UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EVELLYN RODRIGUES CORDEIRO

EXPOSIÇÃO AGUDA AO HGCL₂ INDUZ OS RECEPTORES ERα E ERβ A AGIREM COMO VASOCONSTRITORES E PROMOVE DENUDAÇÃO ENDOTELIAL ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/Akt

Universidade Federal do Espírito Santo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

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 **Evellyn Rodrigues Cordeiro**, intitulada **"Exposição aguda ao HgCl2 induz os receptores ERα e ERβ a agirem como vasoconstritores e promove denudação endotelial através da via de sinalização Pl3K/Akt** ", 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^a DR^a ALESSANDRA SIMÃO PADILHA Presidente da Comissão Julgadora - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas PROF^a DR^a SONIA ALVES GOUVEA Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

PROF DR DALTON VALENTIM VASSALO Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais (Dora e Eurico) por incentivarem a **pequena** Evellyn a sempre fazer a pergunta mais importante da vida de um **grande** pesquisador: "**Por que?**"

AGRADECIMENTOS

A Deus toda honra e toda a glória! Senhor, desde pequena entrego minha vida em Tuas mãos e Você cuida dela com zelo e amor. Em minhas orações sempre repito: "Tomara que as nossas vontades coincidam. E se não coincidirem, que a Sua prevaleça." O mestrado foi vontade Sua, e tornou-se nossa quando entendi o propósito por trás de tudo que estava vivendo até então. Obrigada por me reservar tamanho presente e por enviar tantos anjos no decorrer dessa jornada.

Aos meus pais, Dora e Eurico, por todo amor e exemplo. Cresci vendo meus pais lendo muitos livros e me incentivando a fazer o mesmo. Acredito que talvez seja por isso que o meu maior sonho sempre foi estudar e crescer profissionalmente. Me permitiram viver o que não tiveram oportunidade e eu sei o quanto esse mestrado encheu seus corações de felicidade. Por isso afirmo: essa conquista é nossa! Amo vocês.

Aos meus irmãos Nícolas e Victor, agradeço pelos momentos de descontração que proporcionam sempre. À minha cunhada e amiga Mari, agradeço infinitamente por ser o elo forte da família, cuidando de cada um de maneira especial. À minha prima Keila, agradeço por me incentivar a continuar firme em meu propósito e por sempre ter uma palavra de carinho.

Aos meus sobrinhos Caio e Liz, agradeço por preencherem a minha vida de alegria. Nos momentos difíceis resgatei parte da força junto deles! A titia ama daqui até no céu!

Aos amigos, agradeço principalmente a compreensão em relação a ausência nesses anos de mestrado e pela torcida até aqui. Sobretudo, obrigada a Dani e Carol por acreditar em mim quando nem eu acreditei. Foram fortaleza!

À Rosi agradeço por TUDO e principalmente por me tratar como uma filha. Foi a pessoa que me mostrou um mundo de possibilidades e me fez ter coragem de ingressar no mestrado. De aluna tornou-se amiga e de certa forma, mentora. Obrigada por me permitir viver esse sonho e por cuidar de mim com tanta dedicação. Serei eternamente grata por acreditar que eu seria capaz e por fim, me apresentar ao Chefe.

Ao Prof^o Dr Dalton Valentim Vassallo, nosso Chefe e querido orientador de mestrado, agradeço a honra de poder ser sua aluna! Obrigada por enxergar potencial naquela menina sincera que em 2016 confundiu você com o zelador do prédio (risos). Admiro seu bom humor, humildade e otimismo. Suas palavras de conforto e incentivo me deram força nos momentos difíceis, principalmente na reta final desse mestrado! Obrigada por todo o carinho Chefe. A recíproca é verdadeira.

À minha coorientadora, Dr^a Maylla Ronacher Simões, agradeço por sua essencial orientação durante o desenvolvimento do projeto de mestrado.

Agradeço aos companheiros de LEMC que sempre estiveram dando apoio. Apoio esse que fortaleceu e deu ânimo! Não citarei nomes para não correr o risco de esquecer alguém, mas os verdadeiros sabem quem são e a importância que tiveram nessa fase. Vocês são minha segunda família!

Dentre os amigos que fiz no LEMC, uma pessoa foi essencial: Tati (pra mim será sempre Tatinha!). Pessoa que transborda sentimentos bons e que sempre tem um uma palavra carinhosa para todos os momentos. Foi meu ponto de paz e companhia! Obrigada por me permitir aprender tanto com você e por cuidar de mim quando o desespero tomou conta. Sua amizade é um presente!

Ao meu amigo e irmão, Charles, que alegria em compartilhar dessa amizade! Nos momentos bons e principalmente nos ruins, sempre pude contar com sua amizade sincera. Seu carinho e incentivo foram primordiais na conclusão desse mestrado. Agradeço a parceria que construímos ao longo desses anos! Somos e seremos força um para o outro.

Ao Anderson, nosso eterno Mister *Renderson,* o meu profundo agradecimento por toda a disponibilidade em laboratório, seja para preparar as soluções, fazer cálculos ou para resolver problemas técnicos com o aparato da Aorta. Obrigada pela amizade e por me proporcionar tanto aprendizado.

À todos os professores que de certa forma contribuíram com a minha formação pessoal e acadêmica, meu profundo agradecimento. Tive a honra de ter grandes exemplos em sala de aula.

Aos funcionários da secretaria, da limpeza e aos técnicos dos demais laboratórios que prontamente mantém nosso ambiente de estudo/trabalho organizado, obrigada.

Às ratas, meu profundo respeito e gratidão. Foram essenciais na conclusão desse projeto e serão eternamente lembradas pela comunidade científica.

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

"Disse a flor ao Pequeno Príncipe: É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas."

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

As doenças cardiovasculares são mais frequentes entre as mulheres na pósmenopausa devido ao declínio da concentração plasmática de estrogênio, evidenciando o importante papel de modulador vascular que esse hormônio exerce. A regulação da reatividade vascular pelos receptores de estrogênio está relacionada principalmente à manutenção da função endotelial normal. Entretanto, seus efeitos moduladores vasculares são controversos, uma vez que também ocorrem em condições patológicas em mulheres que fazem uso de contraceptivos orais e reposição hormonal. Como o mercúrio está amplamente associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e já é comprovado sua capacidade de alterar o funcionamento dos receptores de estrogênio, investigamos os possíveis efeitos nocivos sobre os mecanismos que modulam a reatividade vascular à fenilefrina nos anéis aórticos isolados de ratas Wistar (250- 300g), promovidas pela exposição aguda ao HgCl₂ (6 nM) durante 45 minutos. O mercúrio aumentou o estresse oxidativo e a reatividade vascular estimulando a atividade da NADPHoxidase, ciclooxigenase-2 (COX-2) e a produção de tromboxano A₂ (TXA₂). O metal também induziu denudação endotelial na aorta, evidenciada por microscopia eletrônica de varredura, reduzindo a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e aumentando a atividade da via de sinalização PI3K/Akt. Além do exposto, nossos resultados sugerem que o mercúrio ativa mecanismos que estimulam a vasoconstricção via receptores estrogênicos nucleares (ERa, ERB). Nossos resultados sugerem que o mercúrio pode aumentar as chances de desenvolver doenças cardiovasculares em mulheres através de aumento do estresse oxidativo, redução da biodisponibilidade de NO, aumento da produção de TXA2 e alteração do funcionamento de ERa e ERB, devendo ser considerado um importante fator de risco ambiental.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are more frequent among postmenopausal women due to the decline in the estrogen plasma concentration, evidencing the important role of vascular modulator that this hormone exerts. The regulation of vascular reactivity by estrogen receptors is mainly related to the maintenance of normal endothelial function. However, its vascular modulatory effects are controversial, since they also occur in pathological conditions in women who use oral contraceptives and hormone replacement. As mercury is widely associated with the development of cardiovascular diseases, we investigated putative hazardous effects on the mechanisms that modulate vascular reactivity in aortic rings of female Wistar rats promoted by acute HgCl₂ exposure (6 nM) for 45 minutes. Mercury increased oxidative stress and vascular reactivity stimulating NADPHoxidase, COX-2 activity and production de thromboxane A₂ (TXA₂). The metal also induced endothelial denudation in the aorta, evidenced by scanning electron microscopy, by reducing the bioavailability of nitric oxide (NO) and enhancing the activity of the PI3K/Akt signaling pathway. In addition to the above, our results suggest that mercury activates mechanisms that stimulate vasoconstriction via nuclear estrogen receptors (ER α , ER β). Our results suggest that mercury may increase the chances of developing cardiovascular disease in women by increasing oxidative stress, reducing NO bioavailability, increasing TXA2 production, and altering the functioning of ERa and ER β , and should be considered an important environmental risk.

1.INTRODUÇÃO	17
1.1 Mercúrio	17
1.2 Efeitos tóxicos do mercúrio	19
1.3 Tônus vascular	
1.4 Receptores de estrogênio e o tônus vascular	23
1.5 O mercúrio como ligante dos receptores de estrogênio	25
2. JUSTIFICATIVA	
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos gerais	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. METODOLOGIA	32
4.1 Animais experimentais	32
4.2 Determinação das fases do ciclo estral	32
4.3 Metodologia empregada para obtenção dos anéis isolados torácica	de aorta 33
4.3.1 Teste de viabilidade dos anéis aórticos	
4.4. Detecção in situ da quantidade de ânion superóxido	
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
4.6 Análise estatística	
5. RESULTADOS	42
5.1. Efeito do mercúrio na reatividade vascular	42
5.2 Participação do endotélio na resposta vascular	43
5.3 Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico sobre a resposta	vascular 44
5.4 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vasc	ular 45
5.5 Participação dos receptores AT1 na resposta vascular	48
5.6 Participação da ciclooxigenase e do tromboxano A2 na resposta	ı vascular 49
5.7 Participação dos receptores ERα, ERβ e GPER e da via de si Pl3k/Akt	nalização 53

SUMÁRIO

5.8 Microscopia eletrônica de varredura no endotélio (MEV)	56
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	66
8. REFERÊNCIAS	68

ANEXO

Parecer do comitê de ética

FIGURAS

Figura 2: Avaliação da reatividade vascular "in vivo" em anéis isolados de aorta....... 34

Figura 3: Registro representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCI e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCI: A) Período de estabilização inicial (30 min permanecendo na tensão de $0.9 \pm 1.2 \text{ g}$); B) Adição de KCI (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCI (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCI (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução da integridade funcional do endotélio: I) Précontração (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Précontração com fenilefrina (10-7 a 10-6 M) ou mais até atingir 50% do 2º KCI; J) Adição de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (Marques, 2015).

Figura 9: Efeito do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (30 µM), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os

LISTA DE SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AT1	Receptor tipo 1 de angiotensina II
CH₃Hg⁺	Metilmercúrio
CH₃CH₃Hg⁺	Etilmercúrio
COX-2	Ciclooxigenase-2
dAUC	Diferença da área sob as curvas
DHE	Dihidroetídeo
DVC	Doenças cardiovasculares
E+	Endotélio íntegro
E-	Sem endotélio
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
ER	Receptor de estrogênio
ERα	Receptor nuclear alfa
ERβ	Receptor nuclear beta
FE	Fenilefrina
GPER	Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
HDL	Lipoproteína de baixa densidade

Hg	Mercúrio
Hg⁰	Mercúrio elementar
Hg ₂ ²⁺	Íon mercuroso
Hg ²⁺	Íon mercúrico
HgCl₂	Cloreto de mercúrio
KCL	Cloreto de potássio
LEMC	Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ₂	Ânion superóxido
он.	Radical hidroxila
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SH	Grupo tiol
TXA2	Tromboxano A2
Zn ²⁺	Zinco

INTRODUÇAO

1.INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio

O mercúrio (Hg) merece destaque entre os metais pesados devido à sua elevada toxicidade e extrema mobilidade nos ecossistemas (ALEXANDRE, 2006). É considerado o mais perigoso e o que melhor exemplifica a diversidade dos efeitos tóxicos causados por esses metais, devido sua diversidade em espécies químicas e capacidade de bioacumulação (MATULIK et al., 2017).

A maior fonte natural de mercúrio ocorre pelo desgaste da crosta terrestre, além da produção industrial de geradores de eletricidade, lâmpadas de mercúrio, extração de ouro, refinarias, pilhas e incineração de lixo hospitalar e urbano (RIZZETTI et al., 2013). A exposição e a capacidade absortiva assim como os efeitos no organismo são dependentes do tempo e da forma química (ZAVARIZ; GLINA, 1992), podendo ocorrer de forma direta, ocupacional ou ambiental (ZEITZ et al., 2002; SWAIN et al., 2007).

É encontrado sob uma variedade de formas físicas e químicas, sendo dividido em espécies elementares, orgânicas e inorgânicas. O mercúrio elementar (Hg⁰) é encontrado em amálgamas dentárias, termômetros e termostatos. Representa o único metal que ocorre em aspecto líquido à temperatura ambiente com capacidade para atravessar a atmosfera em um estado vaporizado (PATRICK, 2002) e prontamente ser absorvido por inalação (CLARKSON et al., 2007; HOUSTON, 2007).

O mercúrio inorgânico pode ser encontrado sob a forma de íon mercuroso (Hg_2^{2+}) e íon mercúrico (Hg_2^{+}) . Esses metais podem combinar-se com outros elementos químicos e formar sais, como o cloreto de mercúrio $(HgCl_2)$ (AZEVEDO, 2003), que possui extremo potencial corrosivo e alta toxicidade (NASCIMENTO; CHASIN, 2001).

A forma orgânica deriva da biotransformação do Hg²⁺ em metilmercúrio (CH₃Hg⁺) e etilmercúrio (CH₃CH₃Hg⁺) (JOHNSON, 2004), sendo muito perigosa

por sua alta afinidade com o sistema nervoso central (NASCIMENTO; CHASIN, 2001).

O mercúrio pode afetar a saúde humana em três formas mais comuns: através do metilmercúrio adquirido pelo consumo de peixes (PEREZ, 2008), etilmercúrio contido em timerosal, muito utilizado na preservação de vacinas (CLARKSON, 2002) e o vapor de mercúrio, liberado pelas amálgamas dentárias, por exemplo (SAQUY, 1996).

No organismo, causa efeitos prejudiciais em diversos órgãos e tecidos dependendo da forma química, duração, nível e rota de exposição (ZALUPS; LASH, 1994), e é importante ressaltar que esse metal não tem papel fisiológico conhecido no metabolismo humano, sendo de difícil eliminação já que nós carecemos de mecanismos eficazes para excretá-lo.

Os efeitos prejudiciais do mercúrio chamaram a atenção da comunidade científica após acidentes ocorridas no Japão e no Iraque. O primeiro aconteceu na aldeia Minamata (1953), após despejo de metilmercúrio como subproduto industrial diretamente na baia, causando bioacumulação na cadeia alimentar de plânctons, moluscos e peixes (CLARKSON, 2002). Os frutos do mar foram ingeridos pelos habitantes locais e estes apresentaram sintomas de doença neurológica como perda de controle motor, comprometimento da fala, retardo mental, tremores incontroláveis, distúrbios sensoriais, coma e morte (TSUBAKI, 1978; CAROCCI et al, 2014). Já em 1971, no Iraque, ocorreu um importante episódio de intoxicação por metilmercúrio quando o pão foi produzido a partir de sementes de trigo que haviam sido tratadas com fungicidas que continham compostos orgânicos de mercúrio (BAKIR et al., 1973; CAROCCI et al., 2014), ocasionando cegueiras, retardo mental e paralisia cerebral especialmente em crianças expostas ainda no útero (GUZZI ; LA PORTA, 2008).

Todas as formas de mercúrio causam efeitos tóxicos em diferentes órgãos e tecidos ao serem absorvidos e dependendo da forma química, duração e rota de exposição (ZALUPS, 2000). Segue adiante a descrição de alguns efeitos do mercúrio nos principais sistemas afetados.

1.2 Efeitos tóxicos do mercúrio

No sistema imunológico, as propriedades imunotóxicas dos compostos mercúricos tem sido foco de pesquisas e são associadas ao desenvolvimento de várias doenças auto-imunes (STERZL et al., 1999; HYBENOVA et al., 2010) como a esclerose múltipla (STEJSKAL, 2015) e a doença celíaca (KAMYCHEVA et al., 2017). O Hg parece atuar aumentando a produção e ativação de anticorpos e imunoglobulinas séricas (SAPIN et al., 1977; MATHIESON, 1992; BAGENSTOSE et al., 1998) Tais efeitos resultam em imunossupressão, imunomodulação, imunoestimulação e processos alérgicos através da alteração da produção de citocinas imonológicas (KERN et al., 2014; BERLIN et al., 2015).

Outro sistema que merece ser mencionado é o respiratório, em que os efeitos da exposição aguda aos vapores de Hg são edema pulmonar, fibrose, pneumonia, congestão (BLUHM et al., 1992; TAUEG et al., 1992) e lesões pulmonares similares às constatadas em pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda (ROWENS et al., 1991).

Já no sistema nervoso, os efeitos do mercúrio são amplamente estudados. Sabe-se que os compostos de Hg geralmente são transportados por meio do complexo cisteína (SIMMONS-WILLIS et al., 2002) e se ligam a grupos tiol (SH) presentes em neurônios e células da glia. Essas células possuem enzimas e receptores muscarínicos, dopaminérgicos e nicotínicos que contém SH (WEINSBERG et al., 1995; SYVERSEN E KAUR, 2012) e na presença do Hg podem sofrer inibição e resultar em efeitos potencialmente neurotóxicos.

Os rins também são afetados pelo mercúrio através de sua alta afinidade por grupos SH. Sua capacidade de acumulação nesse órgão leva a efeitos nefrotóxicos, em especial nos túbulos proximais, que induzem falência renal tanto em humanos quanto em animais experimentais (ZALUPS; LASH, 1994; CLARKSON, 1997; ZALUPS, 2000; STACCHIOTTI et al., 2003).

Durante décadas o mercúrio foi associado principalmente ao sistema renal e nervoso central. Entretanto, o estudo de Salonen et al., (1995) promoveu

grande impacto na comunidade científica ao demonstrar dados epidemiológicos associando o mercúrio ao desenvolvimento da aterosclerose e maior risco da progressão de doenças cardiovasculares.

No sistema cardiovascular, as consequências da toxicidade do mercúrio incluem os riscos de hipertensão (WAKITA, 1987; CARMIGNANI et al., 1992), arritmias (MASSARONI et al., 1995), infarto do miocárdio (GONZALVO et al., 1997; SALONEN et al., 1999), doença cardíaca coronariana (GANTHER et al., 1972; BARREGÅRD et al., 1990; GUALLAR et al., 2002), acidentes vasculares cerebrais (SALONEN et al., 2000; BOFFETTA, 2001) e aterosclerose generalizada (CLARKSON, 2002). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas afecções além de diversos, são complexos.

Virtanen et al. (2005), em seu estudo, observaram que cada miligrama de mercúrio encontrada no cabelo equivale a 11% de aumento de risco de desenvolvimento de episódio cardiovascular agudo e 13% de aumento de risco de óbito por doença coronariana. De fato, tanto o mercúrio orgânico quanto o inorgânico concentram-se no coração e tem sido associado ao aumento da pressão arterial e desequilíbrio no ritmo cardíaco (MASSARONI et al., 1995; SØRENSEN et al., 1999).

O estudo pioneiro na associação da exposição ao mercúrio às alterações cardiovasculares foi desenvolvido em 1975 por Wojciechowski et al. Nessa pesquisa foi observado que coelhos evoluíam com trombose de artérias de pequeno e médio calibre, necrose nos músculos papilares e endotélio perivalvular, proliferação endotelial, processo inflamatório e fibrose na aorta ascendente, além de bradicardia após inalar vapor de mercúrio. Em estudos posteriores foi observado que a exposição aguda ao mercúrio sob concentrações micromolares de HgCl₂ induz arritmias e alterações na condução átrio-ventricular, redução da pressão sistólica e do desenvolvimento de força em corações de ratos (MASSARONI et al., 1992; VASSALLO et al., 1999).

Em relação aos vasos sanguíneos, sabe-se que através do uso de diferentes concentrações o Hg induz modificação do tônus vascular em modelos animais

(GOLPON et al., 2003), sendo observado vasoconstricção no leito caudal de ratos (CUNHA et al., 2000; WIGGERS et al., 2008a), assim como vasodilatação em artérias pulmonar e aorta (GOLPON et al., 2003), o que sugere que os efeitos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular ainda não estão totalmente esclarecidos e dependem da dose e do tempo de exposição.

Dentre os efeitos vasculares do Hg há um importante prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio em artérias basilares quando expostas cronicamente a baixas concentrações, possivelmente por disfunção endotelial (WIGGERS et al., 2016). Já em artérias caudais, foi constatado aumento da resposta vascular associados ao aumento de prostanoides da via ciclooxigenase, da ativação da enzima conversora de angiotensina (ECA) e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) após exposição a baixas doses (CUNHA et al., 2000; WIGGERS et al., 2008a; WIGGERS et al., 2008b).

Acredita-se que o aumento do estresse oxidativo seja um dos principais mecanismos através dos quais o mercúrio exerce seus efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular (VIRTANEN et al., 2007), já que foi constatado que a exposição ao mercúrio aumenta a produção de radicais livres em modelos animais (JANSSON; HARMS-RINGDAHL, 1993; CLARKSON, 1997; MAGOS, 1997). Além disso, o aumento da reatividade vascular causado pelo mercúrio também está associado à redução da biodisponibilidade de NO e disfunção endotelial, ocasionando aumento da resistência periférica e possível desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LEMOS et al., 2012). Os efeitos citados acima ocorrem em parte, devido à forte ligação que o mercúrio apresenta por inúmeras estruturas biológicas bloqueando suas atividades. De fato, ele exibe alta afinidade por SH (grupo tiol) de enzimas, proteínas, aminoácidos e antioxidantes contendo enxofre como o ácido α -lipóico, e N-acetilcisteína e glutationa peroxidase (GENCHI et al., 2017).

A glutationa peroxidase é a enzima antioxidante intracelular mais potente, atuando especialmente na mitocôndria (SHENKER et al., 1998), principal geradora de ROS (LEE; WEI, 2007). O mercúrio possui alta afinidade pelo selênio presente no sítio ativo da glutationa, reduzindo sua biodisponilidade e atividade antioxidante (RAYMOND et al., 2004). A afinidade do Hg por SH também pode levar a redução de outras importantes enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase, favorecendo a ocorrência de peroxidação lipídica (RUNGBY; ERNST, 1992; SHENKER et al., 1998).

Além dos mecanismos descritos, o mercúrio também pode inativar a enzima paraoxonase, um importante sistema de defesa antioxidante extracelular relacionado ao HDL (lipoproteína de alta densidade) (GONZALVO et al., 1997). Quando inativada, aumenta o risco para o desenvolvimento de aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, doença coronariana e estenose da artéria carótida (KULKA, 2016).

Outra via de formação de radicais livres que merece destaque é a reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{-} + OH^{-}$), aonde o mercúrio possivelmente ocupa o sítio ativo do ferro e desencadeia a produção de radical hidroxila (OH.), que é altamente prejudicial (VIRTANEN et al., 2007).

Diante do exposto e apesar de diferentes estudos associarem a exposição ao mercúrio ao desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV), os mecanismos intracelulares pelos quais esse metal pesado promove efeitos deletérios no controle do tônus vascular precisam ser melhor esclarecidos.

1.3 Tônus vascular

Tanto a integridade do músculo liso quanto a integridade estrutural e funcional das células endoteliais presentes no vaso sanguíneo são essenciais para a manutenção da homeostasia do tônus vascular.

O endotélio é fundamental na modulação do tônus vascular devido a síntese e liberação de um conjunto de fatores vasodilatadores e vasoconstrictores (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; VANHOUTTE, 2009; GODO; SHIMOKAWA, 2017). Para ocorrer a regulação do fluxo e da pressão sanguínea, a endotelina, as espécies reativas de oxigênio, tromboxano, angiotensina II e os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase promovem a vasoconstricção, enquanto o fator hiperpolarizante derivado do

endotélio (EDHF), as prostaciclinas e o óxido nítrico estimulam a vasodilatação (MATURANA et al., 2007; SANDOO et al., 2010).

Esses fatores vasoativos atuam em equilíbrio em condições fisiológicas, entretanto quando há redução da produção e/ou biodisponibilidade das substâncias vasodilatadoras, ocorre disfunção endotelial (MATURANA et al., 2007). Sabe-se que a disfunção endotelial está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares como diabetes mellitus (SHI; VANHOUTTE, 2017), hipertensão arterial (KONUKOGLU; UZUN, 2016), aterosclerose (CHENG et al., 2019) e insuficiência cardíaca (GIANNITSI et al., 2019) e que sua ocorrência aumenta na presença do mercúrio (CUNHA et al., 2000; WIGGERS, et al., 2008b; PEÇANHA et al., 2010; LEMOS et al., 2012; WIGGERS et al., 2016).

1.4 Receptores de estrogênio e o tônus vascular

A modulação vascular também ocorre através da ativação de duas classes de receptores de estrogênio (ER): os receptores nucleares alfa (ERα) e beta (ERβ) e os receptores de estrogênio acoplados a proteína G (GPER), responsáveis pela via de sinalização intracelular que medeia efeitos extra-nucleares (REVANKAR, 2005; LINDSEY et al., 2013).

Esses receptores são codificados a partir de genes distintos em cromossomos diferentes, gerando perfis de expressão díspares nos tecidos. ERα é encontrado predominantemente no fígado, útero, vagina, glândula mamária, hipófise, hipotálamo e colo do útero. Já a predominância da expressão de ERß é inclui: ovário, pulmão e próstata (COUSE et al., 1997). Em relação a GPER, é expresso em diversos tipos celulares e tecidos, incluindo os tecidos reprodutivos, ilhotas pancreáticas, fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, central. intestino, células inflamatórias sistema nervoso е sistema cardiovascular (PROSSNITZ; BARTON, 2011).

É de conhecimento que tanto o endotélio quanto o músculo liso dos vasos sanguíneos expressam ERs (KIM et al., 2014) e que eles desempenham importantes papéis na modulação vascular em condições fisiológicas e em

determinadas doenças (GRAY et al., 2001; CHAKRABARTI et al., 2008; RAFIKOVA; SULLIVAN, 2014).

A regulação da reatividade vascular pelos receptores de estrogênio está relacionada principalmente à manutenção da função endotelial normal (PÉREZ-CREMADES et al., 2018). De fato, diferentes estudos associam a ativação dos receptores em questão ao aumento da biodisponibilidade de NO e consequente vasodilatação (CHAMBLISS; SHAUL, 2002; NOVELLA et al., 2013; SOBRINO et al., 2017).

Além do NO, os receptores de estrogênio também foram implicados na biodisponibilidade de outras moléculas endoteliais, como aumento de prostaciclina (SOBRINO et al., 2010) assim como redução da endotelina-1 (DUBEY et al., 2001) e expressão do receptor tipo 1 de Angiotensina II (AT1) (NICKENIG et al., 1998).

Estudos mostram que o estrogênio desempenha um importante papel de modulador protetivo no sistema cardiovascular através da ativação dos ER. Entretanto, sendo as DCV as principais causas de morte entre as mulheres (IORGA et al., 2017; WOODWARD, 2019), é importante salientar que discrepâncias em seu desenvolvimento também envolvem os receptores em questão, isso devido a ativação de mecanismos complexos que precisam ser melhor investigados.

Sabe-se que as DVC são mais incidentes em mulheres após a menopausa devido ao declínio do estrogênio nessa fase, quando comparado às mulheres na fase reprodutiva e homens da mesma idade (IORGA et al., 2017).

Embora existam dados abundantes apoiando os receptores de estrogênio como agentes protetivos contra doenças cardiovasculares em mulheres em idade reprodutiva, a terapia hormonal com estrogênio em mulheres na pós menopausa e em uso de contraceptivos orais tem sido controversa (BASSUK; MANSON, 2015; SASSARINI; LUMSDEN, 2015; IORGA et al., 2017).

Há evidências de sua participação no desenvolvimento do câncer de mama (SAMAVAT; KURZER, 2015; MØRCH et al., 2017; SAMPSON et al., 2017), inflamação vascular (CUSHMAN, 2002; KASSI et al., 2015), acidente vascular

cerebral (GILLUM et., 2000; STIER et al., 2003), e tromboembolismo venoso (TCHAIKOVSKI; ROSING, 2010; FARRIS et al., 2017) durante a terapia estrogênica em mulheres na pós-menopausa e no uso de contraceptivos orais (BASSUK; MANSON, 2015; SASSARINI; LUMSDEN, 2015).

É importante ressaltar que a atuação dos receptores de estrogênio em condições fisiológicas e patológicas podem ocorrer tanto por ligação aos estrogênios endógenos, quanto por ligação à uma gama de substâncias químicas conhecidas como xenoestrógenos (SINGLETON, 2003; CHOE et al., 2003), dentre elas podemos destacar o mercúrio (WATSON et al., 2007; ZHANG, et al., 2008; FAROOQ, 2015; GAUDET et al., 2018).

1.5 O mercúrio como ligante dos receptores de estrogênio

Os xenoestrógenos são outros compostos além dos estrogênios fisiológicos que podem desencadear respostas estrogênicas (SINGLETON, 2003; WATSON et al., 2007) e podem ser encontrados no meio ambiente na composição de pesticidas, fumaça de cigarro, plásticos e pílulas anticoncepcionais (GAUDET et al., 2018).

Dentre os xenoestrogênios existem os inorgânicos, conhecidos como metaloestrógenos e como exemplo temos o cádmio, cobalto, cobre, chumbo e o mercúrio (BYRNE et al., 2013; GAUDET et al., 2018). O mercúrio é um dos metaloestrógenos mais importantes devido sua persistência no ambiente e capacidade de bioacumulação (EGIEBOR et al., 2013). Estudos mostraram que esse metal é capaz de ativar os receptores de estrogênio nucleares e desencadear cascatas de sinalização (CHOE et al., 2003; ZHANG, et al., 2008; FAROOQ, 2015; GAUDET et al., 2018).

Em células de câncer de mama humano o mercúrio induz a proliferação celular (MARTIN et al., 2003; ZHANG et al., 2008; GAUDET et al., 2018) e estimula o crescimento do útero de ratas ovariectomizadas, assim como a atividade da peroxidase (ZHANG et al., 2008).

Sua ligação aos receptores de estrogênio acontece através da sua capacidade de substituir os íons Zn²⁺ nos domínios proteicos (PREDKI; SARKAR, 1992;

Deegan et al., 2011) e possível modificações na estrutura tridimensional de proteínas alterando seu dobramento (ZHANG et al., 2008).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de novos estudos que investiguem o papel do mercúrio e sua interação com os receptores de estrogênio nos diferentes sistemas, bem como os mecanismos intracelulares envolvidos.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Embora os efeitos do mercúrio já tenham sido extensivamente estudados e associados a doenças cardiovasculares em diferentes leitos (CUNHA et al., 2000; WIGGERS et al., 2008b; PEÇANHA et al., 2010; LEMOS et al., 2012; WIGGERS et al., 2016), o efeito da exposição aguda a esse metal sob baixa concentração em vasos de condutância feminino e sua modulação endotelial ainda não foi investigado. Além disso, mesmo diferentes estudos demonstrando que o mercúrio é um metaloestrógeno, os mecanismos envolvidos após sua interação com os ER expressos no sistema cardiovascular, até onde sabemos, é desconhecido. Como a exposição a esse metal é generalizada e os receptores em questão são amplamente encontrados nos vasos sanguíneos (KIM et al., 2014), seu papel na etiologia e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares precisa ser investigado.

Nesse contexto, cientes do potencial deletério do mercúrio no sistema cardiovascular, nossa hipótese é que a exposição aguda desde composto sob baixa concentração (6 nM) em aorta de ratas leve a prejuízos na reatividade vascular e que esses efeitos possam estar relacionados aos receptores de estrogênio.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar os mecanismos pelos quais o mercúrio sob baixa concentração, exerce seus efeitos tóxicos sobre a reatividade vascular na aorta de ratas.

3.2 Objetivos específicos

Investigar efeitos da exposição aguda a 6 nM de HgCl₂ em segmentos isolados de aorta torácica de ratas sobre:

- 1. A reatividade vascular à fenilefrina;
- 2. Participação endotelial na resposta vascular à fenilefrina;
- 3. Relaxamento dependente e independente do endotélio;
- Participação do óxido nítrico, das espécies reativas do oxigênio, dos receptores AT₁, dos prostanoides derivados da COX, receptores de estrogênio e da via de sinalização rápida PI3k/Akt na reatividade vascular à fenilefrina;

Investigar efeitos da exposição aguda a 6 nM de HgCl₂ no endotélio da aorta torácica de ratas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Animais experimentais

Os experimentos foram realizados em ratas Wistar (250 a 300 g) de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (11/2018 CEUA-UFES). As ratas foram alojadas em gaiolas sob condições de ciclo de luz (12 h de luz-12 h de escuro), temperatura ambiente e umidade constante, tendo livre acesso à água e alimentadas com ração de rato convencional *ad libitum*. Vale a pena mencionar que, para minimizar o número de animais utilizados, foram tomadas precauções nesses experimentos.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular (LEMC) através de exposição aguda ao HgCl₂ em anéis aórticos retiradas dos animais submetidos previamente à anestesia. Todos os procedimentos foram desenvolvidos de acordo com os preceitos éticos e legais com o intuito de evitar o sofrimento aos animais.

A manipulação dos animais foi realizada utilizando equipamentos de proteção individual e o descarte dos cadáveres ou partes destes foi feita por acondicionamento em sacolas plásticas individuais e congelamento para posterior incineração, seguindo o protocolo regular de descarte de animais experimentais no laboratório.

4.2 Determinação das fases do ciclo estral

Os esfregaços vaginais foram coletados às 10:00 horas antes de cada experimento para detectar o proestro, a fase do ciclo estral em que a concentração plasmática de estrogênio aumenta (SMITH et al., 1975; SPORNITZ; SOCIN et al., 1999).

Cada esfregaço vaginal foi coletado com uma pipeta contendo 10 µL de solução salina (NaCl a 0,9%) por meio da introdução suave e superficial da ponta da ponteira na vagina da rata. A porção de salina foi liberado no interior da vagina e, posteriormente, aspirado e colocado em lâminas de vidro. Essas lâminas foram analisadas no microscópio de luz (Bel Photonics FLUO-2) sem o uso da lente condensadora, com 10x e 40x lentes objetivas. O ciclo estral foi

classificado como proestro, estro ou metaestro-diestro com base nas razões analisadas de leucócitos epiteliais nucleados, polimorfonucleares e cornificados (MARCONDES et al., 2002; NELSON et al., 1982).

A fase do diestro foi confirmada quando houve predomínio de leucócitos; uma predominância de células cornificadas caracterizou a fase do estro; a presença de células epiteliais nucleadas, cornificadas e leucócitos em proporções similares, foi um indicativo da fase metaestro-diestro. Por fim, a fase do proestro foi confirmada quando houve predomínio de células nucleadas epiteliais.

4.3 Metodologia empregada para obtenção dos anéis isolados de aorta torácica Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal com ketamina (50mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg). Após a anestesia, as ratas foram exanguinados logo após a identificação do proestro, e posteriormente as aortas torácicas descendentes foram cuidadosamente removidas e imersas rapidamente em placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01. Depois da retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seguimentos cilíndricos de aproximadamente 3,5 a 4 mm de comprimento (Figura 1).



Figura 1: Aorta torácica em placa de Petri contendo solução fria de Krebs após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo (ANGELI, 2009).

Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que fiquem paralelos na luz do vaso. Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a 36 ± 0.5 °C, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, mantendo o pH estável em 7,4. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso foi captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA – USA) e este a um computador.





4.3.1 Teste de viabilidade dos anéis aórticos

Depois de montados, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,9 a 1,2 gramas, reajustada, quando necessário, durante 30 minutos de estabilização (Figura 3A).

Posteriormente, foi administrado ao banho cloreto de potássio (KCI) (75 mM) para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Depois que atingiram uma variação de 1 g de força a partir do

valor basal, estes anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso. Os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados (Figura 3B).

Após 30 minutos de estabilização, uma nova dose de KCI (75 mM) foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de aproximadamente 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 3E e F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (0,9 a 1,2 gramas) e, após 30 minutos esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (FE) 10⁻⁷ M (concentração que induz aproximadamente 50% da contração máxima ao KCI 75 mM) (Figura 3I). Uma vez atingido o platô, uma dose única de ACh (10⁻⁵ M) foi aplicada (Figura 3J). Os anéis que relaxaram menos que 80% do platô foram descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10% ou até contraíram.



Figura 3: Registro representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCI e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCI: A) Período de estabilização inicial (30 min permanecendo na tensão de 0,9 ± 1,2 g); B) Adição de KCI (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCI (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCI (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-
contração com fenilefrina (10-7 a 10-6 M) ou mais até atingir 50% do 2º KCI; J) Adição de acetilcolina (ACh) 10-5 M; L) Troca de solução Krebs-Henseleit e período de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (MARQUES, 2015).

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, os anéis foram lavados três vezes para atingir o valor basal. Posteriormente a um período de estabilização, foi administrada ao banho uma concentração de 6 nM de HgCl₂, de maneira que a amostra de um mesmo animal foi dividida em dois grupos: o grupo que recebeu o HgCl₂ e o grupo controle (Figura 4). Para este protocolo experimental, selecionamos a concentração de 6 nM HgCl₂ com base em estudos anteriores em nosso laboratório (WIGGERS et al., 2008b; LEMOS et al., 2012).



Figura 4: Divisão dos anéis aórticos retirados da mesma rata distribuídos em dois grupos: o grupo que recebeu 6 nM de HgCl2 e o grupo controle.

Assim, após 15 min de exposição ao HgCl₂, o papel dos fatores vasoativos foi investigado por incubação com fármacos durante 30 min. Posteriormente, foi realizada uma curva concentração-resposta à FE (10⁻¹¹ a 3x10⁻⁷ M). Dessa maneira, a permanência total da incubação com o HgCl₂ foi de 45 minutos (Figura 5).



Figura 5: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Após 15 minutos de incubação com HgCl₂ foi adicionado o fármaco a ser estudado por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10-11 a 3x10-7 M). O efeito do fármaco em estudo foi simultaneamente avaliado no grupo controle e no grupo que recebeu HgCl₂ (modificado de LEMOS, 2012).

Os seguintes fármacos foram utilizados: o inibidor de eNOS, L-NAME (100 μ M), o inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, apocinina (30 μ M), o eliminador de ânion superóxido, tiron (1 mM), o antagonista do receptor AT1, losartan (10 μ M), o inibidor não específico de ciclooxigenase, indometacina (10 μ M), o inibidor seletivo da COX-2, NS-398 (1 μ M), o inibidor da tromboxano sintetase, furegrelato (1 mM), o antagonista do receptor de estrogênio ER α e ER β , ICI 182.780 (1 μ M), o antagonista específico de GPER, G-36 (1 μ M) e o inibidor da via de sinalização rápida PI3k/Akt, LY-294,002 (2,5 μ M) (droga diluída em 0,1% de DMSO (dimetilsulfóxido), valor que não causa efeitos vasculares de acordo com Kaneda et al. (2016)).

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da

acetilcolina 10⁻⁵ M induzir o relaxamento após a pré-contração com fenilefrina. A preparação foi lavada três vezes e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentrações-resposta à fenilefrina (10⁻¹¹ a 3x10⁻⁷ M).

Outro grupo de experimentos foi realizado com o objetivo de avaliar o relaxamento independente e dependente do endotélio através da incubação de acetilcolina. A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico ACh. Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina 10⁻⁷ M, concentração que foi capaz de induzir aproximadamente 80% da resposta máxima induzida pelo KCL (125 mM). Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10⁻¹¹ a 10⁻³ M). Já a avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para ACh, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 10⁻⁷ M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta a esse agonista em concentrações de 10⁻¹¹ a 3x10⁻⁷ M.

4.4. Detecção in situ da quantidade de ânion superóxido

A fim de avaliar a produção de O_2^{-} in situ, foi realizado um protocolo de fluorescência oxidativa utilizando dihidroetídio (DHE) como descrito anteriormente (MARQUES et al., 2015). O DHE entra livremente nas células e na presença de O_2^{-} é oxidado à brometo de etídio e é inserido no DNA. O brometo de etídio é excitado a 546 nm e emite luz a 610 nm.

Os anéis aórticos foram congelados em Tek Tissue 0.C.T. е subsequentemente cortados em secções num criostato (10 µm de espessura). As secções foram estabilizadas sob condições idênticas durante 30 min a 37 ° C em tampão Krebs-HEPES modificado (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 8,25 MgCl₂, 8,3 HEPES e glucose, pH=7,4). Um tampão contendo DHE (2 µM) foi aplicado topicamente nas secções e elas foram cobertas com lamínula por 30 min em uma câmera umidificada protegida contra luz a 37 °C. Para confirmar a produção de O2⁻ nas amostras, um mimético da enzima superóxido dismutase, tempol (10 µM), foi incubada por 1 h após a incubação com DHE. As imagens foram então obtidas por um microscópio invertido de fluorescência

(DM 2500 com uma objetiva de 40 ×, Leica DFC 310 FX), usando as mesmas configurações de imagem para todas as amostras. A densidade média de fluorescência foi calculada usando o software Image J 1.44p (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA, disponível em <u>http://imagej.nih.gov/ii</u>).

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após o período de fixação, os anéis torácicos controles e os que receberam o mercúrio foram coletados, cortados e a superfície endotelial exposta e lavada em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2). Posteriormente, foram mantidos em solução de fixação contendo cacodilato tampão (0,1 M), tetróxido de ósmio (1,0%) e ferrocianeto de potássio (1,25%) por 1 h, sendo lavados em seguida com tampão cacodilato (0,1 M) e água destilada. Os segmentos aórticos sofreram desidratação em etanol, utilizando diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) e foram processados no ponto crítico, sendo submetidos ao processo de secagem do CO₂. Após a secagem de todo o material, uma camada de ouro de 10 nm foi evaporada na superfície do tecido. Para obter as imagens do endotélio dos segmentos aórticos, usamos um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc. USA). Para cada amostra, as fotomicrografias foram tomadas aleatoriamente com ampliação de x500 e x2500.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média. "n" representa o número de animais utilizados em cada protocolo experimental. As respostas contráteis e vasodilatadoras foram expressas como a % da resposta máxima induzida por 75 mM de KCI. A análise estatística dos resultados foi realizada por ANOVA duas vias, medidas repetidas ou randomizadas, seguida pelo teste post-hoc de Fisher quando a ANOVA foi considerada significativa. Para comparar os efeitos nas respostas contráteis à fenilefrina após incubação com os fármacos, os resultados foram expressos como diferenças da área sob as curvas de concentração-resposta (dAUC) para o grupo controle e HgCl₂ usando o teste t de Student (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San

Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando p<0,05.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do mercúrio na reatividade vascular

Neste estudo, anéis aórticos obtidos do mesmo animal foram utilizados como controles ou expostos ao mercúrio. A incubação aguda de mercúrio durante 45 min aumentou a reatividade vascular à fenilefrina quando comparada aos controles (Fig. 6A). No entanto, não afetou o relaxamento induzido pela acetilcolina (Fig. 6B) e nitroprussiato de sódio (Fig. 6C).





Figura 6: Efeitos da incubação aguda com cloreto de mercúrio (HgCl2) nas curvas concentração-resposta para fenilefrina (A), acetilcolina (B) e nitroprussiato de sódio (C) em segmentos de aorta de ratas. *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

5.2 Participação do endotélio na resposta vascular

A influência do endotélio nas respostas vasculares foi avaliada através de sua retirada mecânica. A reatividade à fenilefrina após a remoção endotelial foi aumentada em ambos os grupos experimentais (Fig. 7A e B), mas esse aumento foi reduzido no grupo HgCl₂, como demonstrado pelos valores de dAUC (Fig. 7C). Esses dados estão de acordo com o aumento da reatividade vascular encontrada, sugerindo que a exposição aguda ao mercúrio causa a liberação de fatores vasoconstritores ou a redução do fator vasorelaxantes derivado do endotélio.



Figura 7: Efeito da retirada mecânica do endotélio sobre a curva concentraçãoresposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

5.3 Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico sobre a resposta vascular

A fim de avaliar se o tratamento com mercúrio alterava a modulação induzida pelo NO, os anéis aórticos foram incubados com o inibidor da sintase de NO, L-NAME (100 μM). O L-NAME aumentou a reatividade à fenilefrina em ambos os



Figura 8: Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

5.4 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta vascular

A exposição ao mercúrio aumenta a produção de radicais livres, ROS (WIGGERS et al., 2008b; LEMOS et al., 2012; GENCHI et al., 2017). A fim de determinar a fonte de produção de ROS, incubamos apocinina (30 µM), um inibidor seletivo da NADPH oxidase.

A incubação com apocinina reduziu a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em ambos os grupos (Fig. 9A e B), mas o gráfico de dAUC mostra que o efeito da apocinina foi maior no grupo que recebeu mercúrio (Fig. 9C).



Figura 9: Efeito do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (30 µM), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

Sendo o O₂⁻⁻ a principal espécie reativa de oxigênio produzida pela NADPHoxidase na presença do mercúrio, decidimos avaliar sua participação através da incubação de tiron (1 mM), um varredor de O₂⁻⁻.

Ao incubar o tiron (1 mM), a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina foi reduzida apenas no grupo exposto ao mercúrio (Fig.10A e B), sugerindo que este metal induz a produção de O_2^{-1} em ratas.



Figura 10: Efeito do tiron (1 mM), um varredor de ânion superóxido sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

Para confirmar o papel do O_2^{\cdot} , avaliamos sua liberação in situ utilizando o corante fluorescente DHE com ou sem tempol (10 µM) (Fig. 11). Uma maior liberação de O_2^{\cdot} , ocorreu no grupo de anéis aórticos incubados com mercúrio e foi inibida pelo tempol, sem qualquer efeito no grupo controle.



Figura 11: Imagens de micrografia representando a fluorescência emitida por DHE com ou sem incubação com tempol (10 μ M) em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle e HgCl2. *p<0,05 versus controle e #P <0,05 versus HgCl2. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

5.5 Participação dos receptores AT1 na resposta vascular

Com base em resultados previamente publicados pelo grupo (LEMOS et al., 2012), foi evidenciado a participação dos receptores AT1 no aumento de reatividade vascular causado pelo mercúrio.

Assim, neste protocolo investigamos a participação dos receptores AT1 na resposta contrátil à fenilefrina através da incubação do losartan (10 µM), um inibidor específico de receptores para Angiotensina II do subtipo AT1.

A incubação com losartan resultou na redução da reatividade vascular em ambos os grupos de forma equivalente (Fig 12A, B e C). Esse achado sugere que o receptor AT1 não foi afetado e manteve sua atividade após exposição ao mercúrio.



Figura 12: Efeito do losartan (10 µM), um inibidor específico de receptores para Angiotensina II do subtipo AT1 sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

5.6 Participação da ciclooxigenase e do tromboxano A2 na resposta vascular

Outro grupo de compostos envolvidos no controle da reatividade vascular são os prostanoides derivados da COX. Seu papel foi estudado pela incubação com indometacina (10µM), um inibidor não específico da ciclooxigenase.

A incubação de indometacina (10μM) resultou em redução da resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina em ambos os grupos (Fig. 13A e B), mas o gráfico de dAUC mostrou que, na presença de mercúrio a modulação através de produtos derivados da COX, possivelmente vasoconstrictores, foi maior (Fig. 13C).



Figura 13: Efeito da indometacina (10µM), um inibidor não específico da ciclooxigenase sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de

aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

Sabe-se que o HgCl₂ também pode estimular a expressão da COX-2 e subsequente produção de prostanoides e ROS (LONGO et al., 2017). Portanto, investigamos se a COX-2 estaria participando da reatividade aumentada através da incubação com NS-398 (1 µM), um inibidor específico desta isoforma da COX. A NS-398 reduziu a reatividade vascular em ambos os grupos (Fig. 14A e B), mas o dAUC (Fig. 14C) mostra que no grupo incubado com HgCl₂, a modulação da resposta à fenilefrina através de produtos derivados da COX-2 foi maior.





Figura 14: Efeito do NS-398 (1 μ M), um inibidor específico da COX-2, um inibidor não específico da ciclooxigenase sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

Para verificar se o efeito da COX-2 produzido pela exposição ao mercúrio aumentada era causado pelo TXA₂, um importante prostanoide vasoconstritor produzido pela COX-2, usamos o furegrelato (10 μ M), um inibidor da TXA₂ sintase. Houve uma redução na resposta contrátil à fenilefrina apenas no grupo HgCl₂, indicando que o TXA₂ modula a resposta à fenilefrina na presença desse metal (Fig. 15 A e B).



Figura 15. Efeito do furegrelato (10 µM), um inibidor da TXA2 sintase sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

5.7 Participação dos receptores ERα, ERβ e GPER e da via de sinalização PI3k/Akt

Sabendo que o mercúrio é um metaloestrógeno (ZHANG et al., 2008; LI et al., 2018) decidimos explorar o desempenho dos receptores ER α e ER β na exposição a esse metal pesado através do ICI 182.780 (1 µM), que nesta dose age como um antagonista desses receptores, assim como o G-36 (0,1 mM), um antagonista específico de GPER.

O ICI 182.780 reduziu a resposta contrátil à fenilefrina apenas nos anéis aórticos de ratos expostos ao HgCl₂, mostrando que esses receptores participam do aumento da reatividade vascular encontrada (Fig. 16A e B).



Figura 16: Efeito do ICI 182.780 (1 μ M), um inibidor dos receptores ER α e ER β , sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). *P<0,05 versus controle. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

Para investigar se a exposição aguda ao HgCl₂ afeta o GPER, foi utilizado o G36 (1 μ M), um antagonista específico desse receptor. No entanto, diferente do

que ocorreu com a incubação ICI 182.780 antagonizando os receptores ERα e ERβ, o G-36 reduziu a reatividade vascular em ambos os grupos de maneira semelhante (Fig. 17A, B e C). Tal achado mostrou que a vasoconstrição produzida pelo GPER permaneceu após a exposição ao mercúrio.



Figura 17: Efeito do G-36 (0,1 mM), um antagonista específico do GPER sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). *P<0,05 versus controle. Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

A via de sinalização PI3K/Akt é comumente envolvida com a ação desses receptores estrogênicos e é responsável por efeitos vasculares, como a fosforilação da eNOS e subsequente produção de NO (DE OLIVEIRA, et al., 2018). Portanto, a fim de identificar o mecanismo envolvido no aumento da reatividade vascular encontrada, sabendo que os receptores ERα e ERβ, estão com sua atividade alterada no grupo mercúrio, investigamos se esta via poderia estar alterada em nosso protocolo experimental.

A incubação com LY-294,002 (2,5 μ M), um inibidor da via de sinalização PI3k/Akt, produziu uma redução na reatividade vascular em ambos os grupos (Fig. 18A e B), mas o gráfico da dAUC mostrou que no grupo incubado com mercúrio a via de sinalização PI3k-Akt foi mais ativa (Fig. 18C). Além disso, o efeito do LY-294,002 foi menor no grupo não tratado, um resultado que corrobora o fato de que os receptores ER α e ER β não estavam desempenhando um papel importante nessa condição.

Os resultados mostram que apenas ERα e ERβ estavam operando, e diante do exposto, sugerimos que eles desencadeiam a ativação dessa importante cascata de sinalização na presença do mercúrio.





Figura 18: Efeito do LY-294,002 (2.5 µM), um inibidor da via de sinalização PI3k/Akt sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta de ratas dos grupos controle (A) e HgCl2 (B). *P<0,05 versus controle. Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

5.8 Microscopia eletrônica de varredura no endotélio (MEV)

Considerando a magnitude do dano funcional e a disfunção endotelial observada pela redução da biodisponibilidade do NO e pelo aumento do O_2^{-} , os anéis aórticos foram utilizados para avaliar se estava ocorrendo dano na arquitetura da superfície endotelial.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a superfície endotelial do grupo controle manteve a aparência escamosa normal apresentando uma camada de células endoteliais confluentes. Em contraste, o grupo incubado com mercúrio exibe uma lesão endotelial clara da camada da superfície luminal, expondo a membrana elástica interna e apresentando deterioração na arquitetura típica e arranjo celular (Fig. 19).



Figura 19: Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a superfície endotelial da aorta de ratas com aparência escamosa normal (controle). Aorta exposta ao mercúrio por 45 min apresenta superfície endotelial desnuda, apresentando deterioração da arquitetura típica e arranjo celular (HgCl₂). Célula endotelial: asteriscos; Lacunas expondo a membrana elástica interna: seta; Denudação endotelial: cruz.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Embora seja crescente o número de estudos que estudem os efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular, até então era desconhecido o efeito da exposição aguda ao mercúrio sobre esse sistema no sexo feminino, e pouco se sabia sobre os efeitos desse metal nos receptores estrogênicos. Certamente avançamos no conhecimento dos efeitos e mecanismos pelos quais o mercúrio desempenha sua toxicidade sobre a aorta de ratas.

Nossos achados mostram pela primeira vez que em fêmeas a exposição aguda ao mercúrio por 45 min aumenta a reatividade vascular e induz denudação e disfunção endotelial na aorta, provavelmente devido à redução da biodisponibilidade do NO, aumento da produção de ROS, participação da COX-2 e TXA₂, assim como participação dos receptores ERα e ERβ e ativação da via de sinalização PI3K/Akt após ação desse metal pesado.

O National Research Council of the United States of America (NRC, 2000) aponta para 2 μ g/L como a concentração média normal para indivíduos adultos com pouco ou nenhum consumo de peixe contaminado, principal fonte de exposição ao mercúrio. No entanto, a exposição aguda a este metal pesado sob baixa concentração (6 nM = 1.63 μ g/L HgCl₂), muito inferior ao encontrado em diferentes populações expostas a fontes insignificantes (5 mg/L de sangue) (BASU et al., 2018) e considerado seguro, mostrou-se prejudicial neste estudo.

O mercúrio, quando administrado de forma aguda, aumenta a reatividade vascular e causa disfunção endotelial nas artérias de condutância (WIGGERS, et al., 2008b; CUNHA et al., 2000; LEMOS et al., 2012). Essa disfunção endotelial ocorre quando há desequilíbrio entre a produção e a biodisponibilidade dos fatores vasorelaxantes e vasoconstritores produzidos pelas células endoteliais (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; VANHOUTTE, 2009; SILVA et al., 2012; GODO; SHIMOKAWA, 2017).

Entre os fatores endoteliais, o NO desempenha o papel mais importante por ser um potente vasodilatador e, embora nossos resultados indiquem uma redução na biodisponibilidade de NO induzida pelo mercúrio, o relaxamento independente e dependente do endotélio não foi alterado. Estes resultados sugerem que, sob plena estimulação por ACh, a produção de NO endotelial é adequada. No entanto, a produção basal de NO é reduzida e o mecanismo de relaxamento no músculo liso provocado pelo nitroprussiato não é afetado. Além disso, após a retirada mecânica do endotélio, ficou evidente que os mecanismos aqui investigados em relação à exposição ao mercúrio eram dependentes do endotélio.

Como a enzima óxido nítrico endotelial (eNOS) é a enzima responsável por produzir o NO nas células endoteliais (PALMER et al., 1987; MONCADA et al., 1991; FORSTERMANN; SESSA, 2012), procuramos investigar o seu papel neste protocolo experimental. O mercúrio tem ação direta no sítio catalítico dessa enzima e pode desacoplá-la (MITTAL et al., 1995) reduzindo a produção de NO (WIGGERS, et al., 2008a; WIGGERS, et al., 2008b; PEÇANHA et al., 2010). De fato, em nosso estudo, o aumento da reatividade vascular à fenilefrina no grupo mercúrio foi acompanhado por uma redução na modulação endotelial após o bloqueio da eNOS com L-NAME, sugerindo uma redução da biodisponibilidade do NO.

O endotélio vascular é extremamente sensível ao estresse oxidativo e esta é a principal de disfunção endotelial observada causa nas doenças cardiovasculares (TOUYZ, 2004; ROCHA et al., 2010; INCALZA et al., 2018). O mercúrio também contribui para aumentar o estresse oxidativo induzindo mudanças na função dos sistemas de defesa antioxidante e aumentando a produção de ROS, especialmente O₂ (HOUSTON, 2011; SAMIR, 2011; LONGO et al., 2017; LIU et al., 2019) através da estimulação da NADPH oxidase (PEÇANHA, 2010). Outro mecanismo ocorre por meio da estimulação dos receptores AT1 da angiotensina II, que desempenham um papel no desenvolvimento do estresse oxidativo na aorta (GRIENDLING et al., 1994). No entanto, nossos resultados com losartan mostraram apenas que o receptor AT1 não foi afetado mantendo sua atividade após a exposição ao mercúrio.

Como os receptores AT1 não alteram sua atividade, outro mecanismo deveria estar ativando o estresse oxidativo. A própria NADPH oxidase quando ativada por ROS pode aumentar a expressão de COX-2 (WONG et al., 2013). Nossos dados funcionais sugerem que a COX-2 foi mais participativa e provavelmente

produziu TXA2 na presença de mercúrio, fato que pode ser explicado pela capacidade do estrogênio, o principal hormônio sexual feminino, de causar efeitos deletérios à função vascular. Esses efeitos deletérios, inflamação e potencialização da atividade do TXA2 (FULTON; STALLONE, 2002) ocorrem pelo aumento da expressão e ação da COX-2 (LI; KUO; STALLONE, 2008), enzima já relacionada ao aumento da reatividade vascular na aorta de coelhos (MILLER; VANHOUTTE, 1990). Portanto, sugerimos que o aumento da atividade de COX-2 e TXA2 pode ser um efeito deletério significativo causado pela exposição ao mercúrio em ratas.

A presença de receptores estrogênicos (ERα, ERβ e GPER) no endotélio e no músculo liso dos vasos sanguíneos (KIM et al., 2014) garante que esses hormônios tenham função moduladora vascular tanto em condições fisiológicas como patológicas (GRAY et al., 2001; CHAKRABARTI et al., 2008; RAFIKOVA; SULLIVAN, 2014). Embora produzam vasodilatação em condições normais (lorga et al., 2017), estudos clínicos também propuseram que o estrogênio pode desempenhar papéis prejudiciais em doenças humanas caracterizadas por anormalidade do tônus vascular, como a doença de Raynaud (FARDOUN et al., 2016) e hipertensão essencial em gestação (FINNERTY, 1977).

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade entre as mulheres na pós-menopausa, quando os níveis de estrogênio diminuem significativamente, evidenciando o importante papel desse hormônio e de seus receptores na proteção contra essas condições (ZHANG, 2010). No entanto, quando usado como contraceptivo oral ou durante a terapia estrogênica na pós-menopausa, pode desencadear eventos cardiovasculares como acidente vascular cerebral (GILLUM et al., 2000; STIER et al., 2003) e tromboembolismo venoso (TCHAIKOVSKI; ROSING, 2010; FARRIS et al., 2017). A capacidade desses hormônios de promover a inflamação vascular (CUSHMAN, 2002; KASSI et al., 2015) sugere que o estrogênio e seus respectivos receptores também podem desencadear efeitos deletérios complexos, mas ainda pouco compreendidos, no sistema cardiovascular.

Os estrogênios podem atuar por meio de mecanismos genômicos e não genômicos. Ações genômicas ocorrem através de ERa e ERB, sendo a

primeira mais amplamente expressa do que a segunda nos tecidos (HAMILTON et al., 2017). As ações não genômicas são mediadas pelo GPER, que medeia eventos rápidos de sinalização através da membrana celular (PROSSNITZ; BARTON, 2011). Por serem amplamente expressos tanto no músculo liso quanto no endotélio, seu papel fundamental na regulação do tônus vascular (LI; KUO; STALLONE, 2008) ocorre pela ativação de enzimas antioxidantes com consequente redução do estresse oxidativo (IORGA et al., 2017), fosforilação de eNOS e aumento da produção de NO (GUO et al., 2005).

Esses receptores também respondem aos metaloestrógenos, e entre eles o mercúrio merece menção devido à sua persistência no meio ambiente (GAUDET et al., 2018) e sua capacidade de bioacumulação (RIZZETTI et al., 2013). Zhang et al. (2008), em seu estudo sobre células de câncer de mama humano, mostraram que o cloreto de mercúrio expressa efeitos semelhantes ao estrogênio ao ativar seus receptores nucleares e cascatas de sinalização (PREDIK; SARKAR., 1992; ZHANG, et al., 2008; Li et al., 2018).

Sabendo que o mercúrio pode ativar ERα e ERβ, esse aumento na reatividade vascular pode ser devido a uma possível inibição da Na⁺/K⁺-ATPase através desses receptores, bem como pela redução da biodisponibilidade de NO encontrada em nosso estudo. Estudos prévios relataram atividade e expressão reduzida de Na⁺/K⁺-ATPase por estrógenos no cérebro e no útero, e esta resposta foi mediada por receptores nucleares de estrogênio (TSAI et al., 2003; ZHENG; RAMIREZ, 1999). Sobre o NO, ele é considerado um modulador endógeno através da estimulação da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (DOS SANTOS et al., 2003). No entanto, se a biodisponibilidade do NO diminui, pode haver uma redução na atividade dessa bomba (GUPTA et al., 1994). Além disso, a Na⁺/K⁺-ATPase também é um importante local de ligação para o mercúrio já que possui cisteínas em seu domínio extracelular e pode ser inibida por este metal (ANNER; MOOSMAYER, 1992; WANG E HORISBERGER, 1996).

Além dos mecanismos propostos anteriormente, a Na⁺/K⁺-ATPase também pode ser inibida pelos produtos da COX (DOS SANTOS et al., 2003) e pela atividade aumentada de PI3K (YUDOWSKI et al., 2000). Quando a PI3K é

hiperestimulada, ela pode interagir diretamente com um sítio rico em prolina na subunidade α da Na⁺/K⁺-ATPase (YUDOWSKI et al., 2000) resultando na inibição de sua atividade (CHIBALIN et al., 1998). Isso resulta no aumento da concentração de cálcio intracelular (BLAUSTEIN, 1993) que aumenta a contração das células musculares lisas. Sabendo que o mercúrio também pode inibir esta enzima, após o bloqueio da via de sinalização PI3K/Akt, observamos um importante relaxamento no grupo incubado com HgCl₂. Este resultado sugere que esta via tinha atividade aumentada e participou diretamente do aumento da reatividade vascular. Corroborando nossos achados Chen et al. (2006) mostraram que a exposição ao mercúrio em baixas concentrações pode aumentar a fosforilação da Akt aumentando o estresse oxidativo nas células beta pancreáticas. Além disso, o estresse oxidativo também pode estimular a ativação de PI3K/Akt (ZHANG; YANG, 2013) e aumentar os níveis de ROS intracelular, amplificando o consumo de oxigênio e o metabolismo oxidativo nas mitocôndrias (KARIMIAN et al., 2018).

Outra questão a ser considerada é a associação do mercúrio com o dano ao DNA, aumentando o estresse oxidativo (CHEN, 2005; BHOWMIK; PATRA, 2015). Após danos no DNA, a via de sinalização PI3K/Akt também pode ser ativada. O mercúrio causa citotoxicidade em monocamadas de células endoteliais (PARK; PARK, 2007) e apoptose em células epiteliais brônquicas (WOLF; BAYNES, 2007). Assim, com a disfunção endotelial sugerida pelos extensos danos funcionais mostrados previamente associados às imagens de MEV, podemos sugerir que o mercúrio deteriora o endotélio. Em consequência, essa deterioração resulta em denudação, causada pela citotoxicidade das células endoteliais e possível ativação da sinalização apoptótica. Portanto, a ativação da via de sinalização PI3K/Akt pode ativar a transmissão de sinais apoptóticos, a fim de eliminar células danificadas para manter a homeostase do tecido (KARIMIAN et al., 2018).

A apoptose também é induzida pela inflamação. Sabe-se que, com o aumento da atividade da NADPH oxidase e da produção de ROS, ocorre a ativação da COX-2 (YIN et al., 2017). Somando-se isso à redução da biodisponibilidade do NO, o processo apoptótico nas células endoteliais pode ter sido induzido em nosso estudo (INCALZA et al., 2018).

Embora o efeito anti-apoptótico do estrogênio através de seus receptores nucleares já tenha sido mencionado em células endoteliais vasculares (RAZANDI et al., 2000; SELI et al., 2006), sua associação com apoptose em mielomas tem sido relatada (WANG et al., 2001), assim como em células eritróides (BLOBEL; ORKIN, 1996), células germinativas (CORREIA et al., 2015) e células musculares lisas (MORI-ABE, 2003).

Outro mecanismo proposto é que o efeito protetor anti-apoptótico promovido pela ativação de ERα e ERβ mencionados acima possa ter sido abolido pelo mercúrio após sua associação com esses receptores. Além disso, vale ressaltar que o GPER também foi associado à ativação de apoptose (DING et al., 2015; YANG et al., 2017; he et al., 2018) e permaneceu ativo na presença de mercúrio. Vale ressaltar que para confirmar nossa hipótese de possível ativação da cascata apoptótica após exposição aguda a mercúrio, outros experimentos seriam necessários.

Em resumo, este estudo sugere que o mercúrio reduz a biodisponibilidade de NO, aumenta o estresse oxidativo e a participação de COX-2 e TXA₂, bem como a atividade da via de sinalização PI3K/Akt após ativar mecanismos que estimulam a vasoconstricção via receptores estrogênicos nucleares (ERα, ERβ), além de induzir uma possível inibição da Na⁺/K⁺-ATPase. Também mostramos pela primeira vez que a exposição aguda ao mercúrio na aorta de ratas, induz denudação endotelial por citotoxicidade através de possível ativação da cascata apoptótica.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que a exposição aguda ao mercúrio causa efeitos deletérios importantes na função vascular de ratas e que há participação dos receptores de estrogênio nesses efeitos. Nossos resultados fortalecem a hipótese de que esse metal pesado deve ser considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares no sexo feminino e reforçam a necessidade de novos estudos que investiguem a fundo os mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ALEXANDRE S.C. Avaliação de área contaminada por mercúrio total em Descoberto. 2006. 63 f. Tese de doutorado- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

ANGELI J.K. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009. 113f. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

ANNER, B. M.; MOOSMAYER, M. Mercury inhibits Na-K-ATPase primarily at the cytoplasmic side. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 262, n. 5, p. 843–F848, 1992.

AZEVEDO, Fausto Antonio de. Toxicologia do mercurio. 2003. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgibin/wxislind.exe/iah/online/?lsisScript=iah/iah.xis&src =google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=27123&inde xSearch=ID>. Acesso em: 11 maio 2019.

AZEVEDO, B F et al. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

BAGENSTOSE, L M; SALGAME, P; MONESTIER, M. IL-12 down-regulates autoantibody production in mercury-induced autoimmunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 160, n. 4, p. 1612–7, 1998.

BAKIR, F et al. Methylmercury poisoning in Iraq. Science (New York, N.Y.), v. 181, n. 4096, p. 230–41,1973.

BARREGÅRD, L; SÄLLSTEN, G; JÄRVHOLM, B. Mortality and cancer incidence in chloralkali workers exposed to inorganic mercury. **British journal** of industrial medicine, v. 47, n. 2, p. 99–104, 1990.

BASSUK, SHARI S; MANSON, JOANN E. Oral contraceptives and menopausal hormone therapy: relative and attributable risks of cardiovascular disease, cancer, and other health outcomes. **Annals of Epidemiology**, v. 25, n. 3, p.

193–200, 2015.

BASU, NILADRi et al. A State-of-the-Science Review of Mercury Biomarkers in Human Populations Worldwide between 2000 and 2018. **Environmental Health Perspectives**, v. 126, n. 10, p. 106001, 2018.

BERLIN, MATHS; ZALUPS, RUDOLFS K.; FOWLER, BRUCE A. Mercury. Handbook on the Toxicology of Metals [S.I.]: Elsevier. p. 1013–1075, 2015.

BHOWMIK, NILADRI; PATRA, MANOMITA. Assessment of genotoxicity of inorganic mercury in rats in vivo using both chromosomal aberration and comet assays. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 7, p. 588–594, 2015.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca2+ stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 264, n. 6, p. C1367–C1387, 1993.

BLOBEL, G A; ORKIN, S H. Estrogen-induced apoptosis by inhibition of the erythroid transcription factor GATA-1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 4, p. 1687–1694, 1996.

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. **Human & Experimental Toxicology**, v. 11, n. 3, p. 201–210,1992.

BOFFETTA, P. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 58, n. 7, p. 461–466, 2001.

BOTELHO, T 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 & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 124, n. 2, p. 190–198, 2019.

BYRNE, C et al. Metals and Breast Cancer. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 18, n. 1, p. 63–73, 2013.

Carmignani, M et al. 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.

CHAKRABARTI, S; LEKONTSEVA, O; DAVIDGE, ST. Estrogen is a modulator of vascular inflammation. **IUBMB Life**, v. 60, n. 6, p. 376–382, 1 jun. 2008. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/iub.48. Acesso em: 9 abr. 2019.

CHAMBLISS, Ken L.; SHAUL, PHILIP W. Estrogen Modulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 665–686, 2002.

CHEN, C. Increased Oxidative DNA Damage, as Assessed by Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Concentrations, and Serum Redox Status in Persons Exposed to Mercury. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 759–767, 2005.

CHENG, D et al. Inhibition of MPO (Myeloperoxidase) Attenuates Endothelial Dysfunction in Mouse Models of Vascular Inflammation and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, p. ATVBAHA119312725, 2019.

CHIBALIN, A V et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase-mediated Endocytosis of Renal Na + ,K + -ATPase α Subunit in Response to Dopamine. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, n. 5, p. 1209–1220, 1998.

CHOE, S-Y et al. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. **Science of The Total Environment**, v. 312, n. 1–3, p. 15–21, 2003.

CLARKSON, T W. The Toxicology of Mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34, n. 4, p. 369–403, 1997.

CLARKSON, T W.; VYAS, J B.; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, n. 10, p. 757–764, 2007.

CLARKSON, T W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. suppl 1, p. 11–23, 2002.

CORREIA, S et al. Oestrogens as apoptosis regulators in mammalian testis: angels or devils? **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 17, p. e2, 2015.

COUSE, J F et al. Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER α -Knockout Mouse. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4613–4621, 1997.

CUNHA, V da et al. Effects of Mercury on the Isolated Perfused Rat Tail Vascular Bed Are Endothelium-Dependent. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 124–130, 2000.

CUSHMAN, M. Effects of hormone replacement therapy and estrogen receptor modulators on markers of inflammation and coagulation. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 1, p. F7–F10, 2002.

DE OLIVEIRA, T S et al. Activation of PI3K/Akt pathway mediated by estrogen receptors accounts for estrone-induced vascular activation of cGMP signaling. **Vascular Pharmacology**, v. 110, p. 42–48, 2018.

DEEGAN, BJ. et al. Structural and thermodynamic consequences of the replacement of zinc with environmental metals on estrogen receptor α -DNA interactions. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, n. 6, p. 1007–1017, 2011.

DESHPANDE, D et al. Nucleic Acid Delivery for Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. **Methodist DeBakey Cardiovascular Journal**, v. 12, n. 3, p. 134–140, 2016.

DING, Q. et al. GPER-independent effects of estrogen in rat aortic vascular endothelial cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 399, p. 60–68, 2015.

DOS SANTOS, L et al. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na+, K+-ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 5, p. 613–627, 2003.
DUBEY, R K et al. Estradiol Metabolites Inhibit Endothelin Synthesis by an Estrogen Receptor-Independent Mechanism. [S.I: s.n.], 2001.

EGIEBOR, E et al. The Kinetic Signature of Toxicity of Four Heavy Metals and Their Mixtures on MCF7 Breast Cancer Cell Line. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 10, p. 5209–5220, 2013.

FARDOUN, M M et al. Raynaud's Phenomenon: A Brief Review of the Underlying Mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 438, 2016.

FAROOQ, Amjad. Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 14, p. 1372–84, 2015.

FARRIS, M et al. Pharmacodynamics of combined estrogen-progestin oral contraceptives: 2. effects on hemostasis. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 10, p. 1129–1144, 2017.

FINNERTY, F A. Hypertension in Pregnancy. **Angiology**, v. 28, n. 8, p. 535–544, 1977.

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

FULTON, C T.; STALLONE, J N. Sexual dimorphism in prostanoid-potentiated vascular contraction: roles of endothelium and ovarian steroids. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 5, p. H2062–H2073, 2002.

FURIERI, L B et al. Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, n. 2, p. 193–199, 2011.

FURCHGOTT, RF; VANHOUTTE, PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J**, v. 3, p. 2007-2018, 1989.

GANTHER, H E et al. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. **Science (New York, N.Y.)**, v. 175, n. 4026, p. 1122–4, 1972.

GAUDET, H M et al. Methylmercury promotes breast cancer cell proliferation. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 579–584, 2018.

GENCHI, G et al. Mercury Exposure and Heart Diseases. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 74, 12 jan. 2017.

GIANNITSI, S et al. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation. **JRSM** Cardiovascular Disease, v. 8, p. 204800401984304, 2019.

GILLUM, L A; MAMIDIPUDI, S K; JOHNSTON, S C. Ischemic Stroke Risk With Oral Contraceptives. **JAMA**, v. 284, n. 1, p. 72, 2000.

GODO, S; SHIMOKAWA, H. Endothelial Functions. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 37, n. 9, 2017.

GOLPON, H A et al. Nitric oxide-dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. **Toxicology**, v. 192, n. 2–3, p. 179–188, 2003.

GONZALVO, M C et al. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. **Chemico-Biological Interactions**, v. 105, n. 3, p. 169–179, 1997.

GRAY, G A et al. Oestrogen and the cardiovascular system: the good, the bad and the puzzling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 3, p. 152–156, 2001.

GRIENDLING, K K et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 74, n. 6, p. 1141–1148, 1994.

GUALLAR, E et al. Mercury, Fish Oils, and the Risk of Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1747–1754, 28 nov. 2002.

GUO, X et al. Estrogen Induces Vascular Wall Dilation. Journal of Biological Chemistry, v. 280, n. 20, p. 19704–19710, 2005..

GUPTA, S. et al. Role of endothelium-derived nitric oxide in stimulation of Na(+)-K(+)-ATPase activity by endothelin in rabbit aorta. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 266, n. 2, p. H577–H582, 1994.

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

HAMILTON, K J. et al. Estrogen Hormone Biology. **Curr. Top. Dev. Biol.** [S.I.]: Academic Press, v. 125. p. 109–146, 2017.

HE, S et al. G protein- coupled estrogen receptor/miR- 148a/human leukocyte antigen- G signaling pathway mediates cell apoptosis of ovarian endometriosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 1, p. 1141–1148, 2018.

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

HOUSTON, M C. Role of Mercury Toxicity in Hypertension, Cardiovascular Disease, and Stroke. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 13, n. 8, p. 621–627. 2011.

HYBENOVA, M et al. The role of environmental factors in autoimmune thyroiditis. **Neuro endocrinology letters**, v. 31, n. 3, p. 283–9, 2010.

INCALZA, M A et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018.

IORGA, A et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in

cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology** of **Sex Differences**, v. 8, n. 1, p. 33, 2017.

JANSSON, G; HARMS-RINGDAHL, M. Stimulating Effects of Mercuric-and Silver Ions on the Superoxide Anion Production in Human Polymorphonuclear Leukocytes. **Free Radical Research Communications**, v. 18, n. 2, p. 87–98, 1993.

JOHNSON, C L. Mercury in the environment: sources, toxicities, and prevention of exposure. **Pediatric annals**, v. 33, n. 7, p. 437–42, 2004.

KAMYCHEVA, E; GOTO, T; CAMARGO, C A. Blood levels of lead and mercury and celiac disease seropositivity: the US National Health and Nutrition Examination Survey. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 9, p. 8385–8391, 2017.

KANEDA, T., SASAKI, N., URAKAWA, N., SHIMIZU, K. Endothelium Dependent and -Independent Vasodilator Effects of Dimethyl Sulfoxide in Rat Aorta. **Pharmacology,** v. 97, pag. 171–176. 2016

KARIMIAN, A et al. Crosstalk between Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway with DNA damage response and oxidative stress in cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 6, p. 10248-10272, 2018.

KASSI, E et al. Vascular Inflammation and Atherosclerosis: The Role of Estrogen Receptors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 22, p. 2651–2665, 2015.

KERN, J K et al. Evidence supporting a link between dental amalgams and chronic illness, fatigue, depression, anxiety, and suicide. **Neuro endocrinology letters**, v. 35, n. 7, p. 537–52, 2014.

KIM, K H; YOUNG, B D; BENDER, J R. Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1–2, p. 65–70, 2014.

KONUKOGLU, D; UZUN, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. Adv.

Exp. Med. Biol. [S.I: s.n.], v. 956. p. 511–540, 2016.

KULKA, M. A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 1, p. 225–232, 2016.

LEMOS, N B et al. Low Mercury Concentration Produces Vasoconstriction, Decreases Nitric Oxide Bioavailability and Increases Oxidative Stress in Rat Conductance Artery. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49005, 2012.

LI, M; KUO, L; STALLONE, J N. Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 6, p. H2444–H2455, 2008.

LI, Y et al. Zinc finger protein 32 promotes breast cancer stem cell-like properties through directly promoting GPER transcription. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 12, p. 1162, 2018.

LINDSEY, S H et al. Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 1, p. E113–E118, 2013.

LIU, W et al. Methyl-mercury induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptosis pathways activation in rat cortical neurons. **Free Radical Research**, v. 53, n. 1, p. 26–44, 2019.

LONGO, A M et al. Mercury exposure induces proinflammatory enzymes in vascular fibroblasts. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 29, n. 6, p. 231–238, 2017.

MACHADO, A C et al. Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 92–97, 2007.

MAGOS, L. Physiology and toxicology of mercury. **Metal ions in biological systems**, v. 34, p. 321–70, 1997.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609–614, 2002.

MARQUES, V B et al. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. Life Sciences, v. 143, p. 89–97, 2015.

MARTIN, M B et al. Estrogen-Like Activity of Metals in Mcf-7 Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2425–2436, 2003.

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

MASSARONI, L et al. Effects of mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 25, n. 8, p. 861–4, 1992.

MATHIESON, P W. Mercuric chloride-induced autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 13, n. 3, p. 243–7, 1992.

MATULIK, A G. et al. Bioaccumulation and biomagnification of mercury and methylmercury in four sympatric coastal sharks in a protected subtropical lagoon. **Marine Pollution Bulletin**, v. 116, n. 1–2, p. 357–364, 2017.

MATURANA, MA; IRIGOYEN, MC; SPRITZER, PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. Clinics, v. 62, p. 77-866, 2007

MILLER, V M; VANHOUTTE, P M. 17 beta-Estradiol augments endotheliumdependent contractions to arachidonic acid in rabbit aorta. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 258, n. 6, p. R1502–R1507, jun. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113777>. Acesso em: 28 abr. 2019.

MITTAL, C K.; HARRELL, W B.; MEHTA, C S. Interaction of heavy metal

toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 149–150, n. 1, p. 263–265, 1995.

MØRCH, L S. et al. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 23, p. 2228–2239, 2017.

MONCADA S; PALMER RMJ; HIGGES EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol ver, v. 43, p. 109-142, 1991.

MORI-ABE, A. Estrogen and raloxifene induce apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase cascade in synthetic vascular smooth muscle cells. **Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 3, p. 417–426, 2003.

NASCIMENTO ES; CHASIN AAM. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. Cadernos de Referência Ambiental, v. 1, p. 176, 2001.

NELSON, J F. et al. A Longitudinal Study of Estrous Cyclicity in Aging C57BL/6J Mice: I. Cycle Frequency, Length and Vaginal Cytology1. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 2, p. 327–339, 1982.

NICKENIG, G et al. Estrogen Modulates AT 1 Receptor Gene Expression In Vitro and In Vivo. **Circulation**, v. 97, n. 22, p. 2197–2201, 1998.

NOVELLA, S et al. Estradiol, acting through estrogen receptor alpha, restores dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and nitric oxide production in oxLDL-treated human arterial endothelial cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 365, n. 1, p. 11–16, 2013.

NRC. **Toxicological Effects of Methylmercury**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2000.

OLIVEIRA, E M; VASSALLO, D V. Effects of mercury on the contractility of isolated rat cardiac muscle. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 25, n. 10, p. 1037–40, 1992.

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

PARK, E-J; PARK, K. Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 5, p. 789–794, 2007.

PATRICK, L. Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, v. 7, n. 6, p. 456–71, 2002.

PECANHA, F M et al. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society, v. 61, n. 1, p. 29–36, 2010.

PÉREZ-CREMADES, D et al. miRNA as a New Regulatory Mechanism of Estrogen Vascular Action. International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 2, p. 473, 2018.

PREDKI, P F; SARKAR, B. Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 9, p. 5842–6, 1992.

PROSSNITZ, E R; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 715–726, 2011.

RAFIKOVA, O; SULLIVAN, J C. Estrogen. Hypertension, v. 63, n. 3, p. 449–450, mar. 2014.

RAYMOND, L J; RALSTON, N V C. Reviews of specific issues relevant to child development SMDJ Seychelles Medical and Mercury: selenium interactions and health implications. **Dental Journal, Special Issue**. v. 7, n. 1, 2004.

RAZANDI, M; PEDRAM, A; LEVIN, E R. Estrogen Signals to the Preservation of Endothelial Cell Form and Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38540–38546, 2000.

REVANKAR, C M. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1625–1630, 2005.

RIZZETTI, D A et al. Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low Concentrations of Mercury. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55806, 2013.

ROCHA, M et al. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Disease: Mitochondria-Targeted Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 32, p. 3827–3841, 2010..

ROWENS, B et al. Respiratory Failure and Death Following Acute Inhalation of Mercury Vapor. **Chest**, v. 99, n. 1, p. 185–190, 1991.

RUNGBY, Jorgen; ERNST, Erik. Experimentally Induced Lipid Peroxidation after Exposure to Chromium, Mercury or Silver: Interactions with Carbon Tetrachloride. **Pharmacology & Toxicology**, v. 70, n. 3, p. 205–207, 1992.

SALONEN, J T et al. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested casecontrol study Commentary: Causality---the Achilles' heel of observational studies Commentary: How high density lipoprotein pr. **BMJ**, v. 319, n. 7208, p. 487–489, 1999.

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

SAMAVAT, Hamed; KURZER, Mindy S. Estrogen metabolism and breast cancer. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 231–243, 28 jan. 2015. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784887>. Acesso em: 7 abr. 2019.

SAMIR A. Impact of occupational exposure to elemental mercury on some

antioxidative enzymes among dental staff. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n. 9, p. 779–786, 2011.

SAMPSON, J N. et al. Association of Estrogen Metabolism with Breast Cancer Risk in Different Cohorts of Postmenopausal Women. **Cancer Research**, v. 77, n. 4, p. 918–925, 2017.

SANDOO, A et al. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, n. 1, p. 302–312, 2010.

SAPIN, C; DRUET, E; DRUET, P. Induction of anti-glomerular basement membrane antibodies in the Brown-Norway rat by mercuric chloride. **Clinical and experimental immunology**, v. 28, n. 1, p. 173–9, 1977.

SASSARINI, J.; LUMSDEN, M. A. Oestrogen replacement in postmenopausal women. **Age and Ageing**, v. 44, n. 4, p. 551–558, 2015.

SELI, E et al. Estradiol Increases Apoptosis in Human Coronary Artery Endothelial Cells by Up-Regulating Fas and Fas Ligand Expression. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 12, p. 4995–5001, 2006.

SHENKER, B J.; GUO, T L.; SHAPIRO, I M. Low-Level Methylmercury Exposure Causes Human T-Cells to Undergo Apoptosis: Evidence of Mitochondrial Dysfunction. **Environmental Research**, v. 77, n. 2, p. 149–159, 1998.

SHI, Y; VANHOUTTE, P M. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 9, n. 5, p. 434–449, 2017.

SILVA, B R; PERNOMIAN, L; BENDHACK, L M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 441, 2012.

SIMMONS-WILLIS, T A. et al. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury–I-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. **Biochemical Journal**,

v. 367, n. 1, p. 239–246, 2002.

SINGLETON, D W. Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, n. 6, p. 1010, 2003. D

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The Control of Progesterone Secretion During the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Rescue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy 1 2. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, p. 219– 226, 1975.

SOBRINO, A et al. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 4, p. 237–246, abr. 2010.

SOBRINO, A et al. Mas receptor is involved in the estrogen-receptor induced nitric oxide-dependent vasorelaxation. **Biochemical Pharmacology**, v. 129, p. 67–72, 2017.

SØRENSEN, N et al. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 10, n. 4, p. 370–5, jul. 1999.

SPORNITZ, U.M.; SOCIN, C.D.; DRAVID, A.A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **The Anatomical Record**, v. 254, n. 1, p. 116–126, 1 jan. 1999.

STACCHIOTTI, A et al. Dose-dependent mercuric chloride tubular injury in rat kidney. **Ultrastructural pathology**, v. 27, n. 4, p. 253–9, 2003.

STEJSKAL, V. Allergy and Autoimmunity Caused by Metals: A Unifying Concept. **Vaccines Autoimmun.** Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, p. 57–64, 2015.

STERZL, I et al. Mercury and nickel allergy: risk factors in fatigue and autoimmunity. **Neuro endocrinology letters**, v. 20, n. 3–4, p. 221–228, 1999.

STIER, C T et al. Estrogen promotes microvascular pathology in female strokeprone spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 1, p. E232–E239, 2003.

SWAIN, E B. et al. Socioeconomic Consequences of Mercury Use and Pollution. https://doi.org/10.1579/0044-7447(2007)36[45:SCOMUA]2.0.CO;2, v. 36, n. 1, p. 45–61, 2007.

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.

TAUEG, C. et al. Acute and Chronic Poisoning from Residential Exposures to Elemental Mercury - Michigan, 1989–1990. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, v. 30, n. 1, p. 63–67, 25 jan. 1992. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15563659208994446>. Acesso em: 11 maio 2019.

TCHAIKOVSKI, S N; ROSING, Jan. Mechanisms of Estrogen-Induced Venous Thromboembolism. **Thrombosis Research**, v. 126, n. 1, p. 5–11, 2010.

TOUYZ, R M. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension. **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 248–252, 2004..

TSAI, M L et al. The differential effects of tamoxifen and ICI 182,780 on the reduction of Na+/K+ ATPase activity and spontaneous oscillations by 17betaestradiol. **The Chinese journal of physiology**, v. 46, n. 2, p. 55–62, 2003.

TSUBAKI, T K I. Minamata Disease. Methylmercury Poisoning in Minamata and Niigata, Japan. **The Quarterly Review of Biology**, v. 53, n. 3, p. 353–354, 1978.

VANHOUTTE, PM. Endothelial Dysfunction. The first step toward coronary arteriosclerosis. **Circ J**, v. 73, p. 595-601, 2009.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.

VASSALLO, D.V. et al. Effects of Mercury on the Isolated Heart Muscle Are Prevented by DTT and Cysteine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 156, n. 2, p. 113–118, 1999.

VIRTANEN, J K. et al. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 75–85, 2007.

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

WANG, L H et al. Activation of Estrogen Receptor Blocks Interleukin-6-inducible Cell Growth of Human Multiple Myeloma Involving Molecular Cross-talk between Estrogen Receptor and STAT3 Mediated by Co-regulator PIAS3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 31839–31844, 2001.

WANG, X; HORISBERGER, J D. Mercury binding site on Na+/K(+)-ATPase: a cysteine in the first transmembrane segment. **Molecular pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 687–91, 1996.

WATSON, C S et al. Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. **Steroids**, v. 72, n. 2, p. 124–134, 2007.

WEINSBERG, F; BICKMEYER, U; WIEGAND, H. Effects of inorganic mercury (Hg2+) on calcium channel currents and catecholamine release from bovine chromaffin cells. **Archives of Toxicology**, v. 69, n. 3, p. 191–196, 1995.

WIGGERS, G. A. et al. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 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. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 3, p. H1033–H1043, 2008b.

WIGGERS, G A et al. Cerebrovascular endothelial dysfunction induced by

mercury exposure at low concentrations. **NeuroToxicology**, v. 53, p. 282–289, 2016.

WOLF, M B.; BAYNES, J W. Cadmium and mercury cause an oxidative stressinduced endothelial dysfunction. **BioMetals**, v. 20, n. 1, p. 73–81, 2007.

WONG, W T; TIAN, X Y; HUANG, Y. Endothelial Dysfunction in Diabetes and Hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 204–214, 2013.

WOODWARD, M. Cardiovascular Disease and the Female Disadvantage. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 16, n. 7, p. 1165, 2019.

YANG, D-L et al. Role of GPR30 in estrogen-induced prostate epithelial apoptosis and benign prostatic hyperplasia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 487, n. 3, p. 517–524, 2017..

YIN, J et al. COX-2 mediates PM2.5-induced apoptosis and inflammation in vascular endothelial cells. **American journal of translational research**, v. 9, n. 9, p. 3967–3976, 2017.

YUDOWSKI, G A et al. Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na+,K+-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking. **Proceedings** of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 12, p. 6556–6561, 2000.

ZALUPS, R K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 1, p. 113–43, 2000.

ZALUPS, R K; LASH, L H. Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 42, n. 1, p. 1–44, 1994.

ZAVARIZ, C; GLINA, DMR. Avaliação clínico-neuro-psicológica de trabalhadores expostos a mercúrio metálico em indústria de lâmpadas elétricas. Revista de saúde pública, v. 26, p. 356-365, 1992

ZEITZ, P; ORR, M F; KAYE, W E. Public health consequences of mercury spills: Hazardous Substances Emergency Events Surveillance system, 1993-1998. Environmental Health Perspectives, v. 110, n. 2, p. 129–132, 2002.

ZHANG; YANG. Activation of the PI3K/Akt pathway by oxidative stress mediates high glucose-induced increase of adipogenic differentiation in primary rat osteoblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 11, p. 2595–2602, 2013.

ZHANG, X et al. Experimental study on the estrogen-like effect of mercuric chloride. **BioMetals**, v. 21, n. 2, p. 143–150, 2008.

ZHANG, Y. Cardiovascular diseases in American women. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 6, p. 386–393, 2010.

ZHENG, J; RAMIREZ, V D. Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F0F1-ATPase activity by estrogens: comparison with Na+, K+-ATPase of porcine cortex. **European Journal of Pharmacology**, v. 368, n. 1, p. 95–102, 1999.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da Exposição aguda ao Hgcl2 sobre a reatividade vascular em aorta de rata ", Protocolo nº.11/2018, sob a responsabilidade de Dalton Valentim Vassallo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), aprovado "Ad Referendum" e pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 03-08-2018.

Vigência do Projeto	Início: Julho/2018 Término:Fevereiro/2019
Espécie/Linhagem	Rattus novergicus albinus(Linhagem:Ratos Wistar)
Nº de Animais	Experimento Piloto:0 Protocolo Experimental:40 Total:40 animais
Peso/Idade	Peso:250-300 g Idade: 4 meses
Sexo	Fêmea
Origem	Mamíferos
	VIII (1. (EC), 02 de consta de 2010

Presidente do mité de Ética no Uso de Animais CEV//UFES Vitória (ES), 03 de agosto de 2018.