínas da amostra usando o Image Lab 6.0.1 Software (Bio-Rad).

4.5.2. Fármacos e reagentes utilizados

- Albumina bovina (Sigma)
- Anti-catalase (Sigma-Aldrich)
- Anticorpo de camundongo (Sigma-Aldrich)
- Anticorpo de coelho (Sigma-Aldrich)
- Anti-COX 2 (Cayman Chemical)
- Anti-Gp91Phox (BD Biosciences)
- Anti-peNOS Ser1177 (BD Biosciences)
- Apocinina (Sigma-Aldrich)
- Catalase (Sigma-Aldrich)
- CAY 10441 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA)
- Cetamina (Vetnil)
- Cloreto de acetilcolina (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de mercúrio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Cloreto de potássio (Merck)

- Cloridrato de etraetilamônio (TEA) (Sigma-Aldrich)
- Cloridrato de fenilefrina (Sigma-Aldrich)
- DHE (Sigma-Aldrich)
- Glicose (Merck)
- Indometacina (Sigma-Aldrich)
- Leite desnatado (Molico)
- Meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek OCT (Bayer)
- N(W)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma-Aldrich)
- Nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (BioRad)
- Sacarose (Merck)
- SC 19220 (Cayman Chemical)
- SQ 29,548 (Cayman Chemical)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (BioRad)
- Xilazina (Ceva)

Os sais e reagentes, quando não especificados, eram de grau analítico e foram obtidos da Sigma-Aldrich e da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.5.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM. Os dados foram analisados através do teste *t de Student* não pareado para comparação entre duas médias ou ANOVA de duas-vias para comparação entre várias médias, seguida do pós-teste de Bonferroni. Para comparar as magnitudes dos efeitos do tratamento na resposta vascular contrátil, foram calculadas as diferenças nas áreas abaixo das curvas (dAUCs) entre os grupos. Para a análise da expressão proteica, os dados foram expressos como a razão entre os sinais no imunoblot correspondente à proteína estudada e a proteína total. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Graph Prism Software 6 (San Diego, CA, USA). $P < 0,05$ foi considerado para indicar significância.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da massa corporal e pressão arterial sistólica

Os valores de massa corporal foram semelhantes entre os grupos SHR Controle vs SHR HgCl₂ do início (Controle: 66 ± 8,76 g vs HgCl₂: 77 ± 19,46 g; teste *t* – *P* > 0,05) ao final do tratamento (Controle: 178 ± 23,5 g vs HgCl₂: 184 ± 16,9 g; teste *t* – *P* > 0,05), evidenciando que a exposição por 30 dias ao HgCl₂ não influencia no ganho ponderal.

Ao longo das semanas de tratamento, é possível observar aumento na PAS em ambos os grupos, porém a exposição ao HgCl₂ acelerou significativamente o desenvolvimento de hipertensão em relação ao grupo SHR Controle (Figura 6).

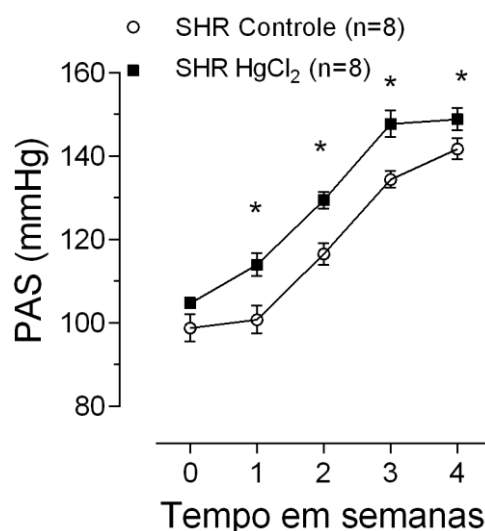


Figura 6: Efeito da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial sistólica. Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) medidos através de pletismografia de cauda em SHR Controle e intoxicados com HgCl₂ durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como média ± EPM. **P* < 0,05 vs SHR Controle. ANOVA 2-vias seguida de pós teste de Bonferroni.

5.2. Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a sobrecarga do ventrículo esquerdo

A presença ou não de hipertrofia cardíaca em ambos os grupos foi analisada pela relação peso do ventrículo esquerdo seco dividido pelo comprimento da tíbia (mm). O peso do VE e comprimento da tíbia não foram diferentes entre os grupos estudados (Peso VE- SHR Controle: 113 ± 6 mg (n =

10); SHR HgCl₂: 103 ± 4 mg (n = 10), (Comprimento da tíbia – SHR Controle: 29,58 ± 0,59 mm (n = 10); SHR HgCl₂: 30,17 ± 0,51 mm (n = 10); P > 0,05). A razão peso VE (g)/comprimento da tíbia (mm), obtida para se estimar a hipertrofia cardíaca, também não foi diferente entre os grupos (Figura 7).

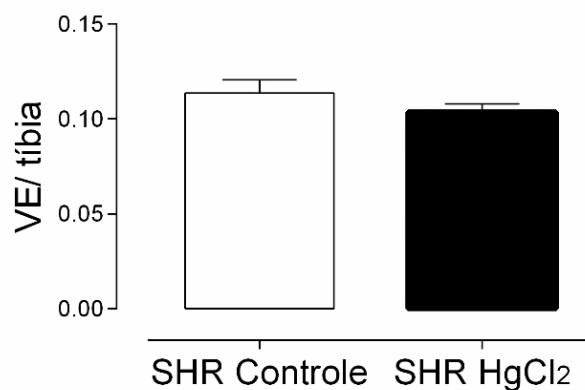


Figura 7: Efeito da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre a sobrecarga do ventrículo esquerdo. Análise da hipertrofia cardíaca dos SHRs na ausência (Controle) e presença de HgCl₂ analisados pela razão peso (g) ventrículo esquerdo (VE) seco pelo comprimento da tíbia (mm). Os resultados estão expressos em média ± EPM. P > 0,05 vs SHR Controle. *Teste t de Student* não pareado. Todos os grupos apresentaram n=10.

5.3. Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência

5.3.1. Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)

Não houve diferença entre os valores de contração induzida por 120 mM de KCl dos grupos SHR Controle (2,28 ± 0,16 mN/mm; n=9) e SHR HgCl₂ (2,26 ± 0,27 mN/mm; n=9), sugerindo que o tratamento com cloreto de mercúrio não interfere na resposta vascular ao KCl, o que sugere que, mesmo após a exposição ao metal, o músculo liso vascular permaneceu íntegro.

5.3.2. Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina e sobre a resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio

A exposição crônica ao HgCl₂ foi capaz de reduzir a reatividade vascular à fenilefrina em anéis de MRA isolados do grupo SHR HgCl₂, quando comparado

ao grupo SHR Controle (Figura 8A). Em contrapartida, não houve diferenças na resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio (Figura 8B e C, respectivamente) em nenhum dos grupos estudados.

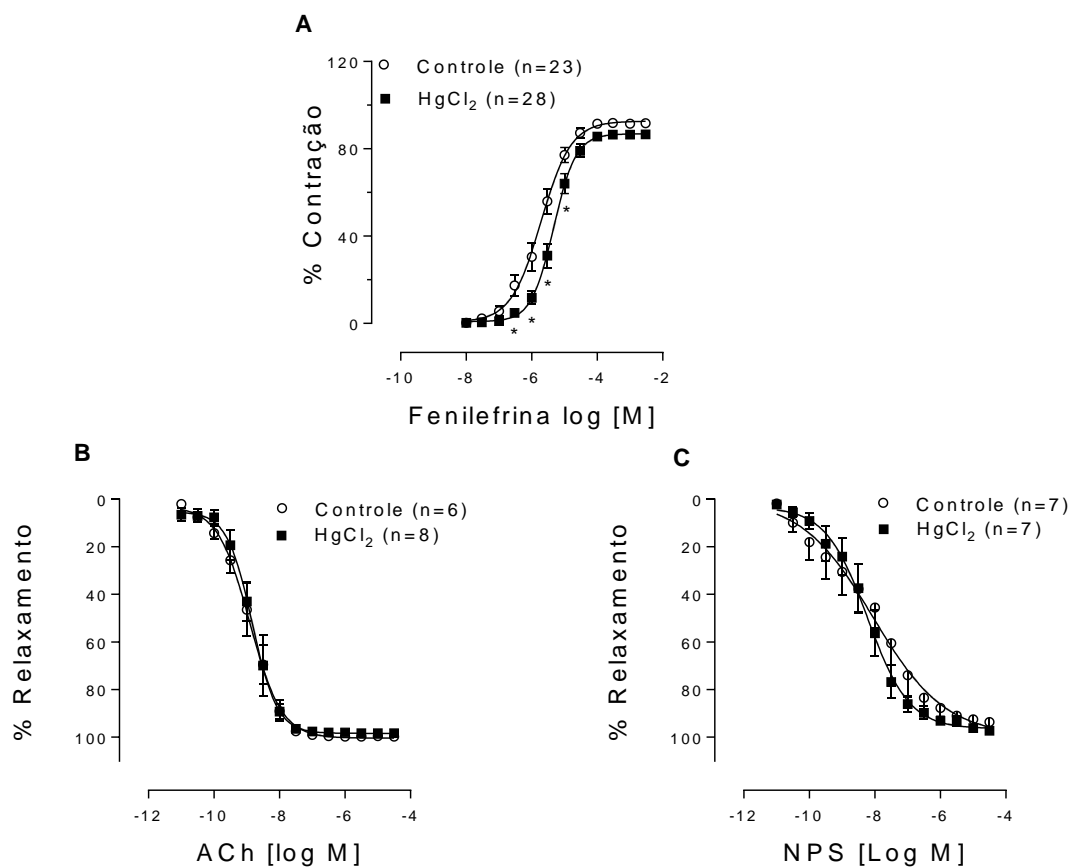
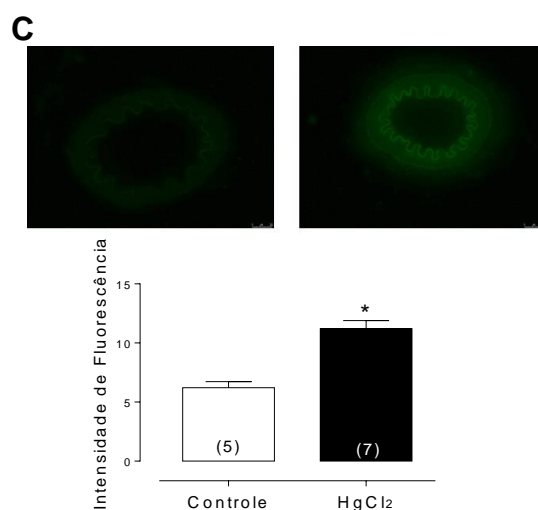
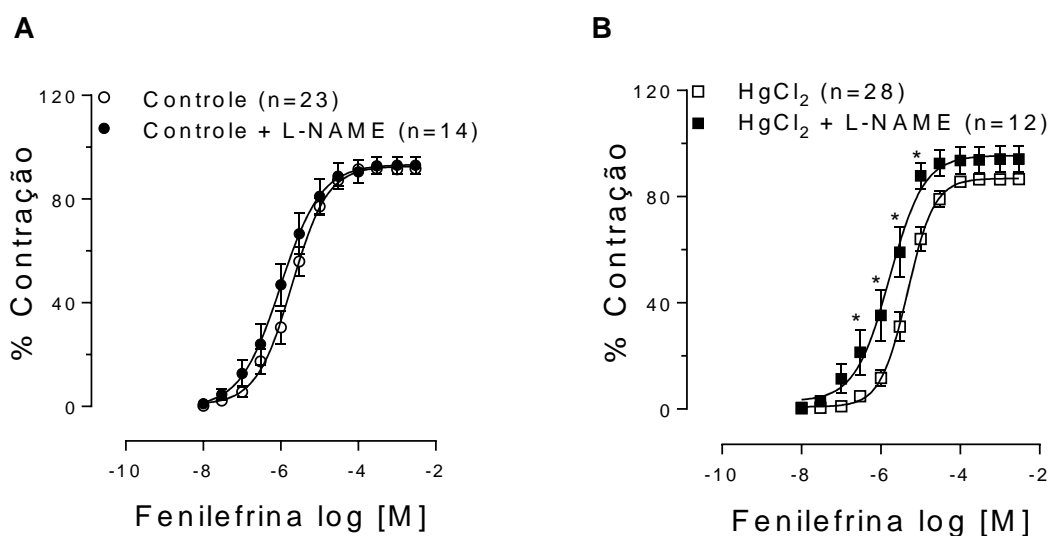


Figura 8: Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre a reatividade vascular de MRAs. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de MRA expostos e não expostos ao HgCl₂ (A). Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de MRA expostos e não expostos ao HgCl₂ (B). Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de MRA expostos e não expostos ao HgCl₂ (C). Os resultados estão expressos como média ± EPM. *P < 0,05 vs SHR Controle. ANOVA 2-vias seguido de pós teste de Bonferroni. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses.

Com o objetivo de avaliar a participação dos fatores vasoativos nessa resposta, foram realizados os protocolos a seguir, com seus respectivos resultados.

5.3.3. Influência do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina

Para investigar se a exposição crônica ao HgCl_2 alterou o papel do NO na resposta vasoconstritora à fenilefrina, segmentos arteriais com endotélio intacto foram pré-incubados com L-NAME (100 μM). A incubação com L-NAME aumentou a reatividade vascular apenas no grupo SHR HgCl_2 (Figura 9A e B). Diante desse achado, quantificamos a produção *in situ* de NO detectado por DAF-2, sendo observado aumento na produção desse agente vasodilatador em anéis de MRA expostos ao HgCl_2 . Apesar disso, não observamos alterações na expressão da eNOS fosforilada pelo método de *Western Blot* (Figura 9C e D).



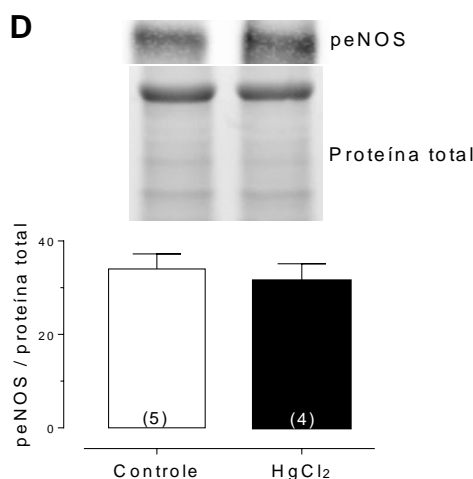
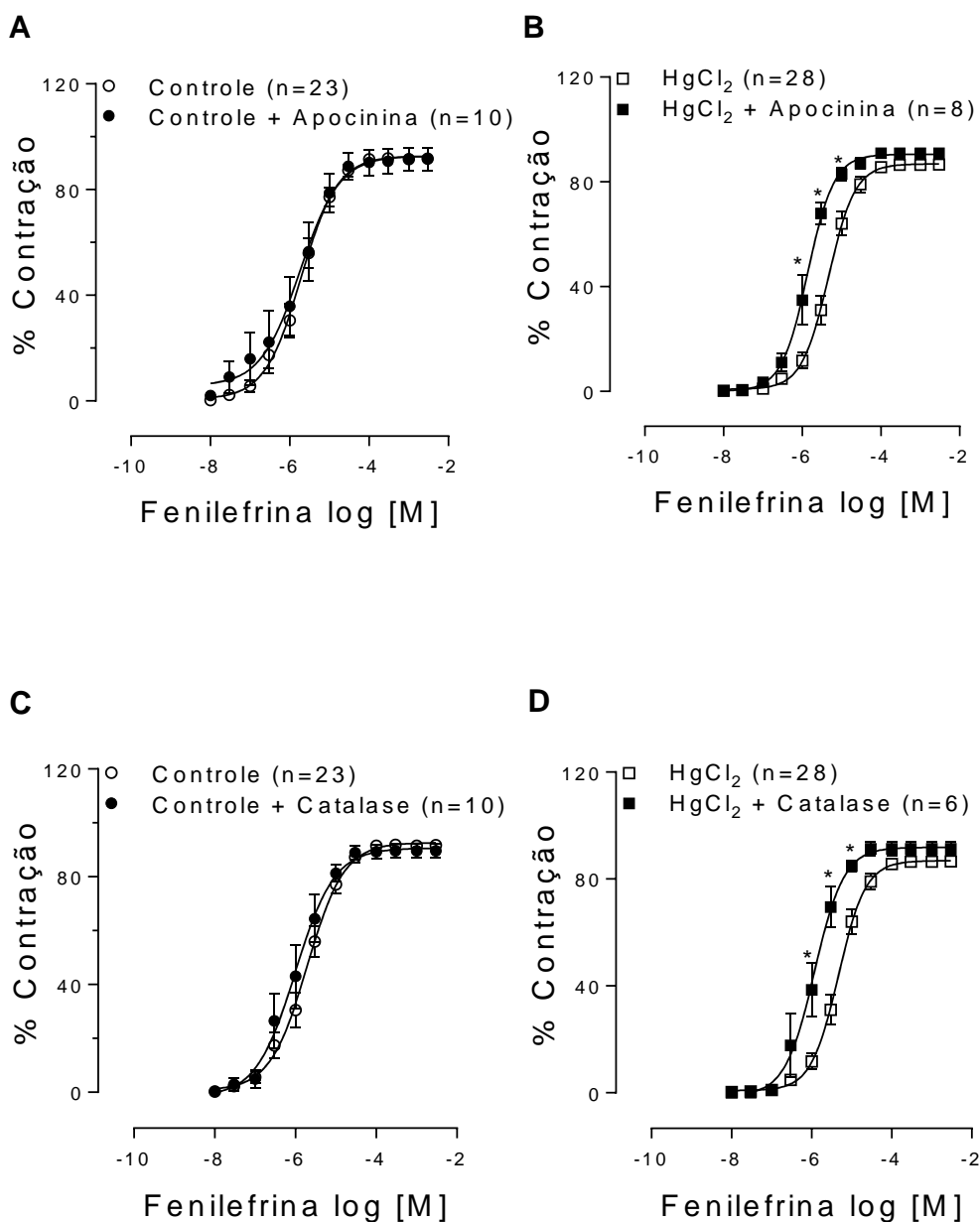


Figura 9: Efeitos da exposição crônica ao mercúrio na resposta vasodilatadora mediada por NO em anéis de MRA. Efeito do bloqueio com L-NAME (100 μ M) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de MRA dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B) na ausência e presença de L-NAME. (C) Microfotografias fluorescentes marcadas com DAF-2 e análise densitométrica dos resultados de *Western Blot* para expressão da eNOS fosforilada (peNOS) (D). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs SHR Controle. ANOVA duas-vias seguida do teste de Bonferroni para A e B. Teste *t de Student* não pareado para C e D. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

5.3.4. Efeito das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

O mercúrio tem a capacidade de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (CHEN et al., 2005; HUANG; CHENG; LIN, 1996; MAHBOOB et al., 2001; REUS et al., 2003; WIGGERS et al., 2008b). Para analisar se a exposição crônica ao cloreto de mercúrio alterou a produção das EROS em anéis de MRAs, a contração à fenilefrina foi avaliada na presença de um inibidor da NADPH oxidase, a apocinina (30 μ M) e da enzima “varredora” de H₂O₂, a catalase (1000 U/ml). A incubação com apocinina promoveu aumento significativo da resposta vasoconstritora à fenilefrina no grupo SHR HgCl₂, o que sugere maior participação do O₂^{•-} (Figura 10A e B). Diante dessa resposta vascular, partimos da hipótese que o H₂O₂ estaria atuando nesse leito vascular, induzindo vasodilatação. Para testar a hipótese, incubamos os anéis com catalase, também sendo observado aumento da reatividade no grupo exposto, fato que confirmou a participação do H₂O₂ como um agente vasodilatador (Figura 10C-D) envolvido na redução da reatividade observado no grupo SHR HgCl₂ (Figura 8A).

Corroborando esses achados, a análise por DHE confirmou o aumento na produção vascular de $O_2^{\bullet -}$ (Figura 10E) e a análise pelo método de *Western Blot* indicou um aumento na expressão da Gp91Phox (Figura 10F), ambos apenas no grupo SHR $HgCl_2$. Sabendo que o aumento na produção de H_2O_2 poderia ocorrer pela redução da expressão da catalase, realizamos a análise pelo método de *Western Blot*, porém, não encontramos diferenças na expressão dessa enzima entre os grupos estudados (Figura 10G).



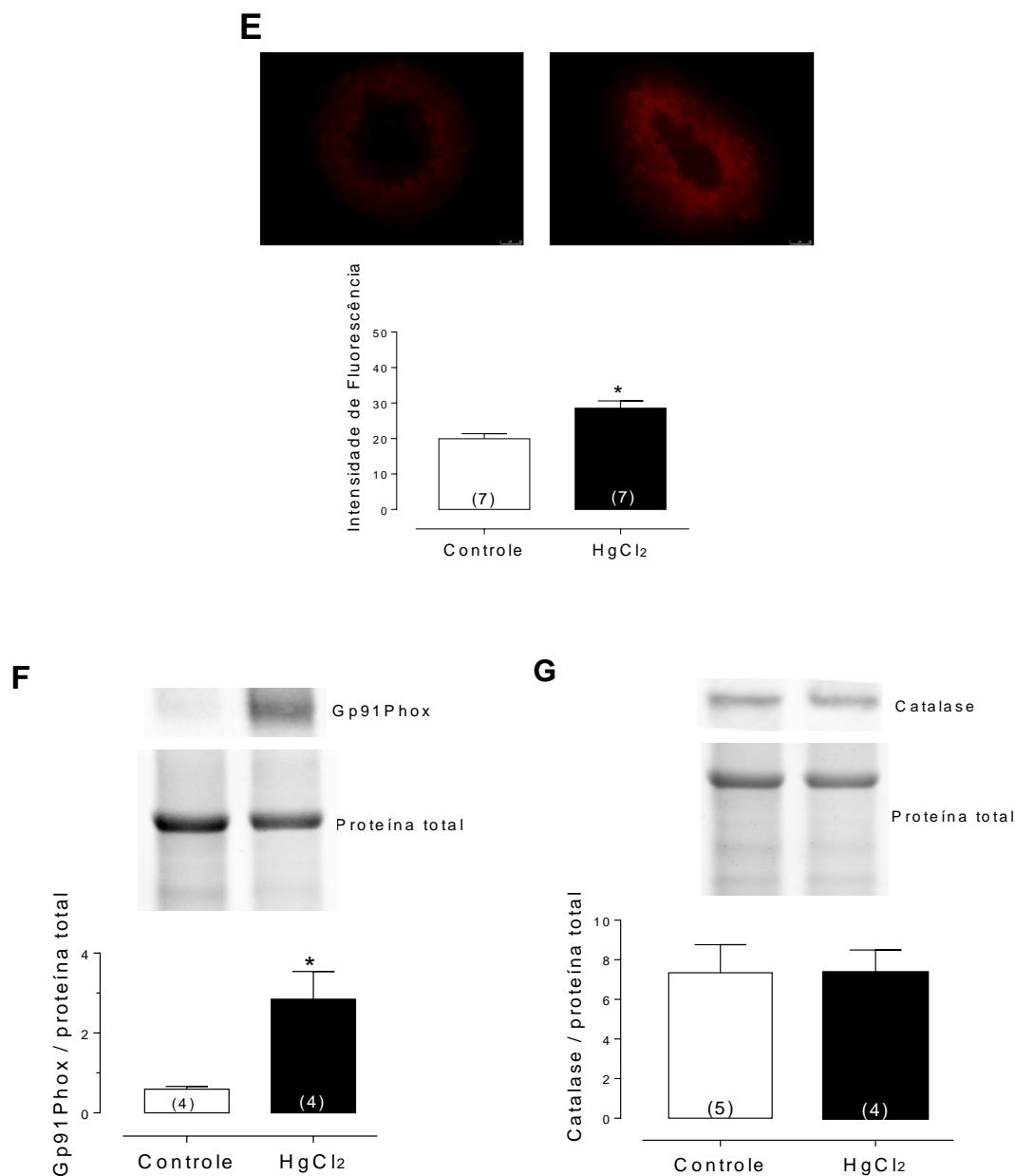


Figura 10: Exposição crônica ao cloreto de mercúrio aumenta o estresse oxidativo. Efeito da apocinina (30 μ M) sobre a reatividade vascular à fenilefrina em segmentos de MRA dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). Curva concentração-resposta à fenilefrina na presença e ausência da catalase (1000 U / mL) em segmentos de MRA dos grupos Controle (C) e HgCl₂ (D). (E) Produção vascular ânion superóxido em segmentos de MRAs e análise da expressão proteica pelo método de *Western Blot* da Gp91Phox (F) e catalase (G). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs SHR Controle. ANOVA duas-vias seguida do pós-teste de Bonferroni para A-D. Teste *t* de Student não pareado para E-G. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses.

5.3.5. Influência dos canais para potássio na reatividade vascular após a exposição crônica ao cloreto de mercúrio

Com o intuito de melhor investigar o efeito da exposição crônica ao HgCl_2 na resposta vascular à fenilefrina, também avaliamos o papel modulador do EDHF, que apresenta maior ação em artérias de resistência (Urakami-Harasawa et al., 1997). Somado a isso, já foi demonstrado que o H_2O_2 pode induzir vasodilatação através de sua ação sobre os canais para potássio. Dessa forma, investigamos o papel desses canais na reatividade vascular após a exposição ao mercúrio. Para isso, curvas concentração-resposta à fenilefrina foram realizadas na presença do tetraetilamônio, TEA (2 mM), um bloqueador inespecífico de canais para potássio. No entanto, não houve alteração na resposta contrátil em nenhum dos grupos estudados (Figura 11A e B). Diante deste resultado, para avaliar qual seria o agente vasodilatador com maior participação na redução da reatividade vascular encontrada no grupo exposto, NO ou H_2O_2 , (Figura 8A), co-incubamos os anéis com TEA + L-NAME e TEA + catalase, sendo observado aumento na resposta contrátil apenas nos grupos expostos a HgCl_2 para ambas as co-incubações. Entretanto foi maior na co-incubação com o TEA + L-NAME (Figura 11C-F).

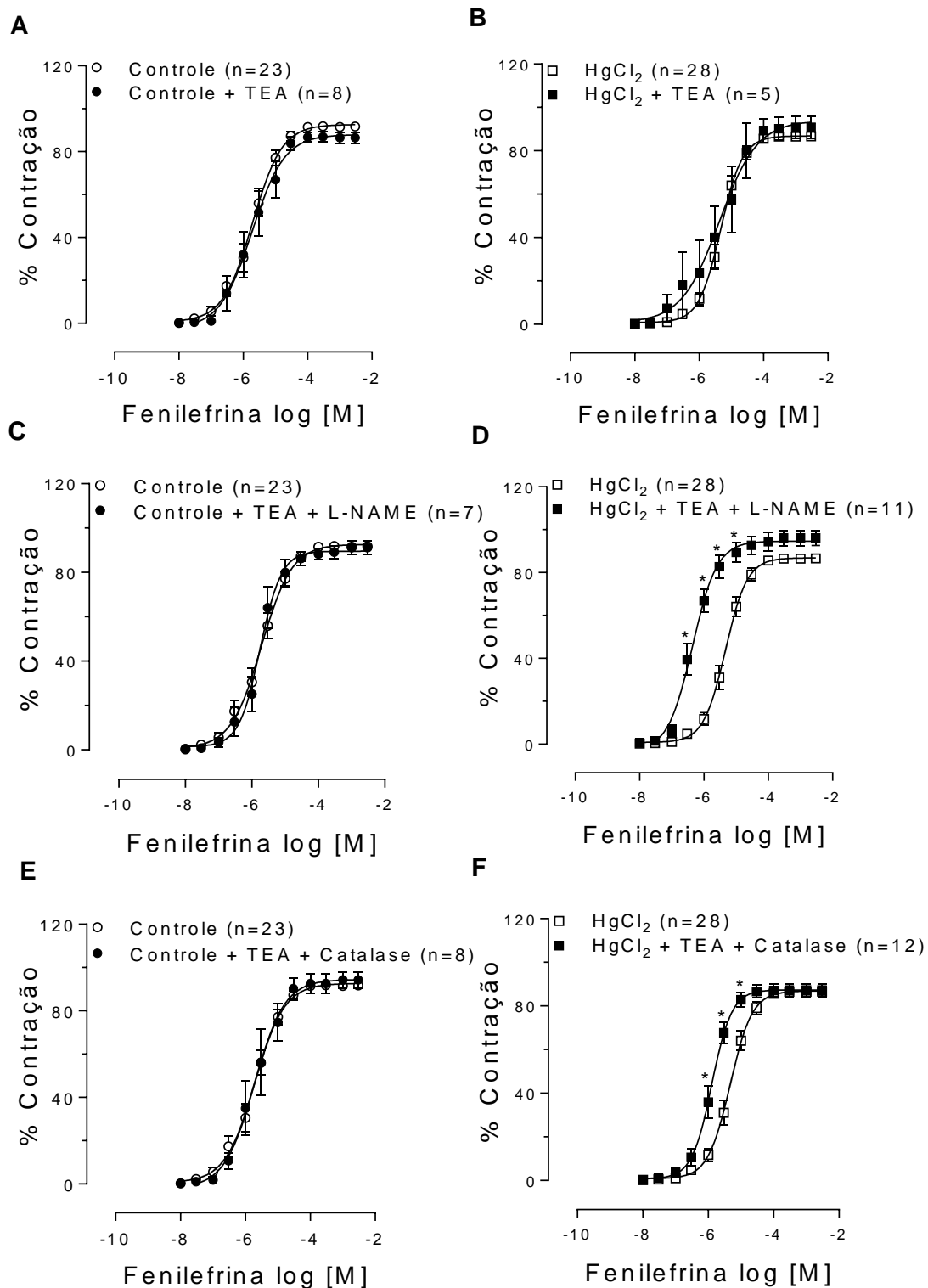
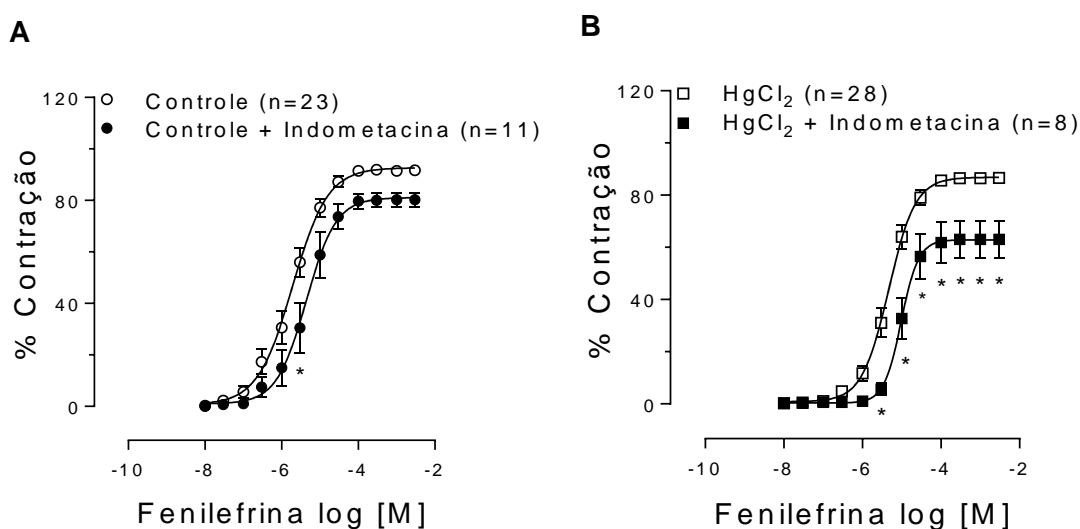


Figura 11: Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre os canais para potássio. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de MRA expostos ou não cronicamente ao cloreto de mercúrio, na presença do TEA (A e B), TEA + L-NAME (C e D) e TEA + Catalase (E e F). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *P < 0,05 vs SHR Controle. ANOVA 2-vias

seguido de pós teste de Bonferroni. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses.

5.3.6. Influência dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para investigar se a exposição crônica ao cloreto de mercúrio altera a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência dos grupos SHR Controle e HgCl₂, incubamos os anéis com Indometacina (5 μM), CAY 10441 (1 mM), SQ 29.548 (1 μM) e SC 19220 (10 μM). A presença de indometacina promoveu uma redução de reatividade à fenilefrina em ambos os grupos, porém de maior magnitude no grupo exposto ao HgCl₂ (Figura 12A, B e C). Os resultados foram comparados através do cálculo da diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos (Figura 12C). Estes resultados indicam que a exposição crônica ao mercúrio altera a participação da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de SHRs, provavelmente estimulando a produção de algum prostanóide vasconstritor. Este achado foi reforçado pelos resultados da análise de *Western Blot*, que indicou um aumento na expressão proteica da COX-2 (Figura 12D) no grupo exposto ao mercúrio.



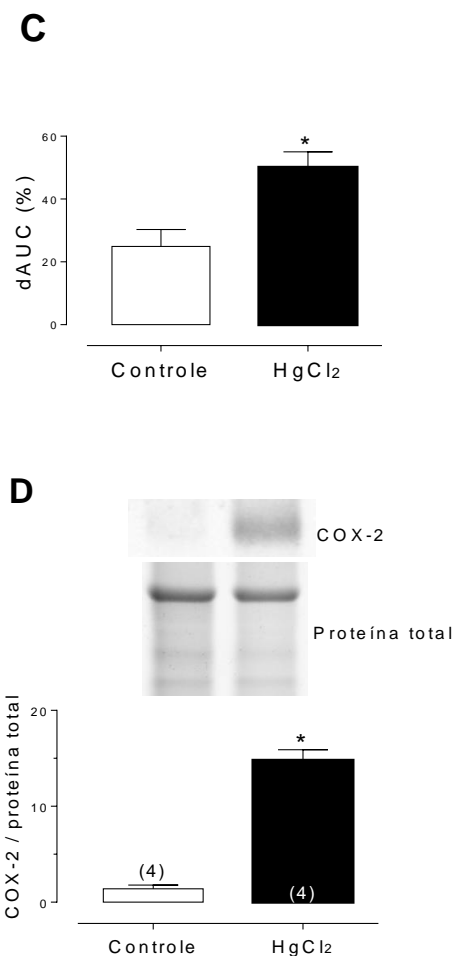
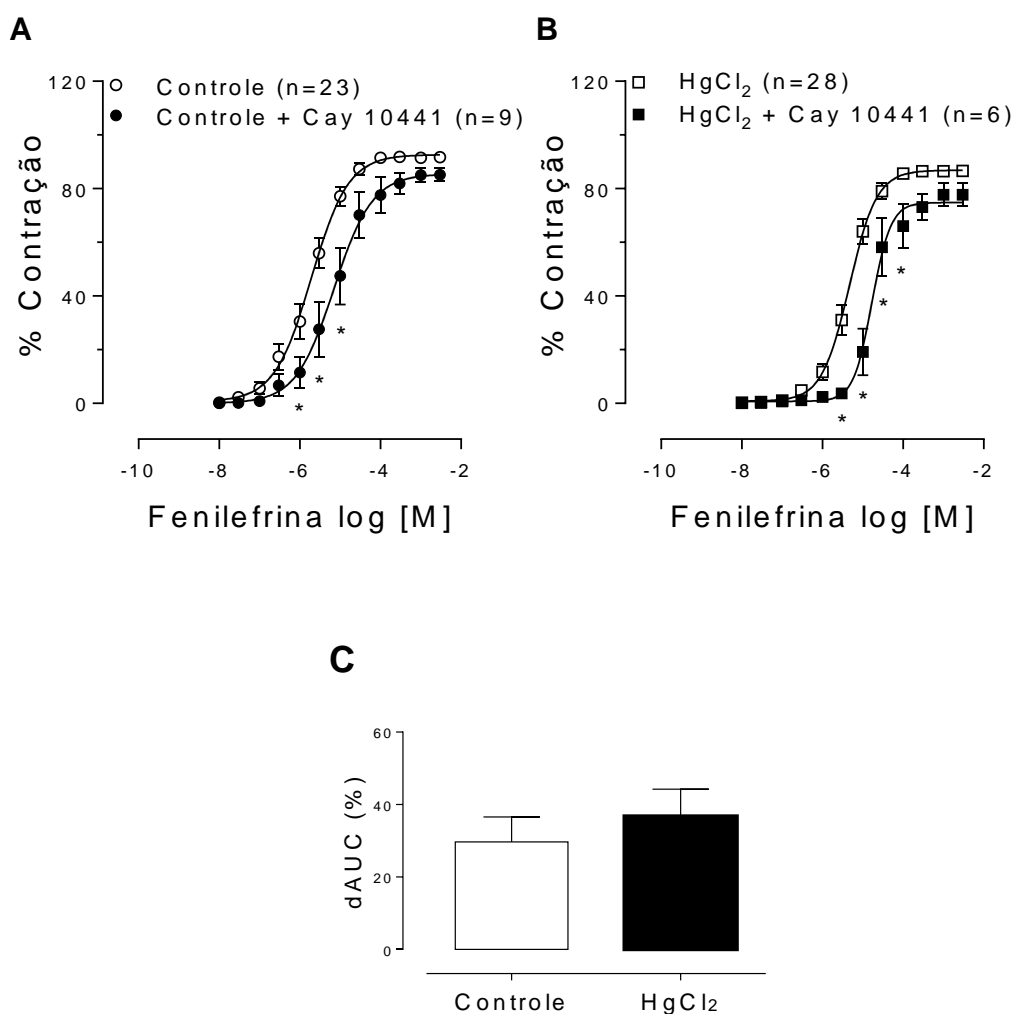


Figura 12: O papel da ciclooxygenase na reatividade vascular de MRA em SHRs expostos e não expostos ao mercúrio. Curva concentração-resposta à fenilefrina na presença e ausência de indometacina ($5 \mu\text{M}$) em segmentos de MRA dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). (C) Magnitude do efeito analisada pelo cálculo da diferença da área abaixo da curva (dAUC). Análise da expressão proteica pelo método de *Western Blot* da COX-2 (D). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs SHR Controle. ANOVA duas-vias seguida do pós-teste de Bonferroni para A e B. Teste *t de Student* não pareado para C e D. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses.

Como a exposição ao cloreto de mercúrio promoveu uma diminuição de reatividade no grupo SHR HgCl₂ (Figura 8A) e aumento da expressão da COX-2 em comparação ao SHR Controle, investigamos a participação de prostanóides vasodilatadores derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxygenase na resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência. Para isso, artérias dos grupos Controle e HgCl₂ foram incubadas com um antagonista de receptor de prostaciclina (PGI₂), o CAY 10441, sendo observada redução de reatividade em ambos os grupos, de igual magnitude (Figura 13A-C). Esse achado sugere que, nesses SHRs jovens, a prostaciclina

estaria atuando como um agente vasoconstritor. Por isso, investigamos o papel dos receptores de tromboxano A₂ e de prostaglandina. Na presença do SQ 29.548 não alterou a resposta contrátil no grupo SHR HgCl₂ (Figura 13D e E). Tais resultados sugerem que o tromboxano A₂ (TXA₂) não está envolvido na resposta vasoconstritora observada após a incubação com indometacina. Em contraste, SC 19220 promoveu uma redução maior no grupo de controle SHR do que no grupo SHR HgCl₂ (Figura 13F-H).



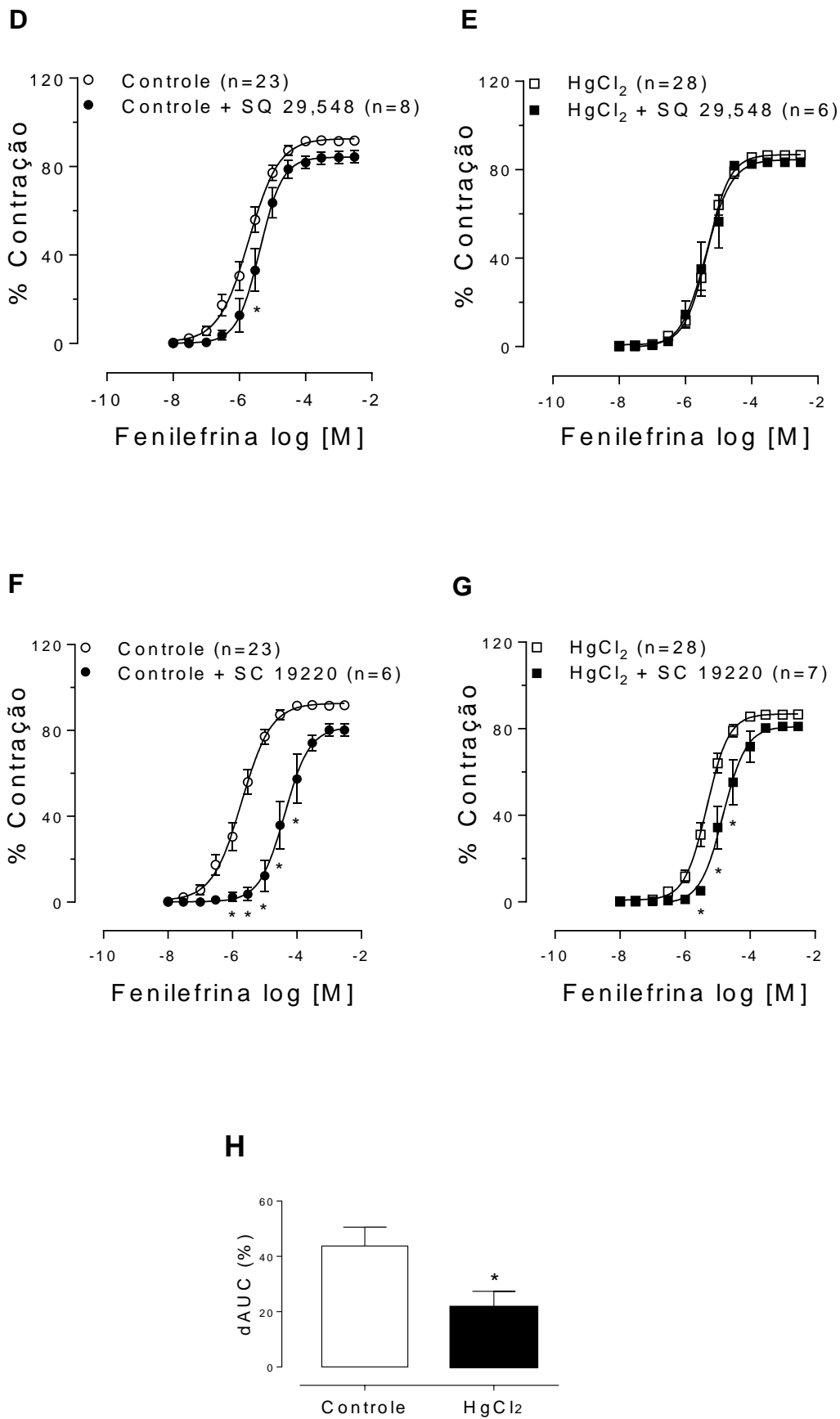


Figura 13: Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre o papel dos prostanóides derivados da COX na reatividade vascular de MRAs. Curva concentração-resposta à fenilefrina na presença e ausência de CAY 10441 (1 mM), SQ 29, 548 (1 μ M), SC 19220 (10 μ M) em segmentos de MRA dos grupos Controle (A, D e F) e HgCl₂ (B, E e G). (C e H) Magnitude do efeito analisada pelo cálculo da diferença da área abaixo da curva (dAUC). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * P < 0,05 vs SHR Controle. ANOVA duas-vias seguida do pós-teste de Bonferroni para A, B, D-G. Teste t de Student não pareado para C e H. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram, pela primeira vez na literatura, que a exposição crônica ao HgCl₂ aumentou a PAS, acelerou o desenvolvimento de hipertensão em SHRs jovens e induziu um mecanismo de adaptação vasoprotetora para suportar o aumento da pressão arterial. Além disso, a exposição crônica ao HgCl₂ provocou: redução da reatividade vascular à fenilefrina nas MRAs; aumento da produção de NO; disfunção vascular pelo aumento da produção de EROs, como o H₂O₂; aumento da expressão proteica da Gp91Phox e aumento dos níveis *in situ* de O₂[•] - e reduziu a produção de prostanóides vasoconstritores derivados da COX em comparação com o grupo controle. A superprodução de H₂O₂ e NO parece ter ocorrido para contrarregular o aumento inicial da pressão arterial, reduzindo a reatividade vascular.

Na tentativa de reproduzir um modelo de exposição que atingisse concentrações plasmáticas finais de HgCl₂ semelhantes às encontradas em humanos expostos, Wiggers et al. (2008b) desenvolveram um modelo experimental de ratos expostos cronicamente a doses intramusculares de HgCl₂ em que a concentração final de mercúrio no plasma atingiu aproximadamente 8 ng / mL (CLARKSON, 2003). Este modelo de tratamento com HgCl₂ não alterou o ganho de massa corporal entre os grupos estudados porém, em comparação com animais normotensos, os SHRs apresentam massa corporal significativamente menor (WIGGERS et al., 2008b). De acordo com Kristek e Gerova (2004), esses animais, na fase fetal, não apresentam aporte sanguíneo suficiente em decorrência da hipertensão das mães, justificando a redução no ganho de massa corporal. No entanto, como é possível observar através dos nossos dados, o ganho reduzido de massa nos SHRs não tem relação com a intoxicação por cloreto de mercúrio, uma vez que os animais expostos e não expostos apresentaram ganho ponderal semelhante.

Estudos utilizando o mesmo modelo de tratamento demonstraram a ocorrência de disfunção endotelial, tanto em artérias de resistência quanto em artérias de condutância, porém em ratos Wistar (WIGGERS et al., 2008b; LEMOS et al., 2012; PEÇANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2013). Considerando que a exposição crônica ao HgCl_2 gera disfunção endotelial em ratos adultos normotensos, e que a presença de disfunção endotelial é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão (RIZZONI et al, 1996; ROSSI et al, 1997; BRIONES et al., 1999), analisamos o impacto desse mesmo modelo de tratamento sobre SHR jovens, antes do estabelecimento da hipertensão. Embora os estudos acima tenham demonstrado a presença de disfunção endotelial após exposição ao mercúrio, não houve alteração na PAS após 30 dias de exposição em ratos adultos normotensos (WIGGERS et al., 2008b; LEMOS et al., 2012; PEÇANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2013). Em contraste, o aumento da PAS foi observado após os regimes de tratamento de 180 dias com mercúrio na água de beber e 60 dias de mercúrio intramuscular, respectivamente (CARMIGNANI; BOSCOLO, 1992; RIZZETTI et al., 2017). Dessa forma, podemos concluir que os efeitos do mercúrio na PAS de ratos Wistar são controversos e aparentemente dependem da dose, da via e do tempo de exposição.

Os processos que levam o SHR a apresentar hipertensão arterial começam a se desenvolver desde cedo (RIOUX; BERKOWITZ, 1977; TUCKER; JOHNSON, 1984; DICKHOUT; LEE, 1997; ARRIBAS et al., 2008; CACANYIOVA et al., 2016). Estudos mostram que por volta da 8ª semana de vida a hipertensão já é considerada instalada nesses animais (YAMORI, 1994). Em nosso estudo, um rápido aumento na PAS foi observado logo na primeira semana de tratamento. Os SHRs em situação controle apresentaram hipertensão arterial, com PAS acima de 140 mmHg a partir da 8ª semana de vida. Em contrapartida, os SHRs intoxicados com cloreto de mercúrio apresentaram hipertensão mais precocemente, com 7 semanas, indicando que a exposição crônica ao HgCl_2 aumentou a PAS e acelerou o desenvolvimento de hipertensão em SHRs jovens. Esses achados não foram observados em SHRs adultos, como demonstrado por Vassallo et al. (2018), que acompanharam a evolução temporal da PAS em SHRs com três meses de idade expostos e não expostos à mesma concentração

de HgCl₂ utilizada em nosso estudo e, após 30 dias, não observaram diferença na PAS entre os grupos.

Segundo Bristow (1996), a hipertensão arterial impõe ao miocárdio uma sobrecarga decorrente do aumento da pós-carga que, por sua vez, ocorre em consequência à elevação da resistência vascular periférica (RVP) e uma relação entre hipertrofia cardíaca e disfunção ventricular resultante do aumento dos níveis de PAS em SHRs adultos já foi relatada (BING et al., 1995). Em nosso estudo, entretanto, apesar do aumento da PA nos SHR jovens, os animais não apresentaram alterações na relação peso do VE/comprimento da tibia estimando-se, assim, que não houve hipertrofia cardíaca com 30 dias de tratamento com mercúrio. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de os animais ainda se encontrarem no estágio inicial da hipertensão arterial.

A RVP pode ser regulada por modificações na estrutura, mecânica e função dos vasos. Nesse contexto, alterações nas respostas vasodilatadoras e vasoconstritoras podem culminar em aumento da RVP e serem responsáveis pela hipertensão (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000). Como a exposição ao mercúrio alterou o curso natural do desenvolvimento da hipertensão e sabendo que os vasos de resistência contribuem significativamente com a redução ou aumento da RVP, investigamos os efeitos desse metal nas artérias mesentéricas de resistência (MULVANY, 2002; 2003).

De acordo com nossos achados, a exposição crônica ao HgCl₂ reduziu a resposta vasoconstritora à fenilefrina. Embora estudos demonstrem que os SHRs jovens podem apresentar reatividade vascular reduzida em comparação com ratos normotensos da mesma idade (ARRIBAS et al., 1996; MIZUTANI et al., 1999; TOROK, 2006; TSUDA et al., 1987; SZEMEREDI et al., 1988; ZHAO et al., 2012), a exposição ao mercúrio parece intensificar essa redução na reatividade. No entanto, a exposição ao mercúrio não alterou as respostas vasodilatadoras à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio. Esses achados sugerem que os SHRs pré-hipertensos podem ter mecanismos intactos de relaxamento dependentes e independente do endotélio, como já observado anteriormente (TSUDA et al., 1987; IBARRA et al., 2006; CACANYIOVA et al., 2016). Da mesma forma, em ratos Wistar adultos, não foram observadas alterações no relaxamento independente do endotélio após exposição HgCl₂. No entanto, nesses mesmos animais, a resposta vasodilatadora à acetilcolina foi

reduzida nos grupos tratados com o metal (WIGGERS et al., 2008b; PEÇANHA et al., 2010; BOTELHO et al., 2019).

Para entender a redução na resposta vasoconstritora à fenilefrina, investigamos os efeitos do mercúrio na modulação do NO. Para isso, as artérias foram incubadas com um inibidor inespecífico da sintase do NO, o L-NAME. Alguns trabalhos mostram que na hipertensão ocorre maior ativação dos mecanismos vasodilatadores dependentes do endotélio, como aumento da produção de NO e aumento da expressão de eNOS ou iNOS, tratando-se de um mecanismo compensatório (WU, 1996; CHOU, 1998; VARIZI et al., 1998; BRIONES et al., 1999; 2000; CHANG et al., 2002; ALEXANDER et al., 1999). Em nosso estudo, não houve alteração da resposta vascular à fenilefrina no grupo SHR Controle após a incubação com L-NAME, sugerindo que não houve então aumento na produção de NO neste grupo. Esse resultado pode se dever ao fato de essas alterações, como incremento da síntese de NO, serem encontradas mais comumente em SHRs a partir de 10 semanas de idade, como parte de um processo adaptativo contra a hipertensão (WU, 1996; CHOU, 1998; VARIZI et al., 1998; BRIONES et al., 1999; 2000). Assim, possivelmente não observamos alteração na produção de NO no grupo controle porque os animais que utilizamos eram muito jovens (8 semanas de idade) e sua PAS ainda está baixa. No entanto, a exposição crônica ao cloreto de mercúrio aumentou a reatividade vascular à fenilefrina após incubação com L-NAME, sugerindo aumento da produção de NO neste grupo.

Apoiando nossos achados funcionais, os níveis de NO quantificados *in situ* foram maiores no grupo exposto ao mercúrio que no grupo SHR Controle, indicando que, mesmo em SHRs muito jovens, a exposição ao mercúrio aumentou a produção de NO nas artérias mesentéricas de resistência. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de o grupo SHR HgCl₂ ter apresentado uma pressão arterial significativamente maior que o grupo controle, o que possivelmente acelerou o desenvolvimento do mecanismo de proteção vasodilatador explicado mais acima. A potencialização desse mecanismo vasodilatador dependente do endotélio no grupo exposto pode estar relacionada com a redução da reatividade à fenilefrina observada no grupo SHR HgCl₂. Apesar do aumento da produção de NO em ratos expostos ao mercúrio, não houve diferença na expressão da eNOS entre os grupos. Estudos evidenciaram

que hipertensão arterial pode aumentar os níveis plasmáticos de um inibidor endógeno da eNOS produzido pelas células endoteliais, o N(G), N(G')-dimetilarginina (ADMA) (ACHAN et al, 2003; DAYOUB et al, 2003; KIELSTEIN et al, 2004).

Assim, o aumento na produção de NO pode ser devido ao aumento da expressão da iNOS, uma isoforma expressa em condições inflamatórias, como hipertensão (FORSTERMANN et al., 1993; 1994), sendo também expressa após a exposição crônica ao mercúrio, como observado por Faria et al. (2018). Briones et al. (2002) observaram que em artérias cerebrais de SHRs adultos não havia um prejuízo na produção endotelial de NO, nem na expressão da eNOS. Em contrapartida, a hipertensão induziu um *up-regulation* da expressão da iNOS.

De acordo com Nava et al. (1995 e 1998), na hipertensão, embora a produção de NO possa estar aumentada, sua degradação também pode estar elevada em decorrência do aumento da produção de EROs. Somado a isso, sabendo que a exposição ao mercúrio por 30 dias aumenta a produção de EROs em ratos normotensos adultos (WIGGERS et al., 2008b, FURIERI et al., 2011; LEMOS et al., 2012; PEÇANHA et al., 2010; WIGGERS et al., 2008a, AZEVEDO et al., 2016), nós investigamos os efeitos do mercúrio nessa via em SHRs jovens.

Assim, incubamos os anéis com Apocinina, um inibidor da NAD(P)H oxidase. Após incubação, observamos aumento da reatividade vascular à fenilefrina somente no grupo exposto ao cloreto de mercúrio, sugerindo maior participação da NAD(P)H oxidase nesse grupo. Diante deste resultado, avaliamos a expressão proteica da Gp91Phox, uma subunidade da NAD(P)H oxidase e verificamos aumento da sua expressão após exposição ao mercúrio. Estudos similares em animais hipertensos e em animais expostos ao mercúrio também observaram aumento do estresse oxidativo pela participação da NAD(P)H oxidase, produzindo ânion superóxido (WU et al, 2001; HAMILTON et al, 2001; FURIERI et al., 2011; LEMOS et al., 2012; PEÇANHA et al., 2010). Sabendo que a NAD(P)H oxidase é a principal fonte geradora de ânion superóxido e que o mercúrio aumenta sua expressão, avaliamos a produção *in situ* dessa molécula e observamos que a exposição crônica por 30 dias ao cloreto de mercúrio aumentou a produção de $O_2^{\bullet-}$ em animais em SHR jovens. Curiosamente, embora tenha ocorrido aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$, que tem caráter vasoconstritor (SUZUKI et al, 1995), houve aumento da reatividade

vascular à fenilefrina no grupo SHR exposto ao cloreto de mercúrio após a incubação com apocinina, sugerindo a participação de alguma espécie reativa de oxigênio que leva à vasodilatação.

Sabendo que o H_2O_2 é formado por ação da SOD sobre o ânion superóxido e pode atuar tanto como vasoconstritor quanto como vasodilatador, fato já observado em artérias mesentéricas de resistência (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HAYABUCHI, 1998; GIL-LONGO; GONZÁLES-VAZQUEZ, 2005; FÉLÉTOU, 2009), investigamos a hipótese que a exposição ao mercúrio exerce influência sobre a produção do peróxido de hidrogênio em SHRs jovens. Para isso, realizamos protocolos experimentais com anéis incubados com Catalase, um varredor H_2O_2 . A incubação com esta droga aumentou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em mesentéricas de ratos expostos ao mercúrio, mas não afetou as respostas de mesentéricas de ratos não expostos. Assim, podemos concluir que a exposição ao mercúrio aumenta a produção de EROs em SHRs jovens e, diante desses resultados, hipotetizamos que a produção de H_2O_2 poderia estar aumentada por dois mecanismos: aumento do substrato (de $O_2^{\bullet-}$) ou redução da expressão/atividade da catalase, no entanto, não encontramos mudanças na sua expressão. Assim, o aumento da produção de H_2O_2 parece de fato estar associado a um aumento de $O_2^{\bullet-}$.

Estudos mostram que, na hipertensão, ao passo que ocorre aumento de EROs, também parece haver aumento compensatório de enzimas antioxidantes, como a SOD (RATHAUS; BERNHEIM; 2002; ZHAN et al, 2004). Esse efeito pode ser observado em SHRs adultos, mas não em SHRs jovens pré-hipertensos, como mostrado no grupo SHR Controle (GONGORA 2006; ZALBA 2000). Da mesma maneira, o mercúrio também parece aumentar a expressão da SOD para permitir o metabolismo da molécula de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , um radical livre menos deletério e reativo, potencializando e acelerando o desenvolvimento desse mecanismo compensatório, uma vez que esse grupo já apresenta hipertensão instalada precocemente (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A conversão do $O_2^{\bullet-}$ produzido em H_2O_2 permite que o NO superproduzido não tenha sua biodisponibilidade reduzida pela sua interação com $O_2^{\bullet-}$, formando ONOO⁻ (RUBANY; VANHOUTE, 1986; GAO; MANN, 2009). Tomados em conjunto, a produção aumentada de NO e H_2O_2 potencializa o

mecanismo vasoprotetor dos animais SHR pré-hipertensos expostos ao mercúrio.

Até então, no presente estudo observamos uma diminuição da reatividade vascular em SHRs jovens provocada pela exposição ao cloreto de mercúrio, caracterizada pelo aumento de NO e estresse oxidativo, onde há um aumento da produção de peróxido de hidrogênio resultante de uma maior atividade da NAD(P)H oxidase e, possivelmente da SOD. De posse dos nossos achados, sabendo que o peróxido de hidrogênio parece contribuir para vasodilatação através da ativação de canais para potássio (FÉLÉTOU, 2009) e, por último, que a contribuição de EDHF para vasodilatação dependente do endotélio é mais importante em vasos de resistência do que em vasos de condutância (URAKAMI-HARASAWA, 1997), investigamos a participação desses canais na resposta vasodilatadora. Para isso, incubamos as artérias com TEA, um inibidor não específico de canais para potássio, não havendo mudança na reatividade vascular à fenilefrina em nenhum dos grupos analisados, talvez pelo fato de em animais SHR, a densidade de canais na membrana da célula aumentar conforme a idade (HU et al., 2013).

Para investigar o efeito do H_2O_2 nos canais para potássio no grupo exposto ao mercúrio, coincubamos as amostras com Catalase e TEA. Os resultados após a coincubação sugeriram que o H_2O_2 estava atuando por outra via, uma vez que, mesmo após o bloqueio dos canais para potássio, uma resposta vasodilatadora ainda pôde ser observada. Estudos mostraram que outra ação vasodilatadora do H_2O_2 pode ocorrer não somente pela ativação de canais para potássio, como também por meio da ativação direta da GCs, o que justificaria nosso achado (HAYABUCHI, 1998). Como o mercúrio aumentou a produção de dois agentes vasodilatadores, NO e H_2O_2 , investigamos qual foi o principal determinante da redução da reatividade vascular à fenilefrina. Para isso, também coincubamos as artérias com TEA e L-NAME, o que causou um aumento significativo na reatividade, maior que o efeito observado pela coincubação com TEA e catalase. Este resultado sugere uma maior participação de NO do que H_2O_2 na modulação negativa da contração induzida pela fenilefrina.

Os prostanóides derivados da COX também contribuem para o controle do tônus vascular (KARIMI et al., 2002; ANTMAN et al., 2005). Além disso, sabe-

se que a própria COX pode ser um fator de ativação da NAD(P)H oxidase, geradora de radicais livres (INOBUCHI et al., 2003). Dentre algumas particularidades descritas dos modelos de SHR, podemos encontrar a alta ativação via da COX, uma vez que estudos mostraram que a própria hipertensão arterial aumenta a participação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX nas artérias de resistência, e não somente o contrário (ALVAREZ et al., 2005; VIRDIS et al., 2007). Além disso, estudos anteriores também demonstraram que a exposição crônica ao mercúrio em ratos adultos normotensos promove aumento da participação desses prostanóides vasoconstritores, resultando em disfunção endotelial (WIGGERS et al., 2008b; PEÇANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2013; 2017). No entanto, a participação da COX especificamente em SHRs pré-hipertensos nunca foi descrita.

Ao incubarmos os anéis de MRA com Indometacina, um inibidor não específico da COX, observamos uma redução na resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos, porém a magnitude desse efeito foi maior no grupo exposto ao mercúrio, sugerindo de fato que em SHRs existe maior ativação da COX e a exposição intensifica esse mecanismo. Afim de confirmar esse achado, analisamos a expressão proteica da COX-2, que também estava elevada no grupo exposto. Contrariamente, Wiggers et al. (2008b) não observaram alterações na via da COX induzidas pelo mercúrio no leito mesentérico, porém em ratos normotensos.

Considerando que o tratamento com mercúrio reduziu a reatividade vascular à fenilefrina, mas aumentou a expressão da COX-2, investigamos a participação da PGI₂, que usualmente apresenta ação vasodilatadora (KARIMI et al. 2002). Para isso, os anéis foram incubados com um antagonista do receptor PGI₂, o CAY 10441, e uma redução similar na reatividade vascular à fenilefrina foi encontrada em ambos os grupos. A PGI₂, além de ser um agente antitrombótico e antiagregante plaquetário, geralmente é um prostanóide vasodilatador (MONCADA et al., 1979; CORRIU et al., 2001; PARKINTON et al., 2004; FÉLÉTOU, 2007). Entretanto, em algumas doenças cardiovasculares, como a hipertensão, a PGI₂ também pode atuar como um fator de contração derivado do endotélio, ativando os receptores TXA₂ e prostaglandinas, contribuindo para a disfunção endotelial (GLUAIS et al., 2005; GOMEZ et al., 2008; VANHOUTTE; TANG, 2008; LIU et al., 2015). Somado a isso, foi

previamente descrito que SHRs jovens podem apresentar disfunção do receptor da PGI₂, pois no momento de sua ligação com o substrato ocorre comprometimento da ativação da adenilato ciclase, impedindo assim a cascata vasodilatadora (GOMEZ et al., 2008). Tomados em conjunto, esses estudos ajudam a explicar nossos resultados, que indicam que a PGI₂ não contribui com a redução da reatividade observada no grupo SHR HgCl₂, uma vez que mostrou apresentar caráter vasoconstritor. Assim, como sua ação vasoconstritora pode se dar via receptores de TXA₂ e prostaglandinas, incubamos os anéis com SC 19220, antagonista de receptor EP₁ e SQ 29,548, antagonista de receptor de TXA₂ (GLUAIS et al., 2005; GOMEZ et al., 2008; VANHOUTTE; TANG, 2008; LIU et al., 2015).

De acordo com Peçanha et al. (2010) e da Cunha et al. (2000), a exposição crônica ao HgCl₂ aumentou a produção de PGE₂ e de TXA₂, contribuindo assim para aumento do tônus vascular em aortas de ratos adultos normotensos. Curiosamente, quando bloqueamos o receptor TXA₂, houve uma discreta redução de reatividade no grupo SHR Controle, enquanto nenhuma alteração foi observada no grupo exposto ao mercúrio, sugerindo que a exposição ao mercúrio aboliu a ação do TXA₂ em artérias mesentéricas de SHRs jovens. Ao realizarmos o bloqueio dos receptores EP₁, observamos redução de reatividade vascular em ambos os grupos, porém a magnitude do efeito foi significativamente mais elevada no grupo controle, indicando que, em relação ao grupo controle, a exposição ao mercúrio também reduziu a participação da PGE₂. Ineditamente, esses achados evidenciam que as alterações encontradas na via da COX neste estudo em SHRs jovens não contribuem para a hipertensão arterial manifestada no grupo exposto ao mercúrio. De forma interessante, em conjunto, nossos resultados mostram que a redução na reatividade vascular encontrada no grupo SHR HgCl₂ foi devido de fato ao aumento da produção de NO, de H₂O₂, e talvez a redução da participação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX.

7. SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS

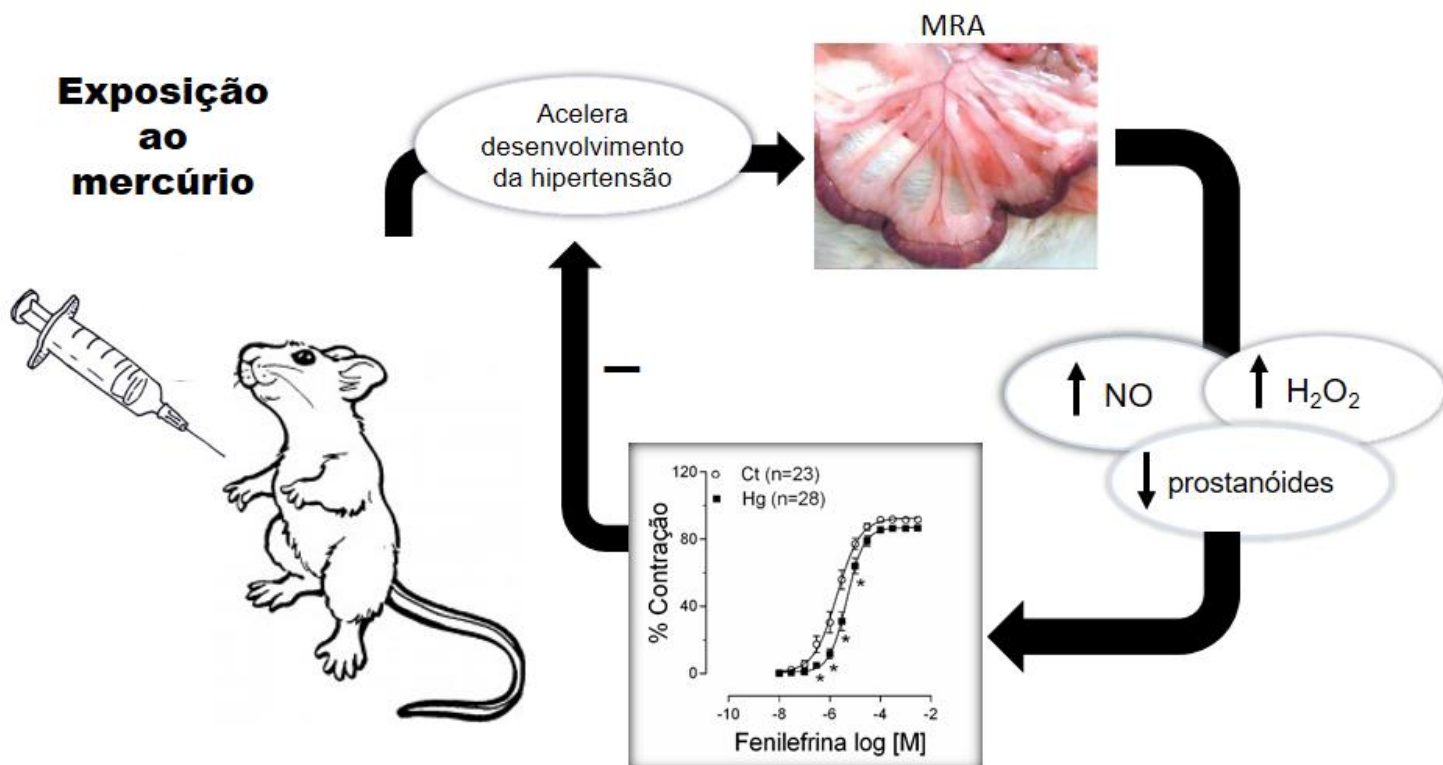


Figura 14: Sumarização esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. A exposição ao mercúrio acelera o desenvolvimento da hipertensão e, apesar disso, aumenta a produção de NO e H₂O₂ e reduz a produção de prostanóides da COX, que atuam em conjunto para reduzir a reatividade vascular de MRAs, como uma tentativa de contrabalançar o rápido aumento de PAS. MRA: artéria mesentérica de resistência; NO: óxido nítrico; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; PAS: pressão arterial sistólica.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, nosso estudo mostrou pela primeira vez na literatura, que a exposição crônica ao HgCl₂ na dose utilizada, encontrada em indivíduos expostos, aumenta a pressão arterial e acelera o desenvolvimento de hipertensão em SHRs jovens. Este processo parece potencializar um mecanismo de adaptação desses animais para suportar alta pressão sistólica. Esse mecanismo envolve o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, especificamente H₂O₂ e ainda o NO e redução da produção de prostanóides derivados da COX. Juntos, esses agentes promovem redução na

reatividade vascular, o que parece ser uma tentativa de contrabalancear o aumento da pressão arterial. Por fim, esses achados mostram que a exposição crônica ao HgCl_2 pode ser considerada um fator de risco para doenças cardiovasculares, uma vez que acelera o desenvolvimento da hipertensão em animais pré-dispostos.

9. REFERÊNCIAS

ABRAMSON, J. J.; SALAMA, G. Critical Sulphydryls Regulate calcium release from sarcoplasm icreticulum. **Journal Of Bioenergetics And Biomembranes**, v. 21, p. 283-294, 1989.

ACHAN, V. *et al.* Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 8, p. 1455-9, 2003.

AGUADO, A. *et al.* Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 268, n. 2, p. 188–200, 2013.

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

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

American Dental Association. ADA statement on dental amalgam. 2003.

ANTMAM, E. M. *et al.* Ciclooxygenase inhibiti on and cardiovascular risk. **Circulation**, v.112, p. 759-770, 2005.

ARRIBAS, S. *et al.* Confocal microscopic characterization of a lesion in cerebral vessel of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Stroke**, v. 27, p. 1118–23, 1996.

ARRIBAS, S. M., *et al.* Heightened aberrant deposition of hard-wearing elastin in conduit arteries of prehypertensive SHR is associated with increased stiffness and inward remodeling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.295, p.2299-2307, 2008.

ASANO, S. *et al.* Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. **Pathol Int**, v. 50, n. 3, p. 169-74, 2000.

ASSIS G. P. S. *et al.* Effects of small concentrations of mercury on the contractile activity of the rat ventricular myocardium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 134, p. 375-383, 2003.

AUGUSTI, P. R. *et al.* Effect of lycopene on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 100, n. 6, p. 398-402, 2007.

AZEVEDO, F. A. Toxicologia do Mercúrio. **São Carlos: RiMa**, 2003.

AZEVEDO, B. F. *et al.* Chronic mercury exposure at different concentrations produces opposed vascular responses in rat aorta. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 43, n. 7, p. 712–9, 2016.

BAGENTOSE, L. M.; SALGAME, P.; MONESTIER, M. Murine mercury-induced autoimmunity: a model of chemically related autoimmunity in humans. **Immunol Res**, v. 20, p. 67-68, 1999.

BAKIR, F. *et al.* Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, v.181, n. 96, p.230-41, 1973.

BANDO, I. *et al.* Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 19, p. 154–161, 2005.

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. 262–7, 2014.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 328-338, 2001.

BEAL, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radic Biol Med**, v. 32, p. 797-803, 2002.

BERTOLI S. R. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o ventrículo direito e vasculatura pulmonar de ratos. Dissertação de Mestrado, 2017. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

BING O. H. *et al.* The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 27, p. 383-396, 199536.

BJÖRKMAN, L. *et al.* Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 144, n. 1, p. 156-62, 1997.

BLUHM, R. E. *et al.* Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers. Part I: History, neuropsychological findings and chelator effects. **Hum Exp Toxicol**, v. 11, n. 3, p. 201-10, 1992.

BOFFETTA, P. *et al.* Mortality From Cardiovascular Diseases And Exposure To Inorganic Mercury. **Occup Environ Med**, v. 58, p. 461–466, 2001.

BOTELHO T. N. Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre os mecanismos de vasodilatação da aorta de ratos. Dissertação de Mestrado, 2016. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo

BOTELHO, T. N. *et al.* Impaired participation of potassium channels and Na⁺/K⁺-ATPase in vasodilatation due to reduced nitric oxide bioavailability in rats exposed to mercury. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 124, n. 2, p. 190-198, 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIDGES, C. C. *et al.* Transport of thiol-conjugates of inorganic mercury in human retinal pigment epithelial cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 221, n. 2, p. 251-60, 2007.

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. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 1, p. 111–20, 1999.

BRIONES, A. M. *et al.* Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. **Br J Pharmacol**, v. 131, n. 2, p. 185–94, 2000.

BRISTOW, M. R. Mechanisms of development of heart failure in the hypertensive patient. **Cardiology**, v. 92, n. 1, p. 3-6, 1999.

British Dental Health Foundation. Policy statement - dental amalgam. 2003.

BURR, M. L. *et al.* Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: Diet and Reinfarction Trial (DART). **Lancet**, v. 2, p. 757-61, 1989.

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. **J Physiol Pharmacol**. v.67, p. 501-512, 2016.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidante stress. **Circ Res**, v. 87, p. 840-844, 2000.

CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganix mercury in rats. **Br J Ind Med**, v. 49, n.4, p. 226-232, 1992.

CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P.; PREZIOSI, P. Renal ultraestructural alterations and cardiovascular functional changes in rats exposed to mercury chloride. v. 1, p. 353-56, 1989.

CARRANZA-ROSALES, P. *et al.* Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. **Toxicology**, v. 210, n. 2-3, p. 111-21, 2005.

CARVALHO, M. H. C. *et al.* Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 76-88, 2001.

CHANG, H. R. *et al.* Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 29, n. 4, p. 275-280, 2002.

CHANG, J; MUSSER, J H; MCGREGOR, H. Phospholipase A2: function and pharmacological regulation. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 15, p. 2429-2436, 1987.

CHATTERJEE, A.; CATRAVAS, J. D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. **Vascul Pharmacol**. 2008.

CHEN, C. *et al.* Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. **Clin Chem**, v. 51, p. 759–767, 2005.

CHONG, Z. Z.; LI, F.; MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Prog Neurobiol**, v. 75, p. 207-246, 2005.

CHOU, T. C. *et al.* Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 31, n. 2, p. 643–8, 1998.

CHOY, C. M. *et al.* Relationship between semen parameters and mercury concentrations in blood and in seminal fluid from subfertile males in Hong Kong. **Fertil Steril**, v. 78, p 426–428, 2002.

CLARKSON, T. W. Metal toxicity in Central Nervous System. **Enviro. Health Persp**, v. 75, p. 59-64, 1987.

CLARKSON, T. W. Molecular and ionic Mimicry of Toxic Metals. **Annu, Research Pharmacol. Toxicol**, v. 32, p. 545-71, 1993.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect**, v. 110, n. 1, p. 11-23, 2002.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol**, v. 36, p. 609-662, 2006.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. **N Engl J Med**, v. 349, n. 18, p. 1731-7, 2003.

CLARKSON, T. W.; VYAS, J. B.; BALLATORI, N. Mechanisms of Mercury disposition in body. **Am J Ind Med**, v. 50, n. 10, p. 757-64, 2007.

CORRIU, C. *et al.* Differential effects of prostacyclin and iloprost in the isolated carotid artery of the guinea-pig. **Eur J Pharmacol**, v. 426, n. 1-2, p. 89-94, 2001.

CRACKOWER, M. A. S. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, p. 822-828, 2002.

da COSTA, G. M. *et al.* Mercury toxicity in Amazon gold miners: visual dysfunction assessed by retinal and cortical electrophysiology. **Environ Res**, v. 107, p. 98-107, 2008.

da CUNHA, V. *et al.* Cyclooxygenase inhibition reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 22, p. 203-215, 2000.

DAVIDGE, S. T. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circ Res**, v. 89, n. 8, p. 650-60, 2001.

DAYOUB, H. *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. **Circulation**, v. 108, n. 24, p. 3042-7, 2003.

DE GENNARO, C. V. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. **Medical Science Monitor**, v. 15, n. 4, p. 91-101, 2009.

DESCHEPPER, C. F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. **Kidney Int**, v. 46, p. 1561–1563, 1994.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. K. W. Structural functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. v.29, p.781-9, 1997.

DONATO, A. J. *et al.* Role of NFκB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. **Aging (Albany NY)**, v. 1, n. 8, p. 678-680, 2009.

DOWNER, M. K. *et al.* Mercury exposure and risk of cardiovascular disease: a nested case-control study in the PREDIMED (PREvention with MEDiterranean Diet) study. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 17, n. 1, p. 9, 2017.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EIDE, R.; WESENBERG, G. R. Mercury contents of indicators and target organs in rats after long-term, low-level, mercury vapor exposure. **Environ Res**, v. 61, n. 2, p. 212-22, 1993.

EPA. Mercury Study Report to Congress. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 1997

ETO, K. Minamata disease. **Neuropathology**, v. 20, p. 14-19, 2000.

EVE, E.; OLIVEIRA, E. F.; EVE, C. O problema do mercúrio e dietas na Amazônia brasileira: planejando uma solução. **Environ Conserv**, v. 23, p. 133-9, 1996.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) 2004; 133 pp.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) 2006,

FARIA, T.O. *et al.* Xanthine Oxidase Activation Modulates the Endothelial (Vascular) Dysfunction Related to HgCl₂ Exposure Plus Myocardial Infarction in Rats. **Cardiovasc Toxicol**, v. 18, n. 2, p. 161–74, 2018

FDA Consumer Magazine - US Food and Drug Administration, September 1994. 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.

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

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. *et al.* Endothelium dependent hyperpolarizations: past beliefs and presente facts. **Ann Med**, v. 39, n. 7, p. 495–516, 2007.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **Am J Physiol Circ Physiol**, v. 291, n. 3, p. 985–1002, 2006.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **Journal Physiology Pharmacology**, v. 50, n. 4, p. 525 – 534, 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERRER, M. *et al.* Heterogeneity of endothelium-dependent mechanisms in different rabbit arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 32, p. 339–46, 2003.

Food and Drug Administration (FDA). Thimerosal in Vaccines. Center of Biologics Evaluation and Research <<http://www.fda.gov/Cber/vaccine/thimerosal.htm> 2008>.

FÖRSTERMANN, U. *et al.* Nitric oxide synthase isozymes. **Hypertension**, v. 23, p. 1121–31, 1994.

FÖRSTERMANN, U. *et al.* Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. **Eu Hear J**, v. 14, p. 10–5, 1995.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 923-939, 2010.

FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, p. 1708–1714, 2006.

FROLISH, J. C.; FÖRSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot Res**, v. 19, p. 211 – 215, 1989.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 9, p. 2007-2018, 1989.

FURIERI, L. B. *et al.* Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 8, p.1819–31, 2011.

GAO, L.; MANN, G. E. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a doubleedged sword in redox signaling. **Cardiovasc Res**, v. 82, p. 9-20, 2009.

GEIER, D. A.; GEIER, M. R. An assessment of the impact of thimerosal on childhood neurodevelopmental disorders. **Pediatric Rehabilitation**, v. 6, p. 97-102, 2003.

GEIER, D. A.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R. A review of Thimerosal (Merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 10, n. 8, p. 575-96, 2007.

GEISTERFER, A. A. *et al.* Angiotensin II induce hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 62, p. 749–756, 1988.

GIL-LONGO J.; GONZALEZ-VAZQUEZ C. Characterization of four different effects elicited by H₂O₂ in rat aorta. **Vasc Pharmacol**, v. 43, p. 128–138, 2005.

Giuberti K. Efeitos da exposição crônica a baixas concentrações de cloreto de mercúrio (20 nM) sobre o sistema cardiovascular de ratos. Tese de Doutorado, 2010. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

GLEICHMANN, E. *et al.* Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. A discussion. **Archives of Toxicology**, v. 63, p. 257-273, 1989.

GLUAIS, P. *et al.* Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: The Janus face of prostacyclin. **Br J Pharmacol**, v. 146, n. 6, p. 834–45, 2005.

GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 56, n. 1, p. 174-9, 2003.

GOMEZ, E. *et al.* Aging and prostacyclin responses in aorta and platelets from WKY and SHR rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 5, p. 2198–211, 2008.

GÓMEZ, M. G. *et al.* Mortalidad por cáncer en los mineros del mercurio *Gaceta Sanitaria*, v. 21, p. 210-217, 2007.

GONGORA, M. C., *et al.* Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. **Hypertension**, v. 48, n. 3, p. 473-81, 200659.

GRAEME, A. K.; POLLACK, C. V. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 16, n. 1, p. 45-56, 1998.

GRANDJEAN, P. *et al.* Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. **J Pediatr**, v. 144, n. 2, p. 169-176, 2004.

GRIENGLING, K. K. *et al.* NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, v. 86, p. 494–501, 2000.

GRIZZO, L.; CORDELLINI, S. *et al.* Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. **Toxicol Sci**, v. 103, n. 1, p. 207–14, 2008.

GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W.; KOTANKO, P. Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. **Biochem Pharmacol**, v. 32, p. 2969-1972, 1983.

GUALLAR, E. *et al.* Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 347, p. 1747-1754, 2002.

Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. WHO y UNEP, 2008.

HACON, S.; AZEDO, F. Plano de ação regional para prevenção e controle da contaminação por mercúrio nos ecossistemas amazônicos, 2006.

HALBACH, S. *et al.* Blood and urine mercury levels in adult amalgam patients of a randomized controlled trial: interaction of Hg species in erythrocytes. **Environ Res**, v. 107, n. 1, p. 69-78, 2008.

HALBACH, S. *et al.* The effects of p-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBS) on force of contraction of mammalian myocardium and on ATP hydrolysis by sarcolemmal ATPase. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 318, n. 1, p. 121-129, 1981.

HAMILTON, C.A. *et al.* Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 529-34, 2001.

HAYABUCHI, Y. *et al.* Lactate-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. **J Mol Cell Cardiol**, v. 30, n. 2, p. 349–56, 1998.

HEINECKE, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. **Atherosclerosis**, v. 141, n. 11, p. 1–15, 1998.

HERON, J.; GOLDING, J.; ALSPAC Study Team. Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a prospective cohort study in the United Kingdom does not show a causal association. **Pediatrics**, v. 114, p. 577-583, 2004.

HODGSON, S. *et al.* Kidney Disease Mortality and Environmental Exposure to Mercury. **Am J Epidemiol**, v. 165, p. 72-77, 2007.

HOUSTON, M. C. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke. **J Clin Hypertens**, v. 13, n. 8, p. 621–7, 2011.

HOUSTON, M C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Altern The Health Med**, v. 13, n. 2, p. 128-33, 2007.

HU, Z. *et al.* Effects of age on expression of BKca channel in vascular smooth muscle cells from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. **J Physiol Biochem**, v. 69, n. 4, p. 945-55, 2013.

HUANG, Y. L.; CHENG, S. L.; LIN, T. H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercuric chloride. **Biol Trace Elem Res**, v. 52, p.193–206, 1996.

HYLANDER, L. D. *et al.* High mercury emissions from dental clinics despite amalgam separators. **Sci Total Environ**, v. 362, n. 1-3, p. 74-84, 2006.

HYLANDER, L. D.; MEILI, M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. **Sci Total Environ**, v. 304, n. 1-3, p.13-27, 2003.

IBARRA, M. *et al.* Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. **Arch Med Res**, v. 37, n. 3, p. 334–41, 2006.

IGNARRO, L. J.; KADOWITZ, P. J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 25, p. 171-91, 1985.

INOGUCHI, T. *et al.* . Proteinkinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. 227–232, 2003.

JACKSON, W. F. Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 113-27, 2005.

KARIMI, G. *et al.* Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. **Pharmacol Res**, v. 46, n. 1, p. 31-37, 2002.

KIELSTEIN, J. T. *et al.* Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 172-7, 2004.

KIFOR, I.; DZAU, V. J. Endothelial rennin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensin. **Circulation Research**, v. 60, p. 422 – 428, 1987.

KISHIMOTO, T. *et al.* Effect of methylmercury (CH₃HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells. **Toxicology**, v. 103, n. 1, p.1–7, 1995a.

KISHIMOTO, T. *et al.* Inhibitory effect of methylmercury on migration and tube formation by cultured human vascular endothelial cells. **Arch Toxicol**, v. 69, n. 6, p. 357–61, 1995b.

KO, E. A. et al. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Journal Smooth Muscle Research*. v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KOH, K. K.; OH, P. C.; WUON, M. J. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? **Cardiovascular Research**, v. 81, p. 649-659, 2009.

KONIGSBERG, M. *et al.* Uncoupling effect of mercuric chloride on mitochondria isolated from a hepatic cell line. **J Appl Toxicol**, v. 21, p. 323-329, 2001.

KRISTEK, F.; GEROVA, M. Hypotrophy of conduit artery walls of the offspring of nitric oxide-defective rats. **Braz J Med Biol Res**. v. 37, p. 601-606, 2004.

LANGWORTH, S. Exposure to mercury vapor and impact on health in the dental profession in Sweden. **J Dent Res**, v. 76, n. 7, p. 1397-404, 1997.

LE MELLAY, V.; GROSSE, B.; LIEBERHERR, M. Phospholipase C β and membrane action of calcitriol and estradiol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 18, p. 11902-11907, 1997.

LEDOUX, J. *et al.* Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-76, 2006.

LEE, C. H.; WEI, Y. H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. **Exp Biol Med**, v. 232, p. 592-606, 2007.

LEISTEVUO, J. *et al.* Dental amalgam fillings and the amount of organic mercury in human saliva. **Caries Res**, v. 35, n. 3, p. 163-6, 2001.

LEMOS, N. B. *et al.* Low mercury concentration produces vasoconstriction, decreases nitric oxide bioavailability and increases oxidative stress in rat

LIM, S.; CHUNG, H. U.; PAEK, D. Low dose mercury and heart rate variability among community residents nearby to an industrial complex in Korea. **Neurotoxicol**, v. 31, n. 1, p. 10-6, 2010.

LINCOLN, T.; DEY, N.; SELLAH, H. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v.91, 2001.

LINDBERG, S. E. *et al.* A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. **Ambio**, v. 36, p. 19-32, 2007.

LIM, H. E. *et al.* Mercury inhalation poisoning and acute lung injury. **Korean J Intern Med**, v. 3, n. 2, p. 127–30, 1998.

LIU, D. *et al.* A vasoconstrictor response to COX-1-mediated prostacyclin synthesis in young rat renal arteries that increases in pre-hypertensive conditions. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, p. 804-811, 2015.

LORSCHIEDER, F. L.; VIMY, M. J. Mercury from dental amalgam. **Lancet**, v. 336, p. 1578-9, 2008.

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

MACHADO, A. C. *et al.* Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24:, p. 92-97, 2007.

MAGOS, L. Review on the toxicity of ethylmercury, including its presence as a preservative in biological and pharmaceutical preparations. **J Appl Toxicol**, v. 21, p. 1-5, 2001.

MAHBOOB, M. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. **J Environ Sci Health B**, v. 36, p. 687–697, 2001.

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

MASSARONI, L. *et al.* Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of mercury in anaesthetized rats and in langendorff perfused rat hearts. **Pharmacol Res**, v. 32, n. 1-2, p. 27-36, 1995.

MATURANA, M. A.; IRIGOYEN, M. C.; SPRITZER, P. M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. **Clinics**, v. 62: 77-866, 2007.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem Sci**, v. 2, p. 47-481, 1997.

MCKELVEY, W. *et al.* A Biomonitoring Study of Lead, Cadmium, and Mercury in the Blood of New York City Adults. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 10, p. 1435–41, 2007.

MICARONI, R. C. C. Compostos de mercúrio. revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, V.23, n. 4, 2000.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos - Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânico. Lei 685, 1998.

MIZUTANI, K. *et al.* Biomechanical properties and chemical composition of the aorta in genetic hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 17, p. 481–7, 1999.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin. **Pharmacol**, v. 30, n. 3, p. 293–331, 1979.

MULVANY, M.J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News Physiol Sci**, v. 17, p. 105-109, 2002.

MULVANY, M.J. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. **J Vasc Res**, v. 40, p. 558-560, 2003.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, p. 19-26, 1977.

MÜNZEL, T. *et al.* Role for NADPH/NADH Oxidase in the Modulation of Vascular Tone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 874, n. 1, p. 386-400, 1999.

MUTCHLER, S. M.; STRAUB, A. C. Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. **Nitric Oxide**, v. 49, p. 8-15, 2015.

NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**, v. 1, p. 176, 2001.

NAVA, E. *et al.* Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. **J Hypertens**, v. 16, p. 609-615, 1998.

NAVA, E. *et al.* Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneously hypertension. **Circulation**, v. 9, n. 9, p. 2310-2313, 1995.

OMANWAR S. *et al.* Persistence of EDHF pathway and impairment of the nitric oxide pathway after chronic mercury chloride exposure in rats: Mechanisms of endothelial dysfunction. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n.11, p. 1777–84, 2011.

Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). Cooperação Técnica entre Brasil, Bolívia e Colômbia: Teoria e Prática para o Fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas ao Mercúrio. Brasília, Brasil- 2011. ISBN 978-92-75-71658-8.

PACHECO-FERREIRA, H. Epidemiologia das substâncias químicas neurotóxicas. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu; 2008: 577-86.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, n. 2, p. 170-180, 2008.

PARKER, S. K. *et al.* Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorders: a critical review of published original data. **Pediatrics**, v.114, p. 793-804, 2004.

PARKINGTON, H. C. *et al.* Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. **Journal of Physiology**, v. 484, n. 2, p. 469-80, 1995.

PASSOS, C. J. *et al.* Condições de negócios e exposição ao mercúrio (Hg) através do consumo de peixe: um estudo de caso em Santarém, Pará, Brasil. **Revista Saúde Ambiente**, v. 6, p. 3-11, 2003.

PASSOS, C. J. S.; MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Cad Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 503–20, 2008.

PAULIS, L., *et al.* Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation in Nw-nito-L-arginine-methyl ester-induced hypertension: the effect on pulse wave velocity and aortic remodelling. **Hypertension**. v. 59, p.485-492, 2012.

PEÇANHA, 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. **J Physiol Pharmacol**, v. 61, n. 1, p. 29-36, 2010

PEPINE, C. J. The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n.5, p. 10-5, 2009.

PICHICHERO, M. E. *et al.* Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. **Lancet**, v. 360, p. 1737-41, 2002.

PINHEIRO, M. C. N. *et al.* Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environ Int**, v. 33, p. 56–61, 2007.

RAMÍREZ, A. Intoxicación ocupacional por mercurio. **An. Fac. Med**, v. 69, n. 1, p. 46-51, 2008.

RATHAUS, M.; BERNHEIM, J. Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, n. 2, p. 216-21, 2002.

RATTMANN, Y.D, Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. 2009.145f. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

REUS, I. S. *et al.* Relationship between expression of HSP70 and metallothionein and oxidative stress during mercury chloride induced acute liver injury in rats. **J Biochem Mol Toxicol**. v. 17, n. 3, p. 161–168, 2003.

RIBEIRO JÚNIOR, R. F. *et al.* Myocardial Contractile Dysfunction Induced by Ovariectomy Requires AT 1 Receptor Activation in Female Rats. **Cell Physiol Biochem**, v. 30, n. 1, p. 1–12, 2012.

RIBEIRO JÚNIOR, R. F. *et al.* Tributyltin chloride increases phenylephrine-induced contraction and vascular stiffness in mesenteric resistance arteries from female rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 295, p. 26–36, 2016.

RICE, D. C.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 3, p. 511-533, 2000.

RIOUX, F.; BERKOWITZ, B. A. Role of the thyroid gland in the development and maintenance of spontaneous hypertension in rats. **Circ. Res.** v. 40, p. 306–312, 1977.

RIZZETTI, D. A. *et al.* Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low Concentrations of Mercury. **PLoS One**, v. 8, n. 2, :e55806, 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. **Environ Res**, v. 155, p. 182–92, 2017.

RIZZONI, D. *et al.* Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. **Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 785-90, 1996.

ROSSI, M. *et al.* Cutaneous vasodilation to acetylcholine in patients with essential hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 29, n. 3, p. 406-11, 1997.

ROSSONI, L. V. *et al.* The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 34, p. 887-892, 1999.

RUBANYI, G. M. The role endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. **J. Cardiovasc. Pharmacol**, v. 22, n. 4, p. 1-14, 1993.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **American Journal of Physiology**, v. 250, p. 82-827, 1986.

SANDBORGH-ENGLUND, G. *et al.* Mercury in biological fluids after amalgam removal. **Journal of Dental Research**, v. 77, p. 615- 624, 1998.

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. 645-655, 1995.

SALONEN, T. J. *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.

SANTOS, E. C. O. *et al.* Exposição ao mercúrio na população urbana da cidade de Rio Branco, Estado do Acre, Brasil. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 69, p. 314-9, 2002.

SATO, R. L.; LI, G. G.; SHAHA, S. Antepartum seafood consumption and mercury levels in newborn cord blood. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, n. 6, p. 1683-8, 2006.

SCHEIDT, W. Mercury poisoning in Mozart, Beethoven and Schubert? **Med Klin**, v. 62, n.5, p. 195-6, 1967

SCHIFFRIN, E. L. Vascular endothelin in hypertension. **Vasc Pharmacol**, v. 43, p. 19-29, 2005.

SCHUURS, A. H. Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. **J Dent**, v. 27, n. 4, p. 249-56, 1999.

SELIN, N. *et al.* Chemical cycling and deposition of atmospheric mercury: Global constraints from observations. **Journal of Geophysical Research**, v. 112, p. 23-28, 2007.

SIMMONS-WILLIS, T. A. *et al.* Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neural amino acid transport (LAT) 1 and LAT2. **Biochem. J**, v. 367, p. 239-46, 2002.

SIMÕES M. R. Exposição crônica ao chumbo aumenta a reatividade vascular através de mecanismos dependentes do estresse oxidativo e da ciclooxigenase-2: ativação da via das MAPKs. Tese de Doutorado, 2015. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

SMITH, W. L. *et al.* Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem**, v. 271, p. 33157–33160, 1996.

STACCHIOTTI, A. *et al.* Mercuric chloride-induced alterations in stress protein distribution in rat kidney. **Histol Histopathol**, v. 19, p. 1209–1218, 2004.

STECKELINGS, U. M. *et al.* The AT2 receptor: a matter of love and hate. **Peptides**, v. 26, p. 1401–1409, 2005.

STERN, A. H. Balancing the risks and benefits of fish consumption. **Ann Intern Med**, v. 142, n. 11, p. 949, 2005.

SU, L. *et al.* The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. **Exotoxicol Environ Saf**, v. 70, n. 3, p. 483-489, 2008.

SUZUKI, H. *et al.* Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, v. 3, p. 305–322, 2005.

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.

SZASZ, T. *et al.* A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 232, n. 1, p. 27-37, 2007.

SZEMEREDI, K. *et al.* Sympathoadrenomedullary hyper-responsiveness to yohimbine in juvenile spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**, v. 43, n. 13, p. 1063–8, 1988

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, p. 1075-1081, 2003.

THURSTON, S. W. *et al.* Does prenatal methylmercury exposure from fish consumption affect blood pressure in childhood? **Neurotoxicology**, v. 28, n. 5, p. 924-30, 2007

TOROK, J. *et al.* Functional and structural pattern of arterial responses in hereditary hypertriglyceridemic and spontaneously hypertensive rats in early stage of experimental hypertension. **Physiol Res**. v. 55, n.1, p.65-71, 2006.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 248-52, 2004.

TSUDA, K. *et al.* Presynaptic α 2-adrenoceptor mediated regulation of norepinephrine release in perfused mesenteric vasculatures in young and adult spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 51, p. 25–32, 1987.

TUCKER, D. C.; JOHNSON A. K. Development of autonomic control of heart rate in genetically hypertensive and normotensive rats. **Am. J. Physiol.** v. 246, p. 570–577, 1984.

U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Mercury, março de 1999. (Consultado em 18 de março de 2019). Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>

UNEP (2008). The Global Atmospheric Mercury Assessment: Sources, Emission, Transport. Geneva, Switzerland, UNEP Chemicals Branch (http://www.chem.unep.ch/mercury/Atmospheric_Emissions/UNEP%20SUMMARY%20REPORT%20%20CORRECTED%20May09%20%20final%20for%20WEB%202008.pdf, accessed 29 March 2019).

United Nations Environment Programme (UNEP). Global Mercury Assessment. UNEP Chemicals Mercury Programme. 2002. (Consultado em 15 de março de 2019). Disponível em: www.chem.unep.ch/mercury/Report/Final%20Assessment%20report.htm

United States Food and Drug Administration (US FDA). Mercury Levels in Commercial Fish and Shellfish. 2006. (Consultado em: 15 de março de 2019). Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/sea-mehg.html>

URAKAMI-HARASAWA, L. *et al.* Importance of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in Human Arteries. **J Clin Invest**, v. 100, n. 11, p. 2793–9, 1997.

USHIO-FUKAI, M. *et al.* Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**, v. 55, p. 142–149, 1999.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006

VAN VLEET, T.; SCHNELLMANN, R. Toxic nephropathy: environmental chemicals. *Semin Nephrol*, v. 23, p. 500–508, 2003.

VANHOUTTE, P. M.; TANG, E. H. C. *et al.* Endothelium-dependent contractions: When a good guy turns bad! **J Physio**, v. 586, n. 22, p. 5295–304, 2008.

VASSALLO, D. V. *et al.* Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 156, n. 2, p. 113-118, 1999.

VASSALLO, D. V. *et al.* Effects of Chronic Exposure to Mercury on Angiotensin-Converting Enzyme Activity and Oxidative Stress in Normotensive and Hypertensive Rats. **Arq Bras Cardiol**, p. 1–7, 2018.

VAZIRI, N. D. *et al.* Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 31, n. 6, p. 1248–54, 1998.

VIRDIS, A. *et al.* Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice. **Hypertension**, v. 49, p. 679–86, 2007.

VIRTANEN, J. K. *et al.* Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **J Nutr Bioche**, v. 18, n. 2, p. 75–85, 2007.

VIRTANEN, J. K. *et al.* Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in Eastern Finland. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 1, p. 228-233, 2005.

WAKITA, Y. Hypertension induced by methyl mercury in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 89, n. 1, p. 144-147, 1987.

WEBB, J. *et al.* Mercúrio em comunidades de peixes da Amazônia Andina, Vale do Rio Napo, Equador. **Ecohealth**, v. 1, n. 2, p. 59-71, 2004.

WEINSBERG, F. *et al.* Effects of inorganic mercury (Hg²⁺) on calcium channel currents and catecholamine release from bovine chromaffin cells. **Arch Toxicol**, v. 69, n. 3, p. 191–6, 1995.

WIGGERS, G. A. *et al.* Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* v. 147, n. 2, p. 252-260, 2008a

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. 1033-1043, 2008b.

WILLIAMS, S. P. *et al.* Modulation of phorbol ester-induced contraction by endogenously released cyclooxygenase products in rat aorta. **Am J Physiol**, v. 267, p. 1654-1662, 1994.

WITZTUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, v. 34, p. 793–5, 1994.

World Health Organization (WHO). Children's Exposure to Mercury Compounds. Library Cataloguing-in-Publication Data. 2010. ISBN 978 92 4 150045 6.

World Health Organization (WHO). Methyl Mercury. V. 101. International Programme on Chemical Safety. Geneva, Switzerland, 1996.

World Health Organization (WHO). Technical Report Series 922. Sixty-first report of the Joint

WRIGHT, D. H. *et al.* Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, n. 5, p. 1343-60, 2001.

WU, K. K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. **Adv Pharmacol**, v. 33, p. 179–207, 1995.

WU, C. *et al.* Evidence for Inducible Nitric Oxide Synthase in Spontaneously

Hypertensive Rats from L-arginine into L-citrulline , or a complex molecule yielding NO , accounts for many of the physiological control of blood pressure is now well established . **In addition**, v. 466, p. 459–66, 1996.

WU, R. *et al.* Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 19, p. 741-48, 2001.

XIE, Q. W. *et al.* Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from Mouse macrophages. **Science**, v. 256, p. 25-28, 1992.

YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). Experimental and Genetic Models of Hypertension. **Handbook of Hypertension**. Elsevier, p.224-39, 1984.

YEE, S.; CHOI, B. H. Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. **Exp Mol Pathol**, v. 60, n. 3, p. 188-96, 1994.

YIN, Z. *et al.* The methylmercuryl-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. **J Neurochem**, v. 107, p. 1083–90, 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: 1055-61, 2000.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacology Review**, v. 52, p. 113-143, 2000.

ZALUPS, R. K.; LASH, L. H. *et al.* Invited review: Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. **J Toxicol Environ Health**, v. 42, n. 1, p. 01-44, 1994.

ZHAN, C. D. *et al.* Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. **J Hypertens**, v.22, n.10, p. 2025-33, 2004.

ZHAO, Y. *et al.* Endothelial Nitric Oxide Synthase-Independent Release of Nitric Oxide in the Aorta of the Spontaneously Hypertensive Rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 344, n. 1, p. 15–22, 2012.

ZHENG, Y.; MONESTIER, M. Inhibitory signal override increases susceptibility to mercury-induced autoimmunity. **J Immunol**, v. 171, p. 1596–1601, 2003.

ZYGMUNT, P. M. *et al.* Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. **British journal of pharmacology**, v. 121, n. 1, p. 141-149, 1997.