

**EFEITOS CRÔNICOS DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A PRESSÃO  
ARTERIAL E A REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA DE RATAS**

**INGRIDY REINHOLZ GRAFITES SCHEREIDER**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**VITÓRIA, ABRIL DE 2020**

**EFEITOS CRÔNICOS DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A PRESSÃO  
ARTERIAL E A REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA DE RATAS**

**Ingridy Reinholz Grafites Schereider**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas. Aprovado em \_\_\_ / \_\_\_ / 2020 por:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maylla Ronacher Simões – Orientadora, PPGCF-UFES

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Simão Padilha

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bruna Fernandes Azevedo

---

Coordenadora do PPGCF: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvêa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO**

Vitória, 2020

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

---

S326e Schreider, Ingridy Reinholz Grafites, 1996-  
Efeitos crônicos do cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de aorta de ratas / Ingridy Reinholz Grafites Schreider. - 2020.  
82 f. : il.

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

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

CDU: 612

---

*“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso,  
mas o que ele se torna com isso” John Ruskin*

## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado é fruto não apenas de um esforço pessoal, mas também do apoio de diversas pessoas ao meu redor. Por este motivo deixo aqui os meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus por me permitir estar neste lugar e por sempre segurar minha mão e me indicar o caminho certo. Obrigada por mais essa conquista!

Aos meus pais, **Zaqueu** e **Evanira**, por serem os meus maiores apoiadores desde o dia que decidi sair de casa e estudar em outra cidade. Por me incentivarem a estudar tudo o que eles não puderam e por sempre serem o porto seguro para onde retorno quando necessito de ajuda. Obrigada por tudo, vocês são o maior exemplo de vida para mim e é a vocês que dedico este trabalho, ele só foi possível graças a vocês!

À minha avó **Alaide**, por seus ensinamentos sempre tão sábios e por suas orações em meu nome. Este trabalho é um presente para toda a nossa família.

Ao meu namorado **Pedro**, que esteve todos os dias desta jornada ao meu lado, escutando minhas reclamações e me mostrando que tudo ia ficar bem. Por suportar todas as crises de ansiedade e mesmo assim continuar me apoiando e me mostrando que a vida é mais do que apenas trabalho e as vezes precisamos respirar. Você faz com que os momentos difíceis sejam mais leves de suportar. Te amo.

Dedico também a minha Orientadora e minha segunda mãe/irmã (porque ela não tem idade para isso rs) **Maylla**. Que pessoa maravilhosa eu tive o prazer de conhecer! Ela que me acolheu desde o início da iniciação científica, me apoiando, ensinando e repassando todo seu conhecimento na área com maestria. Obrigada por me acolher na IC e no mestrado e acreditar que eu era capaz mesmo quando eu mesma achava que não. Sem você e seus prazos impossíveis de cumprir (mas que no final eram possíveis), este trabalho e eu não seríamos o que somos hoje.

Ao Profº **Dalton** – Chefito, pessoa de uma inteligência inigualável que a todo momento está disponível para ajudar. Pessoa que eu recorria quando não conseguia pensar em

mais nada e ele com sua calma e um bom café conseguia explicar tudo. Obrigada por toda a ajuda e risadas durante esses anos, esse trabalho também é fruto seu.

Aos meus colegas do **LEMC**, lugar onde eu aprendi o que era pesquisa e que me acolheu desde a IC. A todos vocês eu dedico este trabalho, pois, com certeza cada um teve uma participação especial no meu conhecimento adquirido até hoje: Anna Karolina, Bárbara, Camila, Fillipe, Grazi, Gustavo, Larissa, Marito, Michelle, Paloma, Rosi, Sabrina, Tati, Thiago Lopes, Tiago Oliveira, Vilmar, Vinicius.

Um agradecimento especial a **Rakel**, por ser uma amiga/irmã. Por todos os momentos no laboratório, fazendo aorta e passando frio no LHMI e em casa comendo muito e dando risadas. Como é bom poder dividir esse caminho com você, Obrigada!

À todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por toda a ajuda.

As ratinhas, porque sem elas este trabalho não seria possível.

À CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO .....	20
1.2 EFEITOS DO MERCÚRIO NO ORGANISMO .....	22
1.3 EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	23
1.4 ENDOTÉLIO VASCULAR.....	23
1.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	24
1.6 PROSTANÓIDES DERIVADOS DA CICLOOXIGENASE.....	25
1.7 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA .....	25
1.8 ESTROGÊNIO E SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	26
1.9 JUSTIFICATIVA.....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	32
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	32
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	32
<b>3.3.1 Medida de pressão arterial</b> .....	32
<b>3.3.2 Avaliação dos parâmetros ponderais</b> .....	33
<b>3.3.3 Determinação da fase do Ciclo Estral</b> .....	33
<b>3.3.4 Dosagem de estrogênio</b> .....	34
<b>3.3.5 Avaliação da reatividade vascular em aorta</b> .....	35
<b>3.3.6 Quantificação “<i>in situ</i>” de óxido nítrico</b> .....	37
<b>3.3.7 Quantificação de ânion superóxido “<i>in situ</i>”</b> .....	38
<b>3.3.8 Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	38
<b>3.3.9 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting</b> .....	39

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1 PARÂMETROS PONDERAIS .....	42
4.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	42
4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA .....	43
4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA VASODILADORA DEPENDENTE (ACh) E INDEPENDENTE (NPS) DO ENDOTÉLIO NA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO .....	44
4.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A MODULAÇÃO DO ENDOTÉLIO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	45
4.6 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	46
4.7 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	49
4.8 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE OS PROSTANÓIDES DERIVADOS DA VIA DA CICLOOXIGENASE NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	52
4.9 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	55
4.10 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE OS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	56
4.11 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE OS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO NA RESPOSTA VASODILADORA AO G-1 .....	58

4.12 ANÁLISE DA ARQUITETURA ENDOTELIAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	59
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura I.** Em A ilustração da via de sinalização estrogênica genômica na regulação da sinalização de óxido nítrico (NO). O estrogênio se liga ao ER, resultando em dimerização e ativação da transcrição de genes e expressão da óxido nítrico sintase (NOS) levando a produção de NO. Em B ilustração de como essa sinalização pode ser alterada com o envelhecimento e a doença onde na ausência de tetrahydrobiopterina (BH4), um cofator para NOS, agora gera EROs em vez de NO (Murphy, 2011) ..... 27

**Figura II.** Fotografias de esfregaço vaginal de ratas, demonstrando as fases do ciclo estral. Proestro - predomínio de células epiteliais nucleadas (A); Estro - predomínio de células cornificadas (B); Metaestro - leucócitos com presença de células cornificadas e epiteliais (C); Diestro - predomínio de leucócitos (D). As imagens foram coletadas no microscópio BEL SOLARIS-T com objetiva de 40x e câmera EUREKAM 5.0. Fonte: Própria ..... 33

**Figura III:** Aorta torácica em uma placa de Petri imersa em solução de Krebs após retirada dos tecidos, sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm (Angeli, 2009) ..... 34

**Figura IV.** Registro representando experimentos de reatividade vascular em aorta. A: Cloreto de potássio (75mM); B: Teste de integridade do endotélio; C: Curvas contração-resposta à fenilefrina; D: Curvas de relaxamento à ACh, NPS ou G-1. (Modificado de Peçanha, 2009) ..... 36

**Figura 1.** Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) obtidos através de pletismografia de cauda em ratas do grupo Controle e Mercúrio durante quatro semanas de exposição. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA (duas vias)  $P > 0,05$  ..... 42

**Figura 2.** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas dos grupos Controle e Mercúrio. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão

expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni  $*P<0,05$  vs Ct ..... 43

**Figura 3:** Resposta dilatadora induzida pela ACh (A) e pelo NPS (B) em segmentos de aorta de ratas dos grupos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração à Phe. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias)  $P>0,05$  ..... 43

**Figura 4.** Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas Controle (A) e Mercúrio (B). Em C diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC), para comparação entre os grupos. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni  $*P<0,05$  vs Ct E<sup>+</sup>/Hg E<sup>+</sup>. Teste-*t* não pareado foi usado na dAAC  $*P<0,05$  vs Ct ..... 44

**Figura 5.** Efeito do inibidor da sintase de óxido nítrico L-NAME (100 $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Em C a diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC), para comparação entre os grupos. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni  $*P<0,05$  vs Ct/Hg Teste-*t* não pareado foi usado na dAAC  $*P<0,05$  vs Ct ..... 45

**Figura 6.** Detecção “*in situ*” de NO em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência representando secções transversais de aorta torácica na presença da sonda fluorescente DAF-2 de animais do grupo Controle e Mercúrio. A especificidade do método foi avaliada pela incubação das aortas com o L-NAME (100 $\mu$ M). Gráfico de barras demonstrando a análise semi-quantitativa. Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM da densidade de fluorescência. O número de animais está indicado entre

parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \**P*<0,05 vs Ct ..... 46

**Figura 7.** Análise densitométrica do Western Blotting para expressão das proteínas eNOS (A) e peNOS (B) e da razão eNOS/pENOS (C) em aorta de ratas dos grupos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Blots representativos também são mostrados. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \**P*<0,05 vs Ct ..... 47

**Figura 8.** Efeito do mimético da superóxido dismutase, Tempol (10µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \**P*<0,05 vs Hg ..... 48

**Figura 9.** Análise densitométrica do Western Blotting para expressão das proteínas SOD-Cu/Zn (A) e SOD-Mn (B) em aorta de ratas dos grupos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Blots representativos também são mostrados. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \**P*<0,05 vs Ct ..... 48

**Figura 10:** Efeito do inibidor da NADPH oxidase, Apocinina (30µM) e do “varredor” enzimático de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Catalase (1000U/mL) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) *P*>0,05 ..... 49

**Figura 11:** Efeito da tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (1mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados

está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \* $P < 0,05$  vs Hg ..... 50

**Figura 12.** Detecção “*in situ*” da produção de ânion superóxido em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência representando secções transversais de aorta torácica na presença de DHE de animais do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). A especificidade do método foi avaliada pela incubação das aortas com o Tiron (1mM). Gráfico de barras demonstrando a análise semi-quantitativa. Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM da densidade de fluorescência. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct e # $P < 0,05$  vs Hg ..... 51

**Figura 13.** Efeito do inibidor seletivo da COX-2, NS398 (1mM) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta torácica do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \* $P < 0,05$  vs Hg. Em C análise densitométrica do Western Blotting para expressão da proteína COX-2 em aorta de ratas dos grupos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Blots representativos também são mostrados. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct ..... 52

**Figura 14.** Efeito do SC-19220 (10 $\mu$ M) (A e B), SQ 29,548 (1 $\mu$ M) (C e D) e CAY10441 (100nM) (E e F) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas Controle e Mercúrio. Resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \* $P < 0,05$  vs Ct/Hg ..... 53

**Figura 15.** Efeito do antagonista de receptor AT<sub>1</sub> - Losartan (10mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado

entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni  $*P < 0,05$  vs Hg ..... 54

**Figura 16.** Efeito do antagonista do receptor ER $\alpha$  e ER $\beta$  de estrogênio ICI 182,780 - 1 $\mu$ M (A e B) e antagonista do receptor GPER, G-36 - 1 $\mu$ M (C e D) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias)  $P > 0,05$  ..... 55

**Figura 17:** Efeito do agonista do receptor GPER, G-1 (10 $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias)  $P > 0,05$  ..... 56

**Figura 18:** Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER, G-1 (1nM – 10 $\mu$ M) em aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias)  $P > 0,05$  ..... 57

**Figura 19:** Microscopia eletrônica de varredura mostrando fotomicrografia representativa da estrutura endotelial de aorta de ratas Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Barra de escala 50 $\mu$ m e 10 $\mu$ m (ampliação de x300 e x1000). Asterisco: superfície endotelial; seta branca: célula endotelial ..... 58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

Acetilcolina (ACh)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

Ciclooxigenase (COX)

Ciclooxigenase-1 (COX-1)

Ciclooxigenase-2 (COX-2)

Cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ )

Cloreto de potássio (KCl)

Diaminofluoresceína (DAF-2)

Diferença da área abaixo da curva (dAAC)

Dihidroetídio (DHE)

Doenças Cardiovasculares (DCV's)

Endotélio íntegro ( $E^+$ )

Endotélio removido mecanicamente ( $E^-$ )

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Estradiol ( $E_2$ )

Fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF)

Fenilefrina (Phe)

Graus célsius ( $^{\circ}C$ )

Grupo Controle (Ct)

Grupo Mercúrio (Hg)

Hiperpolarização derivada do endotélio (HDE)

Intramuscular (i.m)

Íon mercúrico ( $\text{Hg}_2^+$ )

Mercúrio Elementar ( $\text{Hg}^0$ )

Micrograma ( $\mu\text{g}$ )

Microlitro ( $\mu\text{L}$ )

Milimolar (mM)

Molar (M)

Músculo liso vascular (MLV)

Nanomolar (nM)

NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Nitroprussiato de sódio (NPS)

Óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico sintase (NOS)

Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Pressão arterial sistólica (PAS)

Prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ )

Prostaglandina E2 ( $\text{PGE}_2$ )

Radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ )

Receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER)

Receptor de estrogênio beta ( $\text{ER}\beta$ )

Receptor de estrogênio alfa ( $\text{ER}\alpha$ )

Receptor de Prostaciclina (IP)

Receptor de Prostaglandina E2 (EP1)

Receptor de tromboxano A2 (TP)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Sulfeto de Mercurio (HgS)

Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1)

Superóxido dismutase mitocondrial (Mn SOD; SOD2)

Tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>)

Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)

## RESUMO

A exposição a metais tóxicos, como mercúrio, demonstrou estar associada a algumas doenças crônicas do sistema cardiovascular, aumentando significativamente o risco à saúde. No entanto, os efeitos da exposição aos metais em fêmeas são pouco investigados. No presente estudo, objetivamos avaliar se a exposição crônica ao mercúrio altera a pressão arterial e a função vascular da aorta torácica de ratas Wistar. Para isso, ratas com dez semanas de idade foram divididas em dois grupos: grupo Controle (veículo, i.m.) e grupo Mercúrio (1ª dose de 4,6g/kg e doses diárias subsequentes de 0,07g/kg, i.m.), visando obter uma concentração plasmática final de aproximadamente 29nM. Os resultados mostraram que o tratamento com mercúrio não modificou a pressão arterial sistólica (PAS), mas induziu um aumento na reatividade vascular da aorta do grupo Mercúrio. Esse aumento ocorre devido a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico associada ao aumento das espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, através do desacoplamento da eNOS. Além disso, foi observada uma maior participação da via da ciclooxigenase-2 pelo desequilíbrio dos prostanóides, tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e prostaciclina 2 (PGI<sub>2</sub>). No entanto, a via do estrogênio não foi alterada na exposição ao mercúrio. Juntos, esses resultados demonstram que a exposição crônica ao mercúrio induz disfunção endotelial e consequente aumento da reatividade vascular aórtica, indicando um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e ajudando a esclarecer os mecanismos pelos quais esse metal atua no sistema vascular de ratas.

**Palavras-chave:** cloreto de mercúrio; reatividade vascular; aorta; ratas; disfunção endotelial; eNOS desacoplada.

## ABSTRACT

The exposure to toxic metal, such as mercury has been shown to be positively associate with some chronic diseases of the cardiovascular system leading to a significant health risk. However, the effects of metals in female rats is poorly investigate. In the present study, we aimed to evaluate whether chronic mercury exposure alters the blood pressure and the vascular function of thoracic aorta of Wistar female rats. For this, ten-week-old female Wistar were divided into two groups: Control group (vehicle, i.m.) and the Mercury group (1st dose of 4.6g/kg, subsequent doses of 0.07g/kg, i.m.). The results showed that mercury treatment did not modified systolic blood pressure (SBP), but there was an increase in aorta vascular reactivity from Mercury group. This increase is due to the reduction in nitric oxide bioavailability associated with the increase in reactive oxygen species, such as superoxide anion, through uncoupling eNOS. Furthermore, a higher participation of cyclooxygenase-2 pathway through imbalance of the prostanoids, thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) and prostacyclin 2 (PGI<sub>2</sub>) was observed, but any alteration of the estrogen receptors in the vascular reactivity in mercury exposure. Together, these results demonstrate that chronic exposure to mercury induces endothelial dysfunction and consequently increases aortic vascular reactivity, indicating a risk factor for the development of cardiovascular diseases and helping to clarify the mechanisms by which this metal acts in the vascular system of female rats.

**Keywords:** mercury chloride; vascular reactivity; aorta; female rats; endothelial dysfunction; eNOS uncoupling.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO

De acordo com a Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, 2019) o mercúrio ocupa o terceiro lugar na lista de prioridade de substâncias que representam ameaça potencial à saúde humana, atrás apenas do arsênico e do chumbo (primeiro e segundo lugar respectivamente), devido sua alta toxicidade e capacidade de biomagnificar e acumular na cadeia alimentar (OMANWAR, 2015).

O mercúrio, nome derivado do latim *hydrargyrum* (Hg) que significa prata líquida, é um produto químico de grande preocupação para a saúde pública por ocorrer naturalmente nos ecossistemas, criando fontes de exposição em todo o mundo (UNEP, 2018), através da desgaseificação da crosta terrestre, erupções vulcânicas e erosão do solo (BHAN & SARKAR, 2005). Todavia, sua principal fonte de contaminação ocorre por meio de atividades humanas (WHO, 2017), através do despejo de resíduos ricos em uma variedade de metais pesados, entre eles o mercúrio, especialmente na mineração, incineração de lixo industrial, usinas de queima do carvão e fertilização dos solos (BHAN & SARKAR, 2005). Estima-se que cerca de 3 mil toneladas de mercúrio são liberadas por ano na atmosfera devido a atividade humana (LINDBERG, et al., 1987; PACYNA, 1987). Esse mercúrio presente no ar, no solo e nas águas afeta a qualidade do solo, o crescimento das plantas, contamina o ambiente aquático e conseqüentemente os organismos vivos da cadeia alimentar, chegando até o ser humano (REEDER, 2006; DASH e DAS, 2012).

Este metal pode ser encontrado na natureza em três estados diferentes, sendo eles: mercúrio metálico, mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico (LI, et al., 2016). Cada forma possui um perfil toxicológico e destino metabólico distinto. O mercúrio metálico ou elementar ( $Hg^0$ ) é muito conhecido por sua estabilidade na forma líquida em temperatura ambiente, entretanto, apresenta grande capacidade de volatilizar para um gás inodoro e incolor que apresenta alta toxicidade. Essa forma do metal foi muito utilizada em várias aplicações comerciais como esfigmomanômetros, termostatos, termômetros e amálgamas dentárias de prata contendo 50% combinado com outros metais como cobre e prata (CLARKSON et al., 2003), e estes representam grande

problema de saúde ocupacional devido a formação do vapor de mercúrio que é facilmente absorvido pela circulação pulmonar (IBRAHIM et al., 2006).

A forma inorgânica se origina quando o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) se combina a outros elementos químicos como cloro, enxofre e oxigênio, sendo os mais comuns o sulfeto de mercúrio ( $\text{HgS}$ ) utilizado como pigmento de tintas e o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), importante por sua hidrossolubilidade (MICARONI et al., 2000) e utilizado como ingrediente de antissépticos, conservantes, inseticidas e em operações metalúrgicas e fotográficas (GOLDBERG, 1996; CARPI E LINDBERG, 1997). Essa forma do metal é mais facilmente absorvida via gastrointestinal, sendo severamente corrosiva para a mucosa, podendo também ser absorvido via subcutânea e respiratória (IBRAHIM et al., 2006).

Quando o mercúrio se liga covalentemente a uma molécula de carbono, surge a forma orgânica sendo o metilmercúrio -  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  e o etilmercúrio -  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$  os mais comuns (MICARONI et al., 2000, HOUSTON, 2007). Entre os seres humanos, a principal fonte de exposição ao mercúrio orgânico acontece através do consumo de peixes contaminados (IBRAHIM et al., 2006), porém, também está presente na composição de pesticidas (WHO, 1990) e como conservantes de vacinas que possuem múltiplas doses na forma de timerosal (CLARKSON et al., 2003, da CUNHA et al., 2020).

Durante anos, o mercúrio foi muito utilizado pela medicina na constituição de diversos compostos como diuréticos, fungicidas, pomadas para dermatites ou como ingrediente de antissépticos (CLARKSON et al., 1972; OMS, 2004). Entretanto, a percepção dos efeitos tóxicos causados a saúde pela exposição ao mercúrio só teve início entre as décadas de 1950 e 1960 com a ocorrência do desastre em Minamata no Japão, onde estima-se que cerca de 150 toneladas de metilmercúrio tenham sido despejados na baía, ocasionando a contaminação da população que tinha como sua principal fonte de alimentação peixes contaminados (KURLAND et al., 1960). No total, o incidente causou o que hoje é conhecido como “Doença de Minamata” levando lesões características em todo o sistema nervoso em mais de 3 mil pessoas e 900 pessoas foram a óbito (ASANO et al., 2000). Onze anos depois, no Iraque em 1971 a população foi intoxicada quando grãos de trigo foram tratados com fungicidas organomercuriais, contendo mercúrio orgânico, levando mais de 500 pessoas a óbito por terem consumido pão produzido com trigo contaminado (BAKIR et al., 1973; TAKEUCHI et al., 1996; CLARKSON et al., 1993).

Recentemente no Brasil o rompimento das barragens de rejeitos de minério localizadas no município de Mariana, MG (2015) e no município de Brumadinho, MG (2019), liberaram cerca de 50 milhões de metros cúbicos de lama de rejeitos da mineração de ferro no meio ambiente contendo altos níveis de metais pesados como o mercúrio, afetando a biodiversidade local em mais de 600 km de extensão (BENZECRY 2018; de OLIVEIRA et al., 2019). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) regulamenta os valores de referência para concentrações de elementos químicos em corpos de água doce (rios e lagos) e o valor de referência para a concentração de mercúrio na água potável é de  $0,2\mu\text{g L}^{-1}$ . Ao analisar as águas dos rios contaminados pelo rompimento da barragem de rejeitos a concentração de mercúrio encontrada foi de  $0,45\mu\text{g L}^{-1}$ , acima dos valores máximos permitidos (MAIA, 2019).

## 1.2 EFEITOS DO MERCÚRIO NO ORGANISMO

Todas as formas de mercúrio são tóxicas, entretanto, seu efeito depende da dose, da forma físico-química, do tempo e da via de exposição ao metal (CLARKSON e MAGOS, 2006). Por um longo tempo o mercúrio foi conhecido principalmente por afetar o sistema nervoso central, levando a doenças degenerativas, como Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (MUTTER et al., 2004; RIVERA-MANCIA et al., 2010). No entanto, o mercúrio também exerce efeitos tóxicos sobre os sistemas cardiovascular, renal, imunológico, respiratório, hepático e reprodutor (SHENKER et al 1998; DAVIS et al., 2001; PACHECO-FERREIRA, 2008; PEÇANHA et a., 2009; RICE et al., 2014).

Nos rins, principal local de acumulação do metal, lesões graves podem ser observadas como necrose tubular, glomerulonefrite, disfunção tubular e síndrome nefrótica, levando a falência renal aguda (BECKER et al., 1962; KOBAL et al., 2000; PACHECO-FERREIRA, 2008).

O mercúrio também é capaz de entrar no sistema respiratório rapidamente através dos vapores tóxicos e levar a uma insuficiência respiratória aguda (TAUEG, 1992). Já no sistema reprodutor, este metal pode afetar a função reprodutiva através de alterações ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e gonadal, modificando a circulação dos níveis de hormônio folículo-estimulante, hormônio luteinizante,

estrogênio e progesterona (DAVIS et al., 2001), induzindo a anormalidades do ciclo menstrual, inibição da ovulação, diminuição da fertilidade e a características semelhantes às encontradas na síndrome do ovário policístico (ROWLAND et al., 1994; MERLO et al., 2019).

### 1.3 EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Recentemente maior atenção tem sido dada a sua cardiotoxicidade, bem descrita na literatura através de estudos tanto em humanos quanto em animais, que o associam com hipertensão, aterosclerose, infarto do miocárdio e doença coronariana (WOLF e BAYNES, 2007; HOUSTON, 2011; WILDEMANN et al., 2015). O mercúrio afeta o sistema cardiovascular por se acumular nos vasos (PAMPHLETT e KUM-JEW, 2001) e no coração (MAGOS et al., 1997). Wiggers et al., (2008) e Azevedo et al., (2016) já descreveram os efeitos deste metal em ratos machos, os quais apresentaram sinais de disfunção endotelial tanto em artéria de resistência como de condutância, devido a diminuição da disponibilidade de óxido nítrico, sugerindo que o endotélio é um alvo importante deste metal.

### 1.4 ENDOTÉLIO VASCULAR

Um endotélio vascular saudável é caracterizado pelo equilíbrio de agentes pró e antioxidantes, vasodilatadores e vasoconstritores e moléculas pró e anti-inflamatórias (DONATO et al., 2009). Em condições fisiológicas a principal função do endotélio é a regulação do tônus vascular, por meio da liberação de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF), Hiperpolarização derivada do endotélio (HDE), prostaglandinas (PGI<sub>2</sub>) e óxido nítrico, sendo esse o principal vasodilatador produzido e um dos mais importantes na regulação do tônus vascular (MONCADA et al, 1991). Além disso, o endotélio também modula a inflamação, a coagulação sanguínea e a proliferação celular (FURCHGOTT et al., 1980; MCGUIRE et al., 2001; AIRES et al., 2008, SHIMOKAWA, 2020). A disfunção endotelial surge quando ocorre um desequilíbrio na capacidade do endotélio na liberação dessas substâncias (VANHOUTTE, 2010).

Estudos mais recentes evidenciaram que a exposição a longo prazo ao mercúrio induz a disfunção endotelial através do desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio principalmente por conta da reação de Fenton e dos prostanóides derivados da COX-2 (EHARA et al., 2001; RIZZETTI et al., 2017; GÖKSEL et al., 2018). Outra causa de disfunção endotelial na exposição crônica ao mercúrio está relacionada a menor disponibilidade de NO e a aumentada geração de EROs em diversos leitos vasculares (WIGGERS, et al., 2008; FURIERI, et al., 2011; AZEVEDO, et al., 2016). Fisiologicamente as espécies reativas de oxigênio estão presentes nas células dos vasos, sendo estas encontradas em baixas quantidades e constantemente inativadas pelos sistemas antioxidantes. Um equilíbrio entre a geração e a eliminação das EROs é necessário para que estas espécies modulem a função vascular (SZASZ et al, 2007; WESELER & BAST, 2010; ZINKEVICH & GUTTERMAN, 2011). Um desequilíbrio nesta via culmina em estresse oxidativo, presente em várias doenças cardiovasculares (PARAVICINI e TOUYZ, 2008; LASSÈGUE et al, 2012). Nesse sentido, o endotélio vascular parece ser o principal alvo do mercúrio na indução da disfunção endotelial, levando a danos no organismo que precedem os sintomas clínicos das doenças cardiovasculares (SEALS et al., 2011).

## 1.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os principais radicais livres produzidos no organismo são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003). Dentre estas, o mais importante e instável é o  $O_2^{\cdot-}$  (DRÖGE et al., 2002), produzido por enzimas como a NADPH oxidase, xantina oxidase e NOS desacoplada (ANDREW & MAYER, 1999). O  $O_2^{\cdot-}$  pode ser inativado pela ação de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), capaz de dismutar  $O_2^{\cdot-}$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e através da ação da Catalase e da glutatona peroxidase, convertendo em  $H_2O$  (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003). Quando há um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, surgem alterações e doenças em vários sistemas e órgãos especialmente o sistema cardiovascular (GRIENGLING & FITZGERALD, 2003; VALKO et al., 2006).

## 1.6 PROSTANÓIDES DERIVADOS DA CICLOOXIGENASE

Outro produtor de espécies reativas de oxigênio são os prostanóides derivados da via do ácido araquidônico - ciclooxigenase (COX) através da estimulação da NADPH oxidase (HERNANZ et al., 2014). A ativação da COX resulta em produção de prostanóides vasoconstritores e vasodilatadores através do metabolismo do ácido araquidônico e estes estão diretamente relacionados a modulação vascular, sendo os mais comuns a prostaglandina (PGE<sub>2</sub>), o tromboxano (TXA<sub>2</sub>), que leva ao aumento da expressão da NADPH oxidase e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que ao contrário dos anteriores, leva a redução da expressão da NADPH oxidase, reduzindo a produção de EROs (ALVAREZ et al., 2005). Ademais, a COX se apresenta através de duas isoformas, COX-1 uma isoforma constitutiva que tem como função a manutenção das funções fisiológicas (SMITH et al., 1996) e a COX-2 isoforma induzida relacionada principalmente aos processos inflamatórios (FÉLÉTOU, 2010). Estudos em animais já demonstram que o aumento da expressão da COX-2 está relacionado a processos patológicos e aos efeitos deletérios causados pelo mercúrio no organismo (ANTMAN et al., 2005; RIZZETTI et al., 2017; PEÇANHA et al., 2009).

## 1.7 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

A pressão arterial é um importante indicador de doenças cardiovasculares e já foi demonstrada uma correlação entre a exposição a altas concentrações de mercúrio e o aumento da PAS em humanos e animais (WAKITA, 1987; CARMIGNANI et al., 1992; FILLION et al., 2011). Rizzetti et al., (2017) observaram que o tratamento por 60 dias com cloreto de mercúrio foi capaz de elevar a PAS de ratos devido a uma maior atividade do sistema renina-angiotensina (SRA). Uma maior participação do SRA, conseqüentemente aumenta a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), aumentando a liberação de angiotensina II que promove suas ações através da ativação de seus receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. O receptor AT<sub>1</sub> induz suas conhecidas ações de vasoconstrição e produção de EROs, principalmente ânion superóxido, através da ativação da NADPH oxidase (TOUYZ et al., 2003; HUNYADY e CATT, 2006; SALAZAR, 2018). Por outro lado, as ações mediadas por receptores AT<sub>2</sub> muitas

vezes são apostas as provocadas por AT<sub>1</sub> e possuem propriedades vasodilatadoras e antiproliferativas (GASPARO e SIRAGY, 1999).

O SRA também está relacionado com a maior expressão da COX-2 (BRIONES E TOUYZ, 2010), através do aumento da produção de angiotensina II que estimula a atividade da fosfolipase A2 e conseqüentemente aumenta a liberação de prostaglandinas derivadas da COX-2 (ERNEST et al., 1998). Estudo de Rizzetti et al., (2013) realizado em ratos Wistar, também atribui o aumento da atividade da COX-2 a uma maior ativação do SRA com aumento da produção de angiotensina II após o tratamento com mercúrio, atuando diretamente sobre os vasos causando constrição (SALONEN et al., 1995; HOUSTON, 2007).

Embora a angiotensina II seja o principal efector do SRA induzindo seus conhecidos efeitos constritores como visto acima, novas evidências demonstram que a angiotensina (1-7) apresenta efeitos antagônicos possuindo ação anti-hipertensiva, mediando a produção de NO que promove vasodilatação e melhora a função endotelial (FERREIRA e SANTOS, 2005). Estudo demonstra que o estrogênio age sobre o SRA reduzindo a geração de angiotensina II e aumentando a produção de angiotensina (1-7) (BROSNIHAN, et al., 1999), tendo o coração e os vasos sanguíneos como alvos, apresentando efeitos cardiovasculares benéficos (FRAGA-SILVA, et al., 2013; SANTOS, et al., 2013; LI, et al., 2017).

## 1.8 ESTROGÊNIO E SISTEMA CARDIOVASCULAR

Diversos estudos demonstraram que os estrógenos exercem efeitos benéficos no sistema cardiovascular, através do efeito direto do estradiol (E2) nas células do endotélio vascular durante a fase reprodutiva (SADER & CELERMAJER, 2002; YANG e RECKELHOFF, 2011; MEYER et al., 2011). Esses efeitos podem ser mediados por receptores clássicos (ação genômica) sendo eles, o alfa (ER $\alpha$ ) e o beta (ER $\beta$ ) (SHERMAN et al., 2002) que se localizam no citoplasma e atuam como fator de transcrição dependentes de ligantes, que se ligam ao DNA com a ajuda de co-ativadores ou co-repressores e alteram a transcrição do DNA e a síntese proteica. Na membrana celular, atua através do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) (ação não-genômica), que quando ativado, medeia ações agudas do estrogênio através de cascatas intracelulares de sinalização rápida via PI3K, ERK e

MAPK, que também podem alterar a expressão gênica induzindo a geração de segundos mensageiros como  $\text{Ca}^{2+}$  e NO (FILARDO et al., 2000; REVANKAR et al., 2005; DESCHAMPS e MURPHY, 2009; LINDSEY et al., 2013). A ativação desses receptores é capaz de alterar o perfil lipídico sérico, ativar sistemas antioxidantes e induzir a produção de moléculas vasoativas como NO e prostaglandinas (MENDELSON & KARAS, 1999; AKARASEREENONT, 2000; EGAN, et al., 2004; SHAH, 2005). Além disso, é capaz de inibir a proliferação celular e a agregação plaquetária (BHALLA et al., 1997) e por estimulação direta dos canais de potássio levar a vasodilatação (VALVERDE et al., 1999), promovendo efeitos benéficos diretamente sobre o sistema cardiovascular.

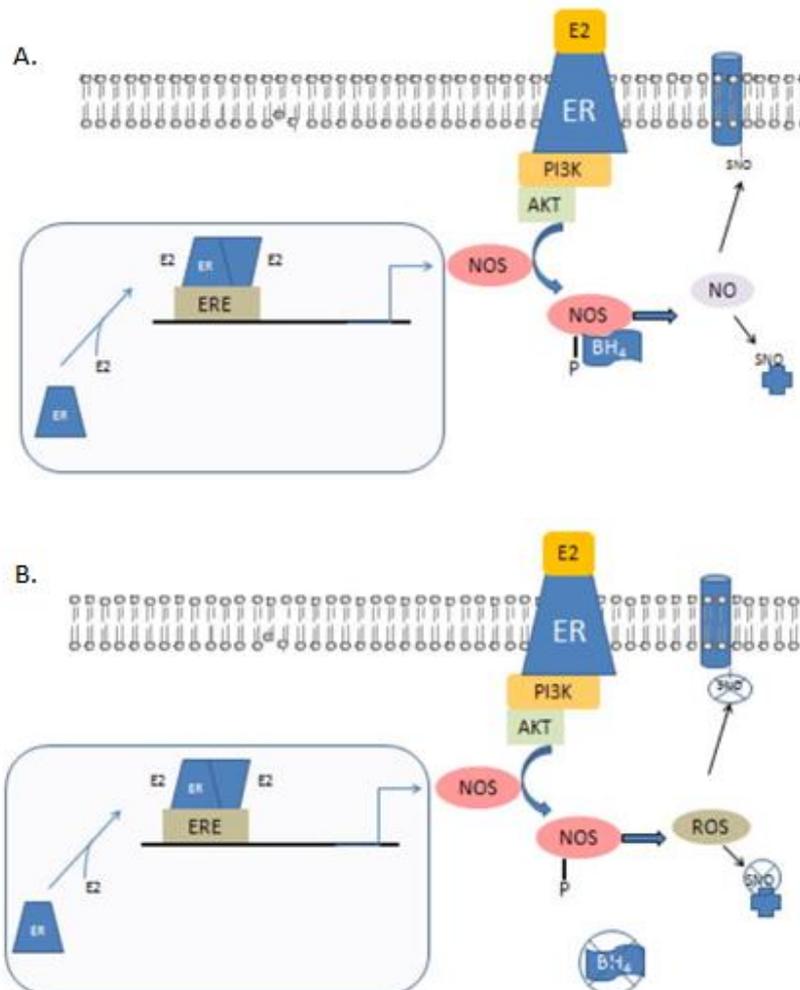
Evidências demonstram que homens são mais propensos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares do que mulheres em período reprodutivo com a mesma idade (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2004; HERON, 2013). Quando se avalia mulheres na pós-menopausa, um aumento no desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares é observado (ORSHAL & KHALIL, 2004; MARIC-BILKAN & MANIGRASSO, 2012). Isto ocorre devido à queda dos hormônios femininos, principalmente o estrogênio, indicando um papel cardioprotetor desse hormônio (MENDELSON et al., 2007; KURT & BUYUKAFSAR, 2013).

Essa proteção através do estrogênio se dá em grande parte através do estímulo da síntese de enzimas antioxidantes (RUIZ-SANZ et al., 2001; WHITE, 2002) e da produção de substâncias vasodilatadoras como NO e  $\text{PGI}_2$  (AKARASEREENONT, 2000; TEP-AREENAN, 2003), além de exercer efeito benéfico sobre a função endotelial por estimular a liberação de EDRF (HAYNES et al., 2000). Estudos laboratoriais demonstraram que o estrogênio exógeno reduz o risco de doenças cardiovasculares (DCVs), reduzindo a resistência vascular coronariana e aumentando o fluxo sanguíneo coronário *in vitro* (RADDINO et al., 1986) e *in vivo* (NODE et al., 1997).

Entretanto, ensaio clínico realizado (WOMEN'S HEALTH INITIATIVE, 2002) indica que a terapia de reposição hormonal na verdade aumenta o risco de doença coronariana e acidente vascular cerebral (HARMAN, 2006). White, et al., (2010) propõe que esses efeitos contraditórios ocorram através do duplo efeito da óxido nítrico sintase (NOS) que em condições fisiológicas, em mulheres jovens, através da ativação da via do estrogênio produz o óxido nítrico tendo efeitos benéficos na vasculatura. Porém, à medida que a mulher envelhece, uma redução nos níveis de

cofatores necessários para sustentar a produção de NO pela atividade da eNOS é observada, levando ao desacoplamento da eNOS. Evidências demonstram que o estrogênio estimulando a NOS desacoplada leva a produção de ânion superóxido ao invés de óxido nítrico, originando efeitos danosos ao organismo e elevando o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Assim, podemos observar que o estrogênio apresenta tanto efeitos benéficos quanto nocivos na vasculatura e estes são mediados pela mesma enzima: NOS. Dependendo do ambiente onde esta se encontra, o estrogênio exibe uma influência antagônica na função celular, em condições fisiológicas produz vasodilatação via NO e em condições fisiopatológicas produz vasoconstrição via  $O_2^-$ . Estudo de White, et al (2005) demonstra que ao administrar E2 em condições fisiológicas as artérias coronárias relaxam, entretanto se anteriormente fosse incubado um fármaco que desacopla a eNOS, o E2 levaria a uma maior produção de ânion superóxido pela eNOS.



**Figura I.** Em A ilustração da via de sinalização estrogênica genômica na regulação da sinalização de óxido nítrico (NO). O estrogênio se liga ao ER, resultando em dimerização e ativação da transcrição de genes e expressão da óxido nítrico sintase (NOS) levando a produção de NO. Em B ilustração de como essa sinalização pode ser alterada com o envelhecimento e a doença onde na ausência de tetrahydrobiopterina (BH4), um cofator para NOS, agora gera EROs em vez de NO (Murphy, 2011).

## 1.9 JUSTIFICATIVA

O mercúrio é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tanto em homem quanto em mulheres. Visto que existe uma carência de estudos que avaliam os efeitos da exposição crônica ao mercúrio em fêmeas, investigamos os mecanismos pelos quais este metal acarreta danos no aparelho cardiovascular, deste gênero. Baseado nisto, a hipótese do presente estudo é que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio em concentrações identificadas em pessoas expostas, é capaz de modificar a função vascular, através da alteração de fatores vasoativos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição ao cloreto de mercúrio por 4 semanas sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de aorta de ratas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da exposição ao HgCl<sub>2</sub> sobre o ganho ponderal de ratas durante as 4 semanas de exposição.
- Verificar se a exposição ao mercúrio altera o peso úmido de órgãos do sistema reprodutor feminino: útero e ovários.
- Identificar se a exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub> altera os níveis plasmáticos de estrogênio.
- Avaliar os efeitos da exposição ao HgCl<sub>2</sub> por 4 semanas, sobre a pressão arterial sistólica de ratas.
- Investigar se a exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub> altera a vasoconstrição mediante a participação do endotélio, a influência do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos prostanóides derivados da COX, do sistema renina-angiotensina e dos receptores estrogênicos (ER $\alpha$ /ER $\beta$  e GPER).
- Avaliar se a exposição crônica ao mercúrio altera o relaxamento dependente do endotélio e independente do endotélio nos anéis de aorta de ratas.
- Avaliar os efeitos da exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub> sobre a produção “*in situ*” de ânion superóxido e de óxido nítrico.

- Investigar os efeitos do mercúrio sobre a expressão proteica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e peNOS (phospho-Ser1177), COX-2 e as superóxidos dismutases, SOD-Cu/Zn e SOD-Mn.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com 10 semanas de idade e peso corporal entre 200-250g. Os animais foram cedidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES e mantidos em caixas coletivas (n= 4 por gaiola), tendo livre acesso a água tratada e a ração para roedores, sob condições controladas de temperatura (20-25°C) e ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas. O uso e cuidado desses animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016), e todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 014/2016).

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos protocolos os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: Controle e Mercúrio. As ratas do grupo Controle receberam injeção intramuscular (i.m.) de solução Salina (Cloreto de sódio – 0,9%) nas patas traseiras, enquanto o grupo Mercúrio foi exposto ao cloreto de mercúrio, sendo a 1ª dose: 4,6g/Kg e doses de reposição diária de 0,07g/Kg durante 30 dias i.m., com a finalidade de obter uma concentração plasmática final de cerca de 29nM (WIGGERS, et al., 2008). Semanalmente, durante as 4 semanas de tratamento o peso corporal foi verificado para avaliação do ganho ponderal e ajuste da dose de reposição.

#### 3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

##### 3.3.1 Medida de pressão arterial

Os animais foram submetidos à mensuração indireta da pressão arterial sistólica (PAS) semanalmente durante o tratamento, realizadas através de pletismógrafo de cauda (IITC Life Science – 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Todos foram

submetidos previamente a ambientação, durante três dias, antes da primeira mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, com o intuito de prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento.

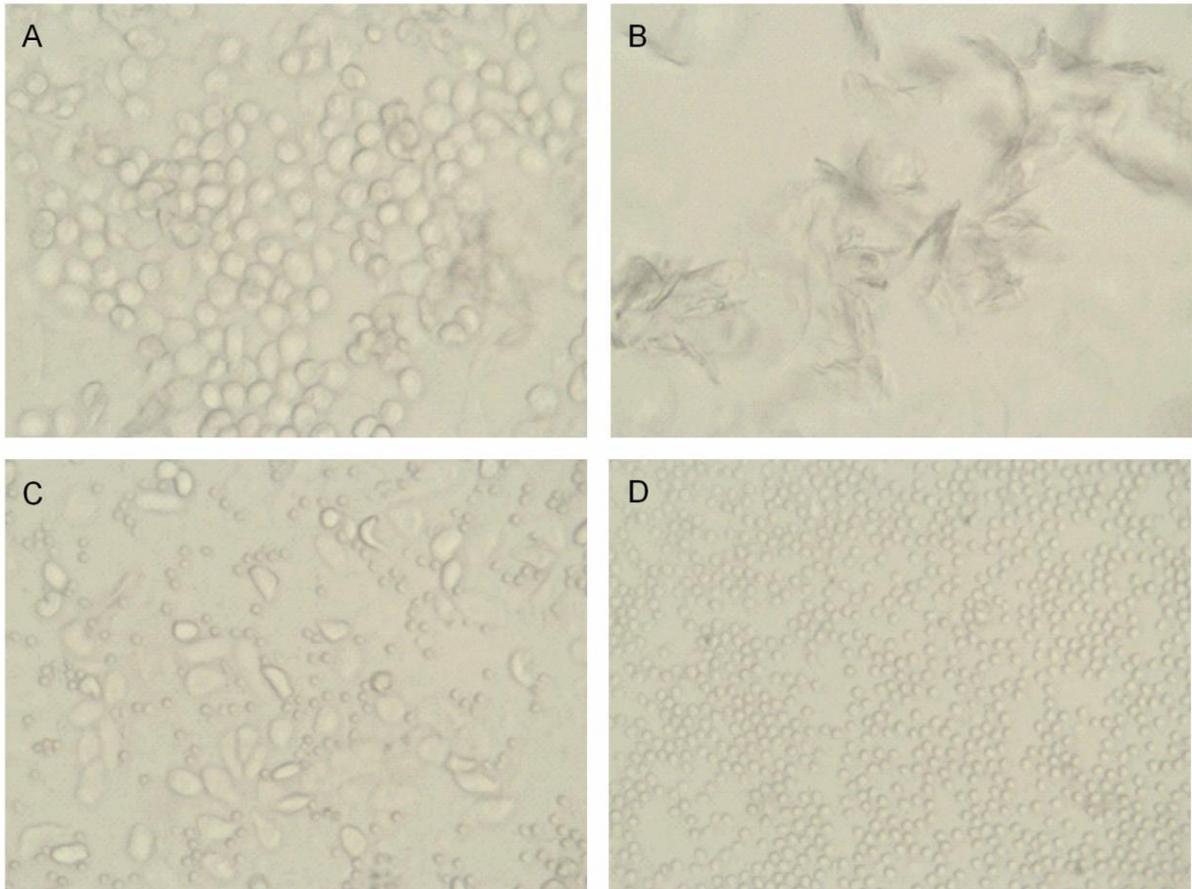
Durante as medidas de pressão os animais eram colocados em um cilindro de acrílico dentro de uma estufa a 37°C por um período de 15 minutos, com o intuito de promover dilatação da artéria caudal. Foram realizadas cinco medidas da pressão arterial sistólica de cada animal das quais foi obtida a média aritmética.

### **3.3.2 Avaliação dos parâmetros ponderais**

Durante o período de exposição ao HgCl<sub>2</sub> o peso corporal foi verificado semanalmente para avaliação do ganho ponderal. Após a eutanásia foram retirados útero e ovários e pesados em balança de precisão, além disso, foi dissecada a tibia e medida com o auxílio de um paquímetro para estimar o crescimento ósseo. Os pesos dos órgãos foram corrigidos pelo comprimento da tibia da respectiva rata, e estão representados em mg/cm.

### **3.3.3 Determinação da fase do Ciclo Estral**

O ciclo estral foi determinado a fim de evitar quaisquer influências provocadas pela variação hormonal nas diferentes fases do ciclo: proestro, estro, metaestro e diestro. Foram realizados esfregaços vaginais em ambos os grupos as 08:00 horas, antes da realização dos protocolos experimentais (DALLE LUCCA et al., 2000; MARCONDES et al., 2002). A ponta de uma pipeta era inserida gentilmente no interior da vagina, contendo solução salina 0,9% (NaCl) e o esfregaço obtido era colocado sobre uma lâmina e levado para avaliação das células por microscopia óptica para determinação da fase do ciclo estral. Os experimentos foram realizados nas fêmeas que ao final das 4 semanas de exposição seu ciclo estral se encontrava no proestro, devido a essa ser a fase caracterizada por altos níveis de estrogênio. As células observadas na avaliação do ciclo estral das ratas estão representadas na Figura II.



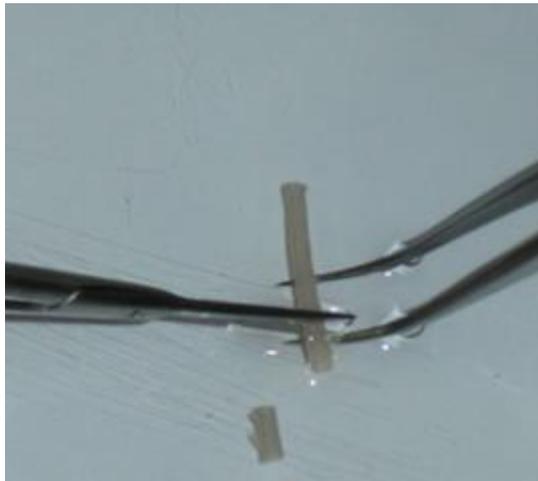
**Figura II.** Fotografias de esfregaço vaginal de ratas, demonstrando as fases do ciclo estral. Proestro - predomínio de células epiteliais nucleadas (A); Estro - predomínio de células cornificadas (B); Metaestro - leucócitos com presença de células cornificadas e epiteliais (C); Diestro - predomínio de leucócitos (D). As imagens foram coletadas no microscópio BEL SOLARIS-T com objetiva de 40x e câmera EUREKAM 5.0. Fonte: Própria.

### 3.3.4 Dosagem de estrogênio

O sangue dos animais de ambos os grupos foi coletado através da aorta abdominal para medida das concentrações plasmáticas de estrogênio. O sangue coletado foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos para a obtenção do soro que foi estocado à -20°C para futura mensuração de E2 através de kits de ensaio imunoenzimático em microplaca (Kit DRG Estradiol Elisa #42K034 DRG Instruments GmbH, Germany).

### 3.3.5 Avaliação da reatividade vascular em aorta

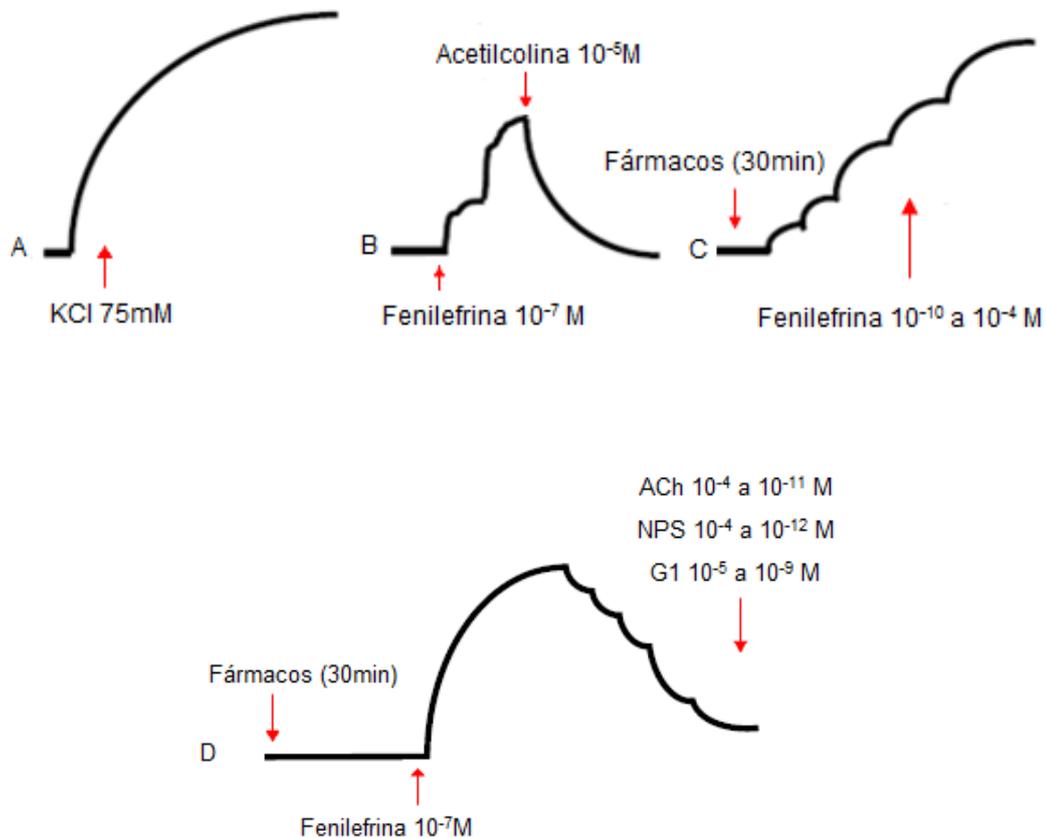
Após 4 semanas de exposição, as ratas foram anestesiadas com Ketamina (50mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e eutanasiadas. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente retirada e imersa em placa de petri contendo solução de Krebs Henseleit. Após remoção do tecido conectivo e adiposo, a aorta foi dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento (Figura III).



**Figura III:** Aorta torácica em uma placa de Petri imersa em solução de Krebs após retirada dos tecidos, sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm (Angeli, 2009).

Cada anel foi colocado em cubas contendo 5mL de solução de Krebs-Henseleit, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,17;  $\text{NaHCO}_3$  24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica composta por 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$ , pH 7,4, e aquecida a  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  continuamente. Dois fios de aço inoxidável em forma de triângulos foram passados através do lúmen dos segmentos, de forma que ficassem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parte inferior da cuba e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica (TSD125C, CA, USA). Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de aproximadamente 1 g, reajustada, quando necessário, durante o período de 45 minutos de estabilização. Posteriormente, todos os anéis aórticos foram expostos duas vezes ao cloreto de potássio (KCl, 75mM), primeiro para verificar a integridade funcional do músculo liso vascular e o segundo para a verificar a tensão máxima desenvolvida. Trinta minutos após a lavagem, a integridade endotelial foi testada através do relaxamento com

acetilcolina (ACh,  $10^{-5}$ M) nos anéis pré-contraídos com fenilefrina (Phe,  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$ M). Um relaxamento igual ou superior a 80% da contração induzida pela Phe foi indicativo de que o endotélio vascular estava íntegro. Após lavagem e estabilização dos anéis por 30 minutos, foram incubados fármacos de interesse por 30 minutos: L-NAME, inibidor da sintase de óxido nítrico ( $100\mu\text{M}$ , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); Tempol, mimético da superóxido dismutase ( $10\mu\text{M}$ , Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); Apocinina, inibidor da NADPH oxidase ( $30\mu\text{M}$ , Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA); Catalase, “varredor” enzimático de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ( $1000\text{U/mL}$ , Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)  $\text{BH}_4$ , tetrahidrobiopterina ( $1\text{mM}$ , Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA); NS398, inibidor seletivo da COX-2 ( $1\text{mM}$ , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); SC-19220, antagonista de receptor EP1 de PGE2 ( $10\mu\text{M}$ , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); SQ 29,548, antagonista do receptor de TP de TXA2 ( $1\mu\text{M}$ , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); CAY10441, antagonista do receptor IP de PGI2 ( $100\text{nM}$ , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); Losartan, bloqueador de receptor  $\text{AT}_1$  ( $10\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); ICI182.78, antagonista do receptor de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  ( $1\mu\text{M}$ , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); G-36, antagonista do receptor acoplado a proteína G (GPER) ( $1\mu\text{M}$ , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); G-1, agonista seletivo do receptor GPER ( $10\mu\text{M}$ , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Na sequência curvas concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $10^{-4}$ M) foram realizadas a fim de avaliar a resposta vasoconstritora em ambos os grupos. Também foram avaliadas as respostas vasodilatadoras dependente de endotélio através de curvas concentração-resposta à acetilcolina ( $10^{-4}$  a  $10^{-11}$ M), resposta vasodilatadora independente do endotélio através do nitroprussiato de sódio ( $10^{-4}$  a  $10^{-12}$ M) e relaxamento dependente de GPER através da curva concentração-resposta com G-1 ( $10^{-5}$  a  $10^{-9}$ ) em anéis de aorta torácica pré-contraídas com fenilefrina (Figura IV).



**Figura IV.** Registro representando experimentos de reatividade vascular em aorta. A: Cloreto de potássio (75mM); B: Teste de integridade do endotélio; C: Curvas contração-resposta à fenilefrina; D: Curvas de relaxamento à ACh, NPS ou G-1. (Modificado de Peçanha, 2009).

### 3.3.6 Quantificação “*in situ*” de óxido nítrico

Para a detecção de óxido nítrico “*in situ*” foi utilizado 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), através de método descrito previamente por Lobato, et al., (2011). Após dissecação as aortas foram imersas em solução tampão de Krebs-HEPES com 30% de sacarose durante uma hora e a seguir foram embebidas em meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek - OCT (Bayer) e mantidas à  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos cortes com criostato (Killik®, Easy Path). Os segmentos de aorta foram cortados com  $10\mu\text{m}$  de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas. Os cortes nas lâminas foram incubados com tampão fosfato (0,1M) contendo  $\text{CaCl}_2$  (0,45M) e mantidos em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos para retirar o meio de inclusão (Tissue-Tek®, Compound, Sakura – OCT),

após secagem foram incubadas em câmara escura, lâminas do grupo: Controle+DAF (8 $\mu$ M) e Controle+DAF+L-NAME (100 $\mu$ M), Mercúrio+DAF (8 $\mu$ M) e Mercúrio+DAF+L-NAME (100 $\mu$ M) a 37°C por 30 min com a finalidade de avaliar a fluorescência do NO e a inibição da síntese de óxido nítrico. As imagens foram coletadas no microscópio de fluorescência invertido Leica DM 2500, usando filtro 568nm e com câmera Leica DFC 310 FX, usando configurações iguais de imagem tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Mercúrio. Para quantificação, quatro imagens de segmentos de aorta por animal foram utilizadas para obter a média amostral. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software Metamorph.

### **3.3.7 Quantificação de ânion superóxido “*in situ*”**

A produção “*in situ*” de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) foi avaliada pela fluorescência por dihidroetídeo (DHE, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), como previamente descrito por Nunes, et al., (2014). Segmentos de aorta foram submersos em solução de Krebs-HEPES com sacarose 30% por uma hora e congeladas em meio de inclusão (OCT) a -80°C. Estas artérias congeladas foram cortadas em criostato com espessura de 10 $\mu$ m e os anéis colocados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram incubadas por 30 minutos em solução de Krebs-HEPES a 37°C e após período de secagem, incubadas em câmara escura por 30 minutos com os seguintes fármacos: grupo Controle+DHE (2 $\mu$ M) e Controle+DHE+Tiron (1mM), Mercúrio+DHE (2 $\mu$ M) e Mercúrio+DHE+Tiron (1mM), aplicado as soluções diretamente sobre os anéis. As imagens foram detectadas utilizando microscópio de fluorescência invertido Leica DM 2500 com câmera Leica DFC 310X. As configurações de análise foram às mesmas tanto no grupo Controle quanto no grupo Mercúrio. A média da densidade das fluorescências foi calculada a partir de quatro imagens de segmentos de aorta de cada animal, utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

### **3.3.8 Microscopia eletrônica de varredura**

Aortas dos diferentes grupos experimentais, Controle e Mercúrio, foram coletadas, cortadas para expor a superfície endotelial e fixadas em solução de

Karnovsky (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 2% e tampão de cacodilato a 0,1 M). Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio e desidratadas com etanol em diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Após período de desidratação foram submetidas ao procedimento de secagem em ponto crítico e uma camada de ouro de 10nm foi evaporada na superfície do tecido conforme descrito por estudo de Friques, et al., (2015). As micrografias eletrônicas dos dois grupos foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JEM6610 LV, Inc. EUA) com ampliação de 300x e 1000x.

### **3.3.9 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting**

A técnica de Western Blotting foi utilizada para análise da expressão de proteínas em ambos os grupos estudados, Controle e Mercúrio. Amostras de aortas foram mantidas a uma temperatura de -80°C até o momento de extração das proteínas. Aortas foram homogeneizadas por trituração em solução tampão de lise contendo: Tris - HCl (10mM, pH 7,4); NaVO<sub>3</sub> (1mM); SDS, 1%; DTT (0,5mM); EDTA (5mM, pH 8); PMSF (1mM); NaF (10mM); Inibidor de protease, todo processo foi realizado em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas durante 10 min, 6.000 rpm a 4°C (Eppendorf-Neitheier-Hinz, GmbH22331, Alemanha) e em seguida o sobrenadante foi retirado e feita a quantificação proteica pelo método de Lowry (Lowry, et al., 1951). Utilizando-se espectrofotômetro com absorvância de 750nm (Cary Varian. San Diego, CA, USA) comparou-se a concentração proteica das amostras com uma curva de albumina sérica bovina (BSA), em concentrações conhecidas, utilizada como padrão. A leitura da curva e de todas as amostras foi feita em duplicata. Em seguida, o volume necessário para uma carga de 80µg de proteína foi calculado, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Solução de Laemmli 4X (0,5mM de uréia, 0,17mM de SDS, 39µM de ditiodiol, 0,01M de Tris e azul de bromofenol 0,5%) foi adicionada a alíquotas do homogeneizados.

As amostras foram carregadas em géis SDS-PAGE 7,5% ou 12,5% (Tris HCl 1,5M pH: 8,8, acrilamida 30%, glicerol 100%, SDS 10%, persulfato de amônio (APS) 10% e Temed), previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190mM de glicina e 0,1% de SDS), juntamente com um marcador de peso

molecular de amplo espectro (6 a 180 kDa), sendo submetidas à eletroforese aplicando corrente constante de 80V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) durante aproximadamente 2 horas, para separação das proteínas.

Ao final da eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) utilizando um sistema de transferência líquida na qual o sanduíche era montado em suporte Holder Cassete e acoplado a uma cuba (TransBlot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 190mM, SDS 0,1% e Metanol 20%) à 8°C com uma corrente de 0,25A por 20 horas.

Uma vez transferidas, as membranas com as proteínas permaneceram por 2 horas em solução de bloqueio sob agitação contínua em temperatura ambiente (5% de leite desnatado em pó, dissolvida em solução de lavagem das membranas (TBS-T): 10 mM de TrisHCl a pH = 7,5; 100mM de NaCl; e 0,1% Tween-20) para evitar uniões inespecíficas do anticorpo. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* (18 h) a 8°C com os anticorpos primários para óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) Ser1177 (1:500; monoclonal, BD Transduction Laboratories, San Jose, EUA), eNOS fosforilada (peNOS) Ser1177 (anticorpo policlonal, 1:1000; Cell Signaling, Boston, MA), COX-2 (anticorpo monoclonal, 1:200; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), SOD-Cu/Zn (isoforma citosólica; anticorpo policlonal, 1:100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e SOD-Mn (isoforma mitocondrial; anticorpo policlonal, 1:100; Biotecnologia Santa Cruz).

Após incubação *overnight*, as membranas foram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 30 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 10 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente e agitação contínua, com anticorpo secundário IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas por 30 min com solução de TBS-T, para remoção do excesso de anticorpo secundário. Os imunocomplexos foram detectados utilizando um sistema de quimioluminescência por meio da exposição da membrana por 5 minutos a um sistema de detecção (ECL Prime, Amersham). As bandas foram observadas com o equipamento ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA) e quantificadas usando o software ImageJ. Ao final, as membranas foram coradas com a solução corante Ponceau S por 20 minutos e descorada com solução

TBS-T, para quantificação da proteína total. Os resultados foram expressos pela razão entre os sinais no immunoblot correspondentes à proteína estudada e o Ponceau S.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada através do programa estatístico Graph-Pad Prism 6. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média do número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

Foi realizado o teste de normalidade e todos os dados obtiveram distribuição Gaussiana, considerada normal. As curvas concentração-resposta e a análise de pressão arterial foram analisadas através de ANOVA duas vias e quando detectada significância estatística era realizado pós-teste de Bonferroni.

Com o objetivo de comparar o efeito da remoção do endotélio ou de alguns fármacos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina dos grupos estudados, os resultados foram expressos como porcentagem da diferença da área abaixo da curva (dAAC) nas situações controle (sem fármaco) e nas situações experimentais (remoção do endotélio ou na presença de fármacos).

Para a avaliação da intensidade de fluorescência de óxido nítrico e ânion superóxido foi utilizado ANOVA uma via e para as demais análises foi utilizado Teste *t de Student* não pareado para comparação de duas médias. As diferenças foram consideradas significativamente estatísticas quando  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PARÂMETROS PONDERAIS

Os animais dos grupos Controle e Mercúrio apresentaram peso semelhante do início ao término do tratamento, demonstrando que a exposição por 30 dias ao HgCl<sub>2</sub> não influenciou no ganho de peso corporal.

Avaliou-se também o peso de órgãos que compõe o sistema reprodutor feminino, útero e ovário, bem como a concentração plasmática de estrogênio. Valores semelhantes foram observados em ambos os grupos como representado na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros ponderais de animais dos grupos Controle e Mercúrio.

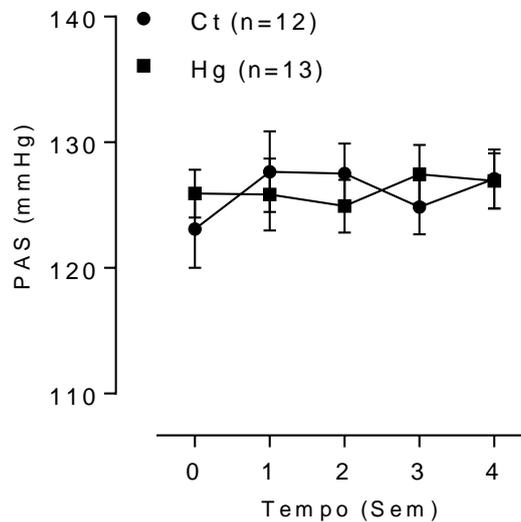
	<b>Controle</b>	<b>Mercúrio</b>
Peso corporal inicial (g)	218 ± 2,8 (n=20)	217 ± 2,6 (n=18)
Peso corporal final (g)	242 ± 3,6 (n=20)	238 ± 4,3 (n=18)
Útero/comprimento tibia (mg/cm)	18,70 ± 1,32 (n=6)	19,19 ± 1,50 (n=5)
Ovários/comprimento tibia (mg/cm)	2,54 ± 0,26 (n=6)	2,67 ± 0,33 (n=5)
Estrogênio (pg/ml)	38,57 ± 5,81 (n=7)	40,28 ± 5,88 (n=7)

Valores expressos em média ± EPM; Teste-*t* não-pareado. Número amostral está indicado entre parênteses.

### 4.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

O efeito da exposição por 30 dias ao cloreto de mercúrio sobre a PAS foi avaliado em ambos os grupos através de pletismografia de cauda. Os valores das pressões

durante as quatro semanas de tratamento não foram diferentes entre os grupos experimentais estudados (Figura 1).

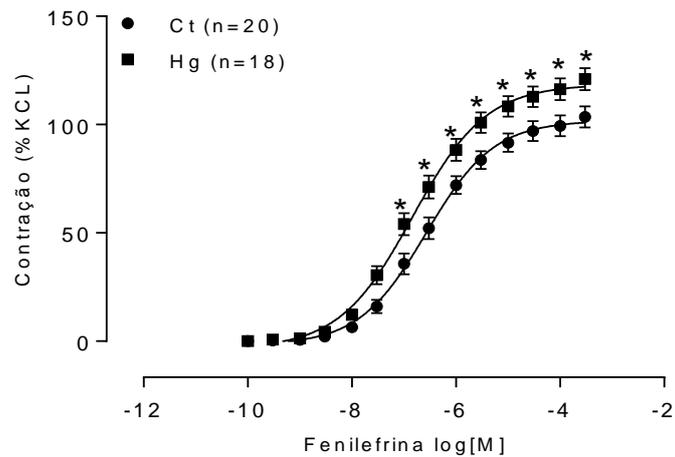


**Figura 1.** Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) obtidos através de pletismografia de cauda em ratos do grupo Controle e Mercúrio durante quatro semanas de exposição. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA (duas vias)  $P > 0,05$ .

#### 4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL A FENILEFRINA

A fim de verificar a integridade funcional do músculo liso vascular da aorta, todos os anéis foram expostos a solução rica em cloreto de potássio (KCl - 75mM). As respostas contráteis induzidas pelo KCl foram similares entre os grupos (Ct:  $3,34 \pm 0,06$ g; n=20 vs Hg:  $3,19 \pm 0,1$ g; n=18).

Em seguida foi avaliada a resposta vasoconstritora da aorta torácica através de curva concentração-resposta à fenilefrina (agonista  $\alpha_1$  adrenérgico) e observou-se aumento da reatividade vascular em anéis de aorta de ratos expostas ao cloreto de mercúrio, quando comparado ao grupo Controle (Figura 2, Tabela 2).



**Figura 2.** Resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \* $P < 0,05$  vs Ct.

Tabela 2 – Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) da curva concentração-resposta à fenilefrina sobre anéis aórticos de fêmeas do grupo Controle e Mercúrio.

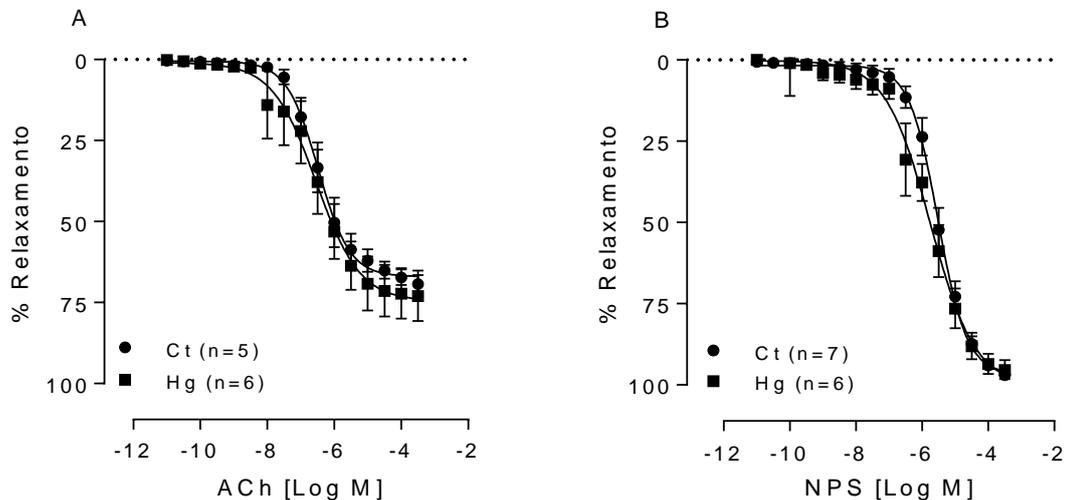
Phe	Controle	Mercúrio
R <sub>máx</sub> (%)	103.56 $\pm$ 4,8	120.98 $\pm$ 5,0*
pD <sub>2</sub>	-6.51 $\pm$ 0.13	-7.00 $\pm$ 0.11*

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; R<sub>máx</sub> foi expresso em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl (75mM). pD<sub>2</sub>, -log da metade do R<sub>máx</sub>. Teste-*t* não-pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA VASODILATADORA DEPENDENTE (ACh) E INDEPENDENTE (NPS) DO ENDOTÉLIO NA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO

Foi avaliado se a exposição crônica ao mercúrio poderia alterar o relaxamento dependente (ACh -  $10^{-12}$  a  $10^{-4}$ M) ou independente (NPS -  $10^{-12}$  a  $10^{-4}$  M) do endotélio em segmentos de aorta de ratos. Tanto a Acetilcolina quanto o Nitroprussiato de

Sódio, promoveram relaxamento dos anéis de aorta de maneira concentração-dependente semelhante em ambos os grupos como indicado na Figura 3.

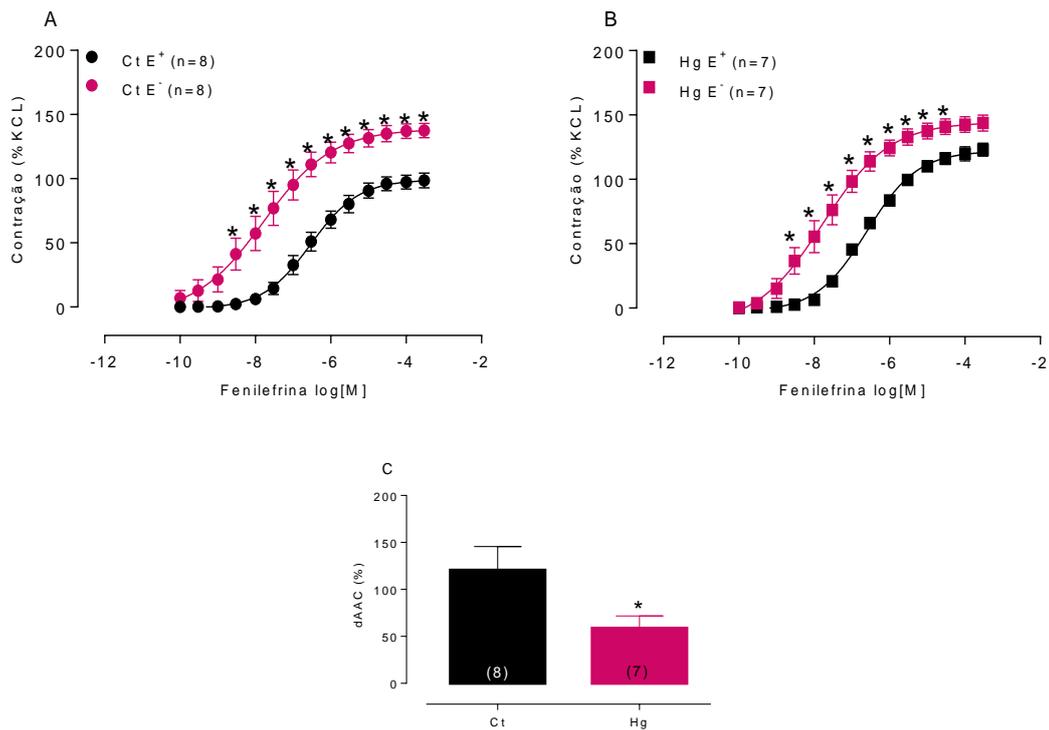


**Figura 3:** Resposta dilatadora induzida pela ACh (A) e pelo NPS (B) em segmentos de aorta de ratas dos grupos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à Phe. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias)  $P > 0,05$ .

#### 4.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A MODULAÇÃO DO ENDOTÉLIO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Com o objetivo de avaliar a modulação endotelial na resposta vascular à fenilefrina, o endotélio foi mecanicamente removido e a ausência desta estrutura foi confirmada pela capacidade da acetilcolina (ACh -  $10\mu\text{M}$ ) induzir relaxamento menor que 10%.

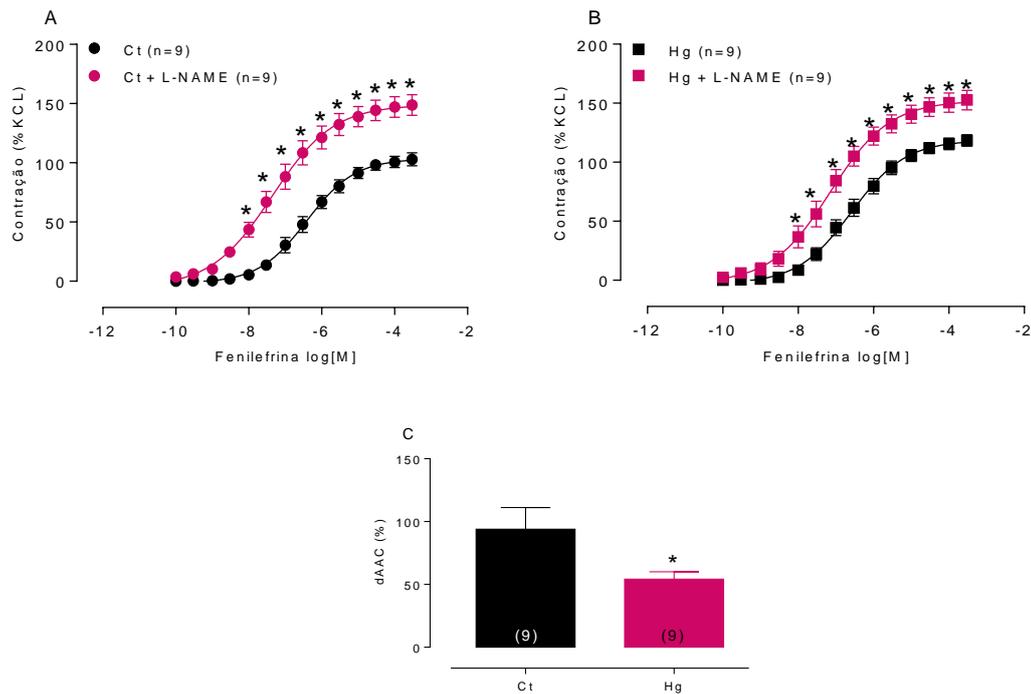
A ausência do endotélio promoveu aumento significativo da reatividade vascular em ambos os grupos, Controle e Mercúrio. Para comparação da magnitude do efeito entre os grupos foi utilizado o cálculo da diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC), onde observou-se menor magnitude de efeito no grupo exposto ao mercúrio, indicando redução da modulação endotelial sobre a resposta vascular à fenilefrina em aorta de ratas deste grupo (Figura 4).



**Figura 4.** Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos Controle (A) e Mercúrio (B). Em C diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC), para comparação entre os grupos. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni  $*P < 0,05$  vs Ct E<sup>+</sup>/Hg E<sup>+</sup>. Teste-t não pareado foi usado na dAAC  $*P < 0,05$  vs Ct.

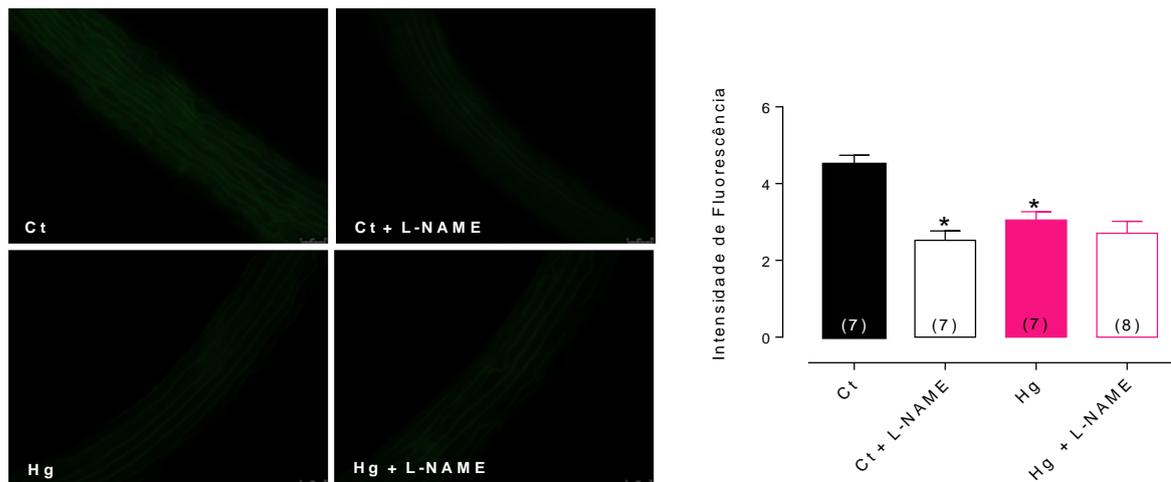
#### 4.6 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Para analisar o papel do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina, segmentos de aorta torácica com endotélio íntegro foram pré-incubados com L-NAME (100 $\mu$ M), inibidor da sintase de óxido nítrico. Foi observado aumento da reatividade vascular tanto no grupo Controle quanto no grupo Mercúrio. Quando avaliado este efeito entre os grupos utilizando-se a dAAC foi possível observar que o grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub> apresentou menor área, sugerindo uma menor participação do óxido nítrico neste grupo (Figura 5).



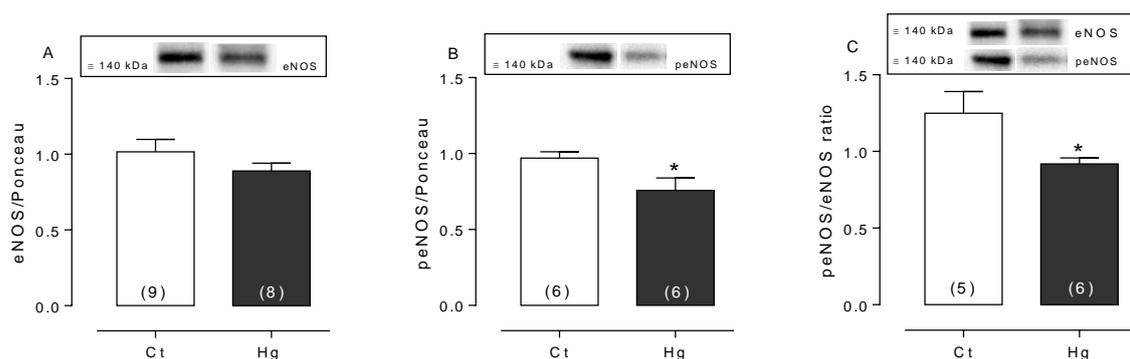
**Figura 5.** Efeito do inibidor da sintase de óxido nítrico L-NAME (100 $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Em C a diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC), para comparação entre os grupos. Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni  $*P < 0,05$  vs Ct/Hg Teste-*t* não pareado foi usado na dAAC  $*P < 0,05$  vs Ct.

Diante deste resultado, utilizamos um ensaio de detecção *in situ* de NO em secções transversais de anéis isolados de aorta (10 $\mu$ m), mensurada pela sonda DAF-2 fluorescente para confirmar se o cloreto de mercúrio estaria reduzindo a produção de óxido nítrico nas artérias de ratos expostas. Como mostrado na Figura 6 (A e B), aorta de ratos expostas ao mercúrio apresentaram fluorescência reduzida em relação ao grupo Controle. Ao analisar o controle negativo através da inibição da produção de NO pela incubação com L-NAME houve redução da fluorescência em ambos os grupos, confirmando que o grupo Mercúrio apresenta prejuízo na produção de óxido nítrico.



**Figura 6.** Detecção “*in situ*” de NO em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência representando secções transversais de aorta torácica na presença da sonda fluorescente DAF-2 de animais do grupo Controle e Mercúrio. A especificidade do método foi avaliada pela incubação das aortas com o L-NAME (100µM). Gráfico de barras demonstrando a análise semi-quantitativa. Os dados estão expressos em média ± EPM da densidade de fluorescência. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct.

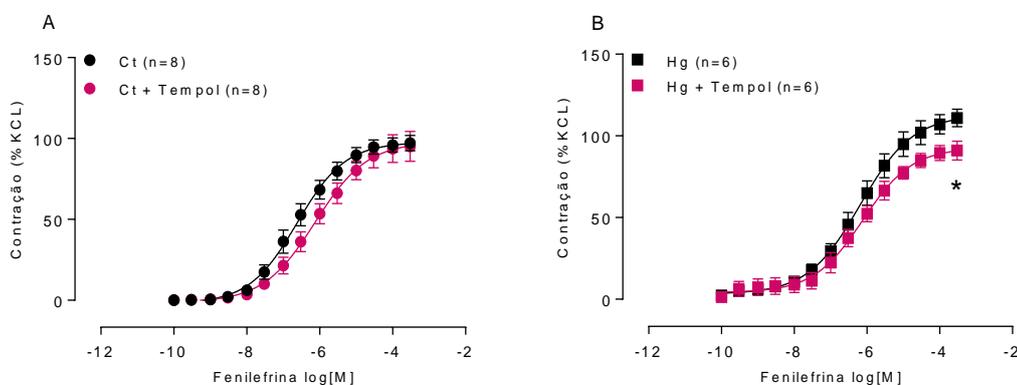
Podemos observar, através da análise de Western Blotting, que não houve alteração do conteúdo proteico da eNOS, entretanto, houve uma menor expressão proteica da peNOS e redução da relação eNOS/peNOS no grupo de ratas expostas ao HgCl<sub>2</sub>, indicando uma menor atividade dessa enzima (Figura 7 – A, B e C).



**Figura 7.** Análise densitométrica do Western Blotting para expressão das proteínas eNOS (A) e peNOS (B) e da razão eNOS/peNOS (C) em aorta de ratas dos grupos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Blots representativos também são mostrados. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct.

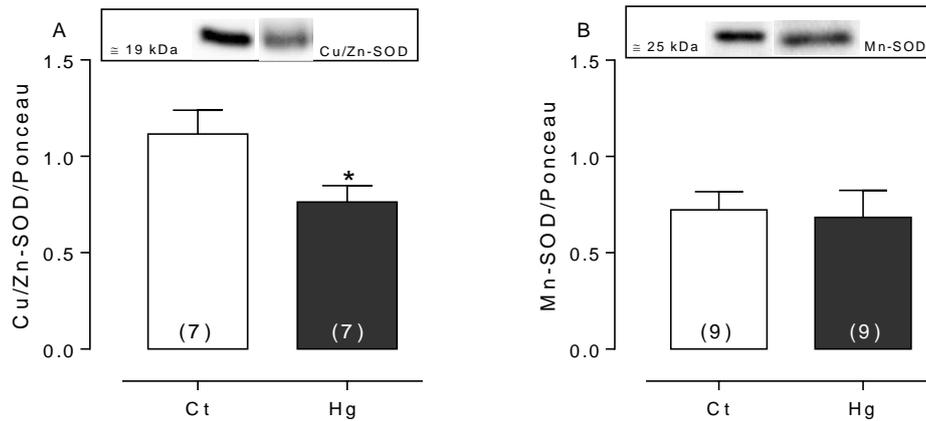
#### 4.7 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Estudos demonstram que a exposição a longo prazo ao mercúrio induz a disfunção endotelial, principalmente através do aumento de espécies reativas de oxigênio (EHARA et al., 2001; RIZZETTI et al., 2017; GÖKSEL et al., 2018). Visto que os resultados observados em nosso estudo até o momento indicavam que a exposição crônica ao  $\text{HgCl}_2$  provocou redução da modulação endotelial e do óxido nítrico. Investigamos se o aumento na reatividade vascular encontrado poderia estar associado a maior produção de EROs. Para isso, anéis de aorta foram incubados com Tempol, mimético da superóxido dismutase ( $10\mu\text{M}$ ), enzima antioxidante capaz de dismutar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ . A presença deste fármaco causou redução da reatividade vascular no grupo exposto ao mercúrio, indicando aumento da presença de ânion superóxido em ratas deste grupo (Figura 8).



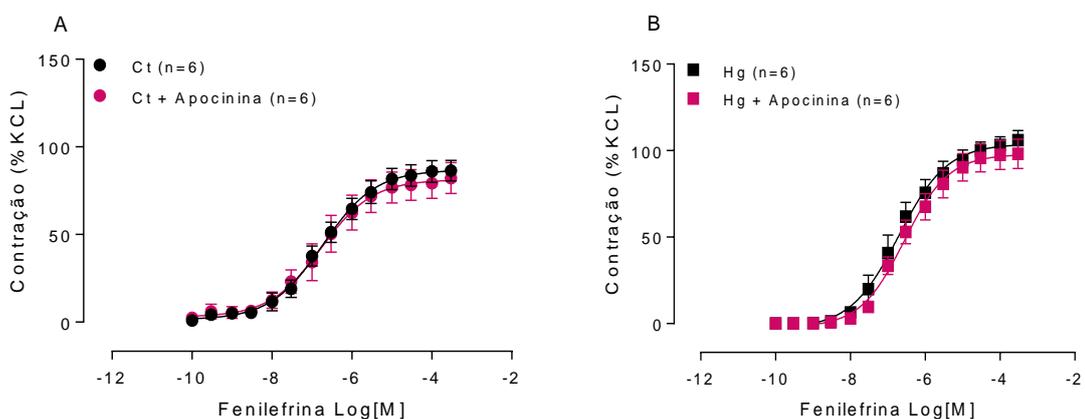
**Figura 8.** Efeito do mimético da superóxido dismutase, Tempol ( $10\mu\text{M}$ ) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \* $P < 0,05$  vs Hg.

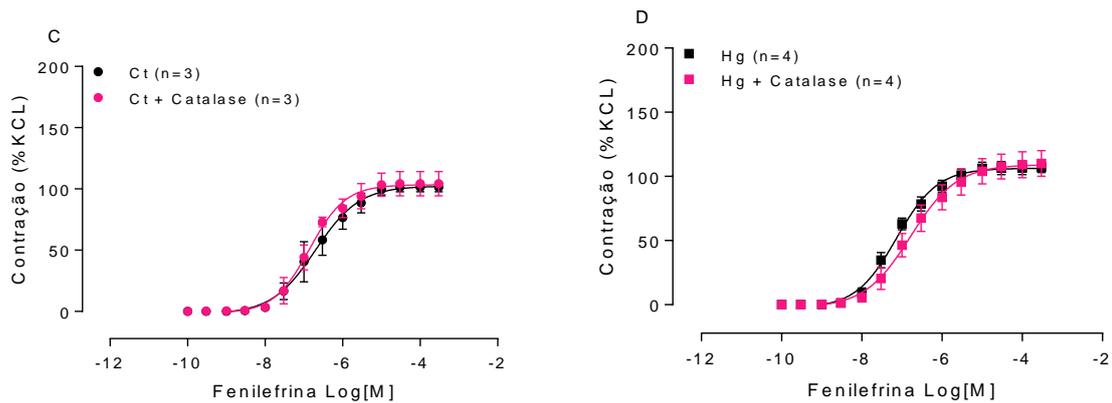
Corroborando com esses achados, ao realizar a análise de Western Blotting, observamos redução na expressão proteica da SOD-Cu/Zn em ratas expostas ao cloreto de mercúrio, entretanto não houve tal alteração proteica quando avaliamos a SOD-Mn (Figura 9).



**Figura 9.** Análise densitométrica do Western Blotting para expressão das proteínas SOD-Cu/Zn (A) e SOD-Mn (B) em aorta de ratos dos grupos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Blots representativos também são mostrados. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct.

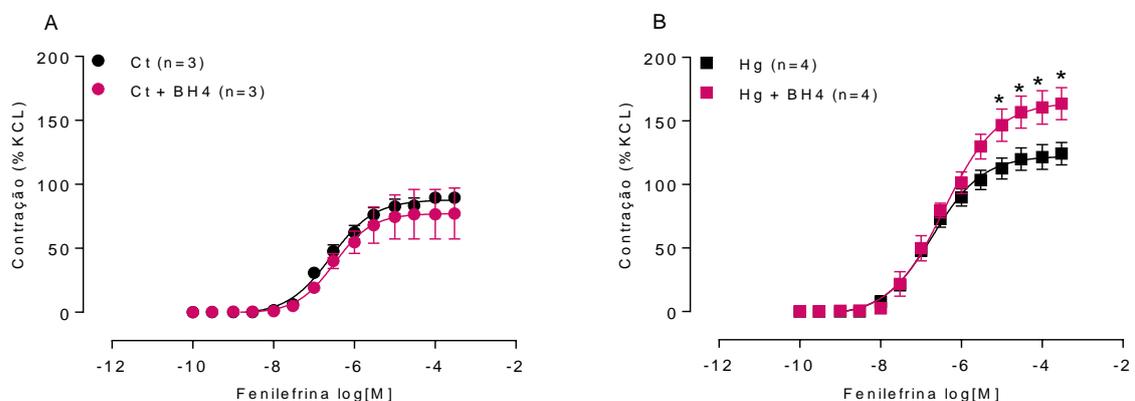
Espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas por diversas enzimas. Investigamos a NADPH oxidase, visto que esta é uma das principais fontes geradoras de ânion superóxido a nível vascular (DRUMMOND et al., 2011; TOUYZ e BRIONES, 2011; HERNANZ et al., 2014). Curiosamente, a incubação com Apocinina (30 $\mu$ M), que nesta concentração atua como inibidor da enzima NADPH oxidase e com Catalase (1000U/ml), um varredor de peróxido de hidrogênio, não alteraram a reatividade vascular à fenilefrina em ambos os grupos estudados. Juntos, esses resultados indicam que o aumento de EROs observado não ocorre através da NADPH oxidase nem pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio, sendo outra via produtora de EROs (Figura 10).





**Figura 10:** Efeito do inibidor da NADPH oxidase, Apocinina (30µM) e do “varredor” enzimático de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Catalase (1000U/mL) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) P>0,05.

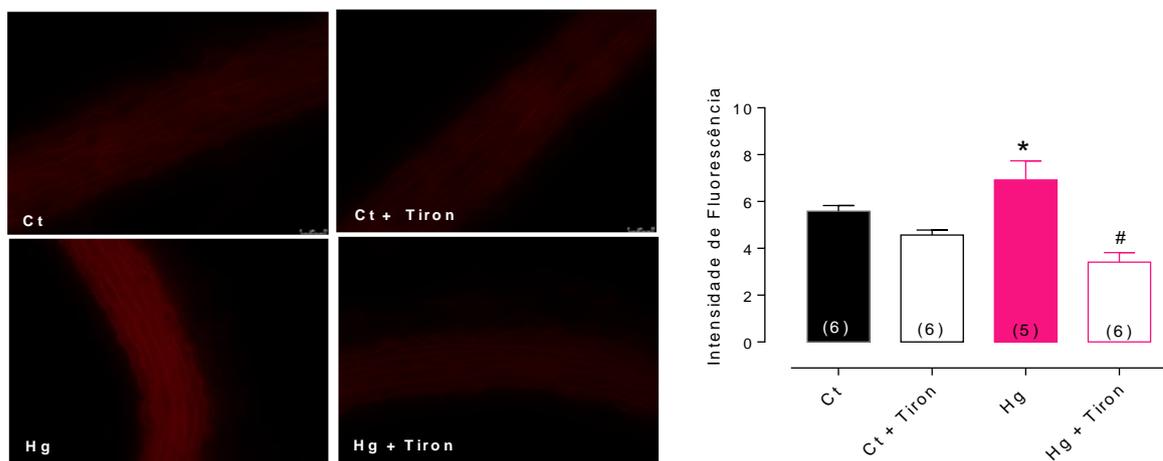
Para identificar a fonte de produção de EROs nas fêmeas, incubamos os anéis aórticos com o cofator da eNOS, BH<sub>4</sub>, esse cofator é essencial para a síntese de NO. Em condições de doença, BH<sub>4</sub> pode ser oxidado em BH<sub>2</sub> que é biologicamente inativo e isso, por sua vez, pode levar a um aumento na produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em vez de NO, como consequência do desacoplamento da eNOS (WERNER et al., 2003; COUTO et al., 2018; NUNES et al., 2018). A incubação com a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), induziu aumento na resposta vasoconstritora à fenilefrina apenas em anéis de ratos expostas ao mercúrio, sugerindo que a eNOS estava desempenhando um papel na condição de desacoplamento, aumentando a produção de ânion superóxido (Figura 11).



**Figura 11:** Efeito da tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (1mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de

animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \* $P < 0,05$  vs Hg.

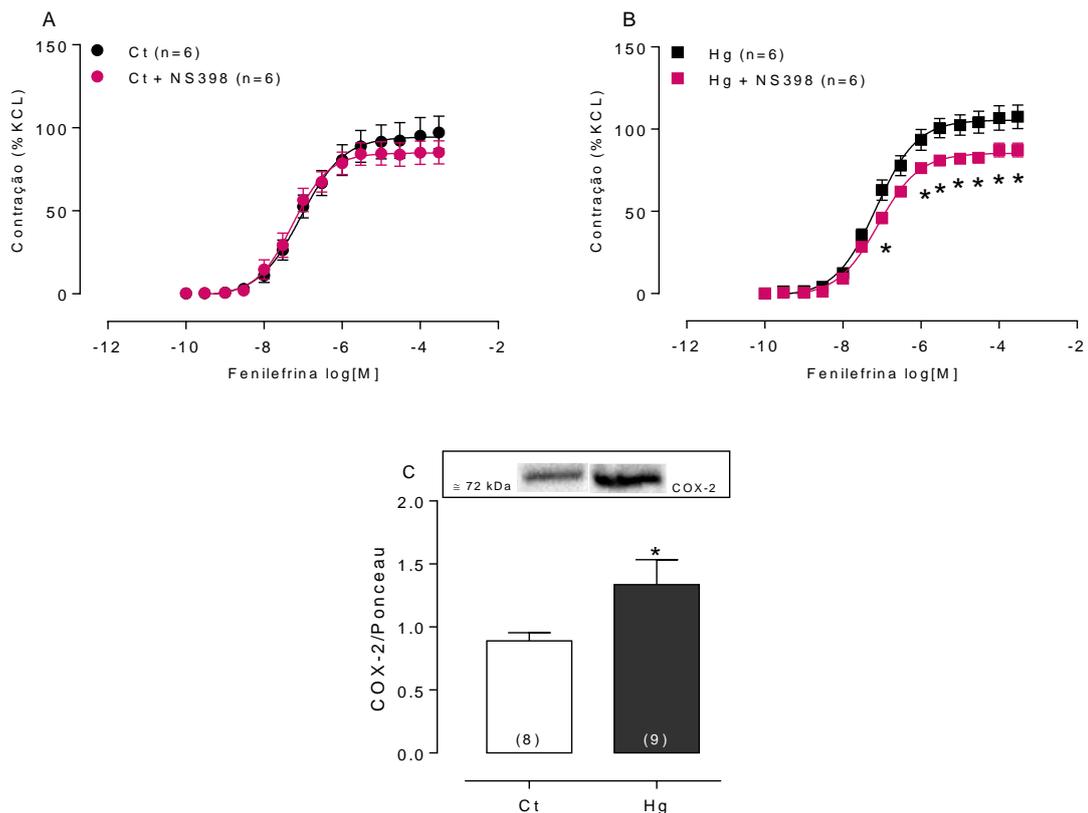
Com o objetivo de confirmar o aumento na produção de ânion superóxido pela exposição ao mercúrio observada nos dados funcionais, foi realizada a técnica de detecção *in situ* de  $O_2^{\cdot-}$  por meio de fluorescência oxidativa ao dihidroetídio - DHE. A Figura 12 demonstra que segmentos de aorta de ratas expostas ao mercúrio apresentaram maior fluorescência quando incubadas com DHE e a mesma foi reduzida quando incubado Tiron – varredor de ânion superóxido, usado como controle negativo.



**Figura 12.** Detecção *“in situ”* da produção de ânion superóxido em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência representando secções transversais de aorta torácica na presença de DHE de animais do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). A especificidade do método foi avaliada pela incubação das aortas com o Tiron (1mM). Gráfico de barras demonstrando a análise semi-quantitativa. Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM da densidade de fluorescência. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. \* $P < 0,05$  vs Ct e # $P < 0,05$  vs Hg.

#### 4.8 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE OS PROSTANÓIDES DERIVADOS DA VIA DA CICLOOXIGENASE NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Sabendo que os produtos derivados da ciclooxygenase modulam os efeitos vasodilatadores e vasoconstritores e que estudos têm demonstrado aumento da expressão de COX e prostanóides derivados dessa via em machos expostos ao HgCl<sub>2</sub> (PEÇANHA, et al., 2010; WIGGERS, et al., 2016; RIZZETTI, et al., 2017), examinamos se a exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub> influencia a via da ciclooxygenase na resposta contrátil à fenilefrina em ratas. Para isso, segmentos de aorta foram incubados com o inibidor seletivo da COX-2, NS398 (1mM). A reatividade vascular no grupo Mercúrio foi reduzida na presença deste fármaco, indicando maior participação dos prostanóides derivados da COX-2 (Figura 13 A, B). Confirmando nossos dados funcionais, a maior participação da COX-2 observada na reatividade vascular foi acompanhada por um aumento na expressão da proteína da COX-2 no grupo Mercúrio (Figura 13 C).



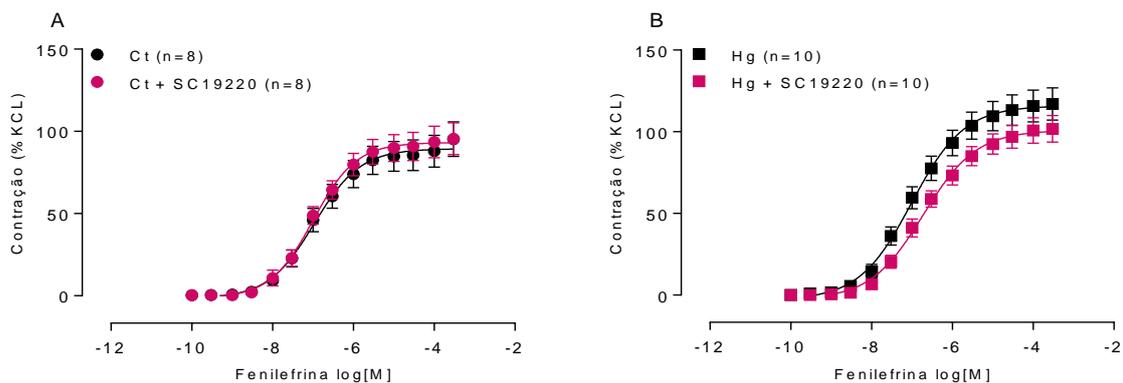
**Figura 13.** Efeito do inibidor seletivo da COX-2, NS398 (1mM) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta torácica do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \* $P < 0,05$  vs Hg. Em C análise densitométrica do Western Blotting para expressão da proteína COX-2 em aorta de ratas dos grupos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Blots representativos também são

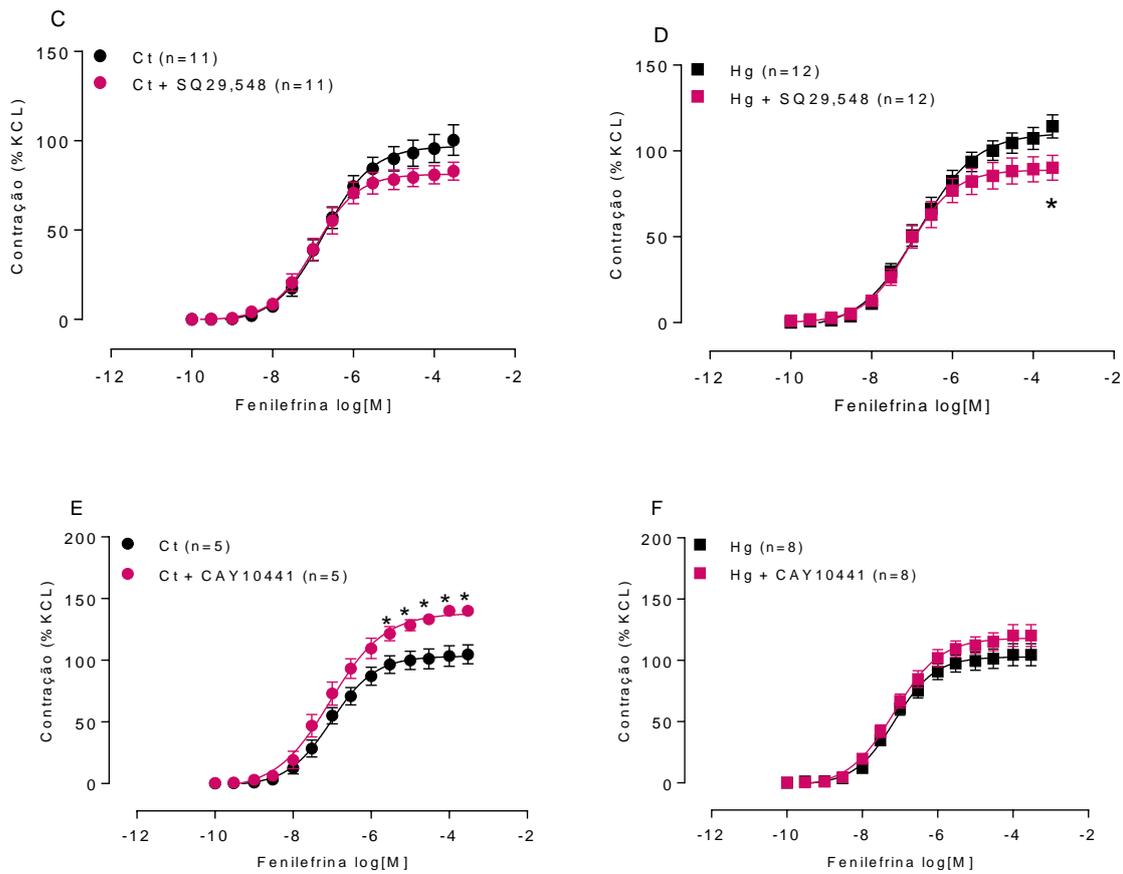
mostrados. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. \**P*<0,05 vs Ct.

Frente a esse resultado indicando maior participação da COX-2, analisamos quais prostanóides derivados desta via estariam envolvidos na resposta encontrada. Incubamos os anéis de aorta com o antagonista do receptor EP1 (PGE2) – SC-19220 (10 $\mu$ M), antagonista do receptor TP (TXA2) – SQ 29,548 (1 $\mu$ M) e o antagonista do receptor IP (PGI<sub>2</sub>) o CAY10441 (100nM). Ao analisarmos os resultados, podemos observar que a incubação com o antagonista de receptor de PGE2 não alterou a reatividade vascular em ambos os grupos, indicando que esse prostanóide não participa das alterações de reatividade encontradas anteriormente (Figura 14 A e B).

Ao incubar o antagonista do receptor TP, observamos redução da reatividade no grupo exposto ao mercúrio (Figura 14 C e D), sugerindo que o tromboxano A<sub>2</sub>, potente prostanóide vasoconstritor, possui papel importante no aumento da reatividade vascular em aorta de ratas expostas ao mercúrio.

Já quando foi adicionado o antagonista do receptor IP, a presença deste fármaco levou ao aumento da resposta contrátil à fenilefrina de aorta de ratas do grupo Controle, mas não do grupo exposto (Figura 14 E e F), sugerindo menor participação da prostaciclina no grupo Mercúrio.



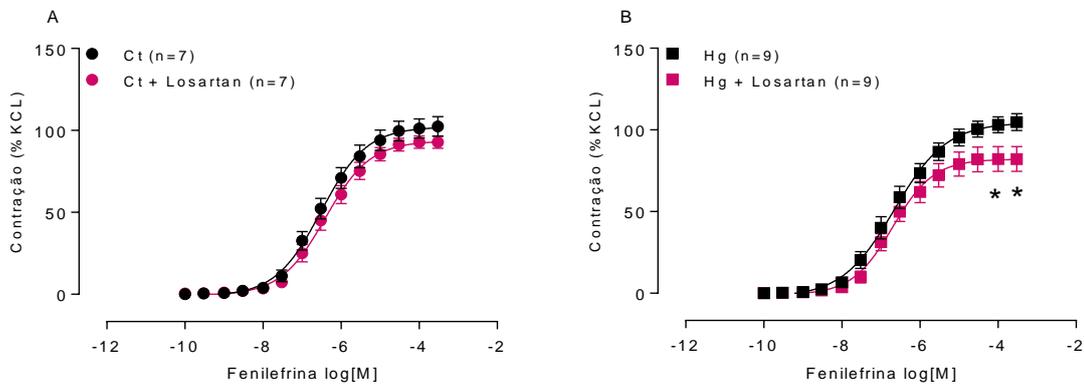


**Figura 14.** Efeito do SC-19220 (10 $\mu$ M) (A e B), SQ 29,548 (1 $\mu$ M) (C e D) e CAY10441 (100nM) (E e F) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos Controle e Mercúrio. Resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \* $P$ <0,05 vs Ct/Hg.

#### 4.9 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Sabendo que o SRA pode se tornar um grande produtor de espécies reativas de oxigênio através da modulação da COX-2 (expressão e atividade), produção de EROs e diretamente no vaso via receptores da angiotensina II (ALVAREZ et al., 2007; CHUNG et al., 2010; MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013), podendo estimular um processo inflamatório e levar a disfunção vascular, fomos investigar se existe participação deste sistema nos resultados encontrados até o momento. Para isso, os anéis de aorta foram incubados com Losartan, bloqueador de receptor AT1 (10 $\mu$ M).

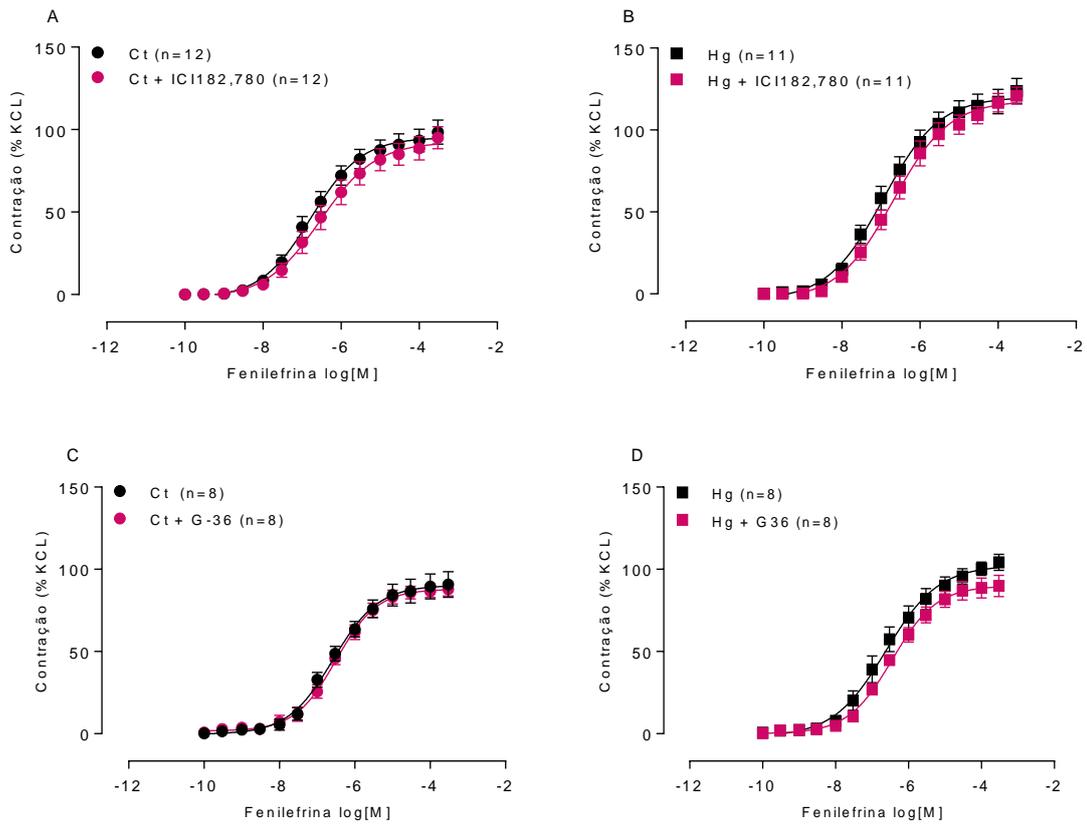
Esse fármaco foi capaz de reduzir a reatividade vascular do grupo exposto ao mercúrio, indicando que o Hg leva a maior ativação do sistema renina-angiotensina (Figura 15).



**Figura 15.** Efeito do antagonista de receptor AT<sub>1</sub> - Losartan (10mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) seguida de pós-teste de Bonferroni \**P*<0,05 vs Hg.

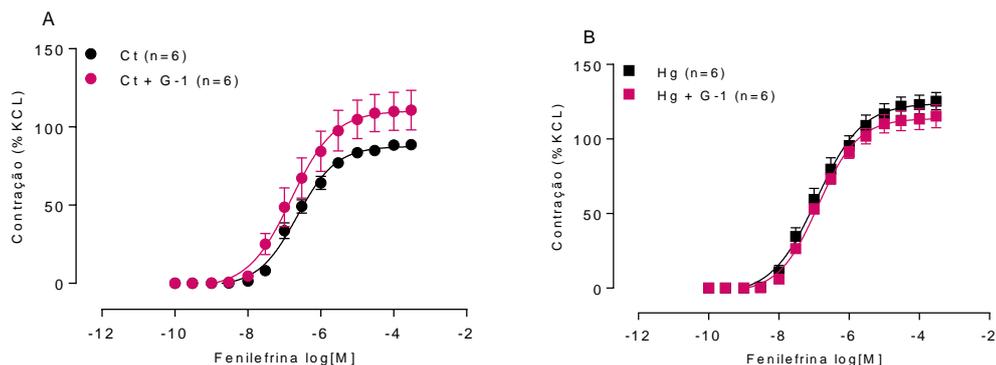
#### 4.10 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE OS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Com o intuito de avaliar a participação dos receptores de estrogênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina mediada pela exposição ao mercúrio, segmentos de aorta foram pré-incubados com o ICI182,780 (1μM), que nesta concentração atua como antagonista dos receptores de estrogênio ERα e ERβ e também com o antagonista do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER), G-36 (1μM), a fim de avaliar os efeitos genômicos e não-genômicos, respectivamente. Podemos observar que a inibição desses receptores não foi capaz de alterar a resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos (Figura 15).



**Figura 16.** Efeito do antagonista do receptor  $ER\alpha$  e  $ER\beta$  de estrogênio ICI 182,780 - 1 $\mu$ M (A e B) e antagonista do receptor GPER, G-36 - 1 $\mu$ M (C e D) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias)  $P > 0,05$ .

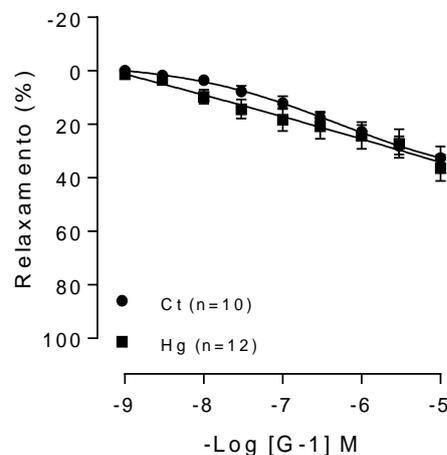
Avaliamos também a resposta vasoconstritora à fenilefrina na presença do agonista seletivo do receptor GPER, G-1 (10 $\mu$ M). Como observado na Figura 17 a ativação desses receptores não alterou a reatividade vascular à fenilefrina nos grupos Controle e Mercúrio.



**Figura 17:** Efeito do agonista do receptor GPER, G-1 (10 $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Resultados (média  $\pm$  EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias)  $P>0,05$ .

#### 4.11 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE OS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO NA RESPOSTA VASODILATADORA AO G-1

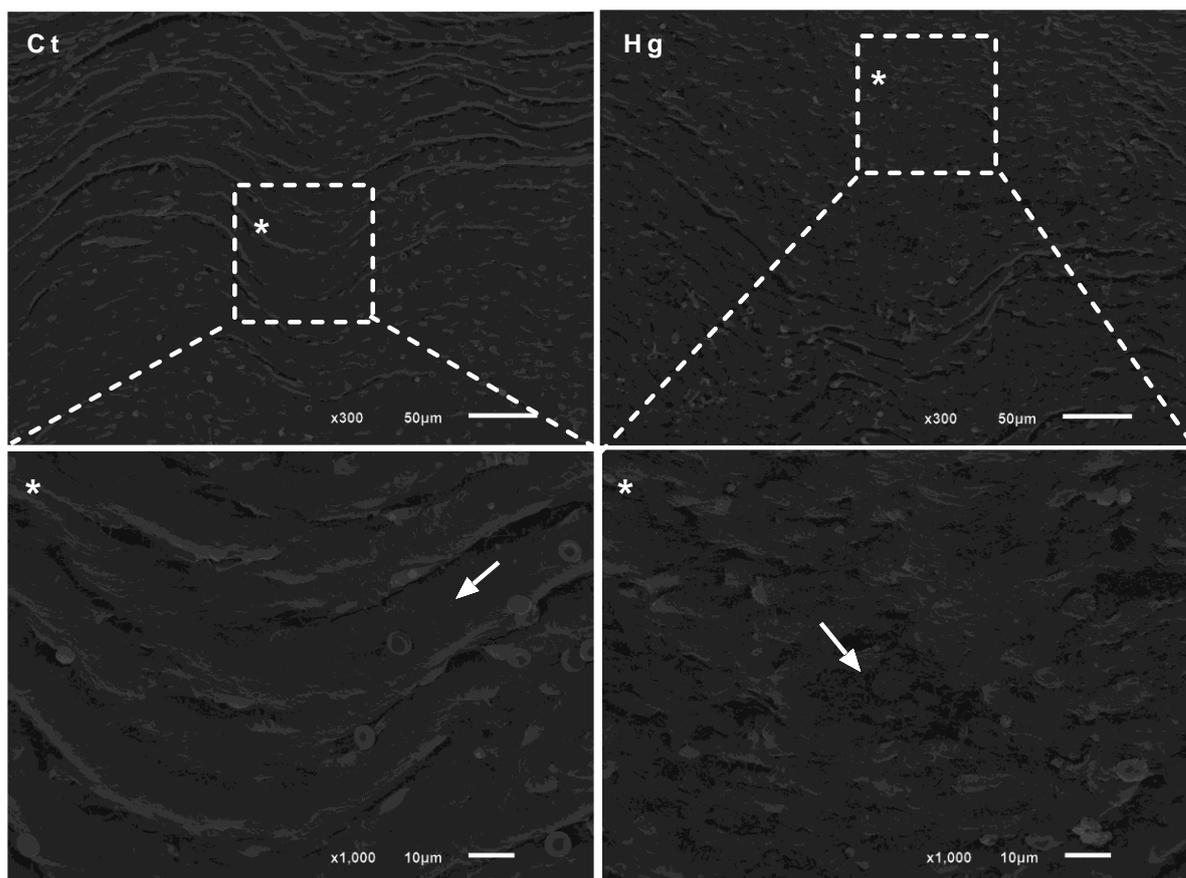
Sabendo que o estrogênio exerce proteção sobre o sistema cardiovascular principalmente através de efeitos vasodilatadores (CASTARDO-DE-PAULA et al., 2017), foram realizadas curvas de relaxamento induzido pelo agonista do GPER (G-1) em segmentos de aorta de ratas, com o intuito de avaliar se a exposição ao mercúrio altera o relaxamento mediado pela estimulação deste receptor de estrogênio. Como observado na Figura 18, não houve alteração do relaxamento induzido por G-1 nos grupos estudados.



**Figura 18:** Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER, G-1 (1nM – 10 $\mu$ M) em aorta torácica de ratas do grupo Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias)  $P>0,05$ .

#### 4.12 ANÁLISE DA ARQUITETURA ENDOTELIAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O músculo liso vascular (MLV) não foi afetado pela exposição ao  $\text{HgCl}_2$  como observado na Figura 3B pela curva de concentração-resposta ao NPS. Portanto, o dano estrutural da superfície endotelial foi testado por microscopia eletrônica de varredura para ir mais longe no entendimento da disfunção endotelial observada na reatividade vascular. Imagens aórticas torácicas de fêmeas do grupo Controle mostram uma superfície escamosa normal com uma camada celular endotelial confluyente. Em contraste, o grupo Mercúrio exibe um dano endotelial da superfície estrutural com evidente irregularidade na superfície endotelial e perda da estrutura normal (Figura 20).



**Figura 19:** Microscopia eletrônica de varredura mostrando fotomicrografia representativa da estrutura endotelial de aorta de ratas Controle (Ct) e Mercúrio (Hg). Barra de escala 50µm e 10µm (ampliação de x300 e x1000). Asterisco: superfície endotelial; seta branca: célula endotelial.

## 5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que os efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio em fêmeas são distintos dos observados em machos expostos ao mesmo tratamento. A exposição ao  $\text{HgCl}_2$  aumentou a contratilidade vascular de aorta de ratas por reduzir a produção de NO, visto uma menor atividade da eNOS; aumentar as espécies reativas de oxigênio, como  $\text{O}_2^{\cdot-}$  devido ao desacoplamento da eNOS levando a um aumento do estresse oxidativo. Além disso, há uma maior participação da via da COX-2, com aumento do envolvimento de prostanóide vasoconstritor (TXA2) e menor influência de prostanóide vasodilatador (PGI2); e maior participação do SRA pela estimulação de receptores  $\text{AT}_1$  nos animais expostos. Mediante essas alterações foi observado danos estruturais no endotélio vascular. Ademais, ao investigar a participação do estrogênio e seus receptores nas alterações vasculares promovidas pelo  $\text{HgCl}_2$ , nossos resultados mostraram que o mercúrio não afeta esta via neste modelo de exposição crônica. A pressão arterial sistólica, os parâmetros ponderais relacionados ao peso corporal das ratas, peso do útero e ovários e a dosagem de estrogênio, não foram diferentes entre os grupos após a exposição ao mercúrio.

As doenças cardiovasculares representam um fator de risco de grande importância na saúde pública, pois resultam em alta taxa de mortalidade. No Brasil as DCV's são responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos (MANSUR & FAVARATO, 2012) e estudos revelam que essas doenças são menos pronunciadas em mulheres em idade reprodutiva do que em homens com a mesma faixa etária (BOOTH et al., 2008), indicando a presença de efeito cardioprotetor dos hormônios sexuais femininos.

O mercúrio é conhecido como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em humanos, como a hipertensão arterial, por ser um dos poluentes atmosféricos mais nocivos à saúde (VIRTANEN et al., 2005). Atualmente, muitos estudos investigam a toxicidade do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular de ratos e sua associação com doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose, infarto do miocárdio, doença coronariana, entre outras (VASSALLO et al., 1999, MOREIRA et al., 2003; VIRTANEN et al., 2005). Porém, raros são os estudos que avaliam os efeitos deste metal em fêmeas. Assim, utilizamos o mesmo modelo de exposição ao mercúrio que Wiggers et al., (2008) utilizou em seus estudos com

machos, o qual leva a uma concentração de aproximadamente 29nM de mercúrio no sangue dos animais tratados, a fim de atingir a mesma concentração. Ao avaliar a PAS de ratas por meio de pletismografia de cauda, durante 4 semanas de exposição ao HgCl<sub>2</sub>, vimos que não houve diferença na PAS entre os grupos Controle e Mercúrio. Wiggers et al., (2008) e Peçanha et al., (2010), em suas pesquisas com machos expostos a concentração igual a usada neste estudo, também não evidenciaram alterações na PAS. Entretanto, estudo recente de Rizzetti et al., (2017) ao avaliar a PAS de ratos expostos ao HgCl<sub>2</sub>, na mesma concentração de Wiggers et al. (2008), por 60 dias observou aumento da pressão arterial, evidenciando que os efeitos deste metal variam de acordo com o tempo de exposição.

Ao analisar o ganho de peso semanal dos animais, o resultado foi semelhante entre os grupos Controle e Mercúrio. Estudos sugerem que essas alterações sejam concentração dependentes, pois ratos expostos cronicamente a altas concentrações de cloreto de mercúrio via oral (8000ug/kg/dia e 33.6mg/Kg/dia) apresentaram redução do peso corporal (WILDEMANN et al., 2015; LIU et al., 2016) enquanto ratos submetidos a doses menores de HgCl<sub>2</sub> (8ng/mL), mesma concentração usada no presente estudo, não tiveram alteração no peso corpóreo (WIGGERS et al., 2008; RIZZETTI et al., 2018).

Vários estudos demonstram que o sistema reprodutor feminino é alvo dos efeitos do mercúrio, induzindo alterações no ciclo estral e na fertilidade (DAVIS et al., 2001; KHAN et al., 2004; MERLO et al., 2019). Desta forma, avaliamos os pesos de útero e de ovários e o nível de estrogênio plasmático, entretanto estes não foram diferentes entre os grupos estudados. Estudo de Khan et al., (2004) demonstra que ratas expostas a altas concentrações de HgCl<sub>2</sub> (0,50mg/kg/dia) na água de beber, apresentaram redução do peso ovariano. Estudo de Agusa, et al., (2007) demonstra que ao analisar o sangue de mulheres observou-se uma correlação positiva entre a concentração sanguínea de Hg e de estradiol. Sugerimos então que essas alterações são concentração dependente sendo observadas apenas em exposições a altas concentrações de HgCl<sub>2</sub>.

A exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub> não foi capaz de alterar a capacidade contrátil do músculo liso vascular medida pela resposta ao KCl (75mM), entretanto induziu a aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina nos segmentos de aorta de fêmeas. Efeito semelhante, porém, em maior amplitude foi observado em estudos de Wiggers, et al., (2008); Peçanha et al., (2010) e Rizzetti, et al., (2018) em machos expostos a

mesma concentração de mercúrio. Ao avaliar o relaxamento dependente e independente do endotélio, com incubação de ACh e NPS respectivamente, observou-se relaxamento semelhante nos dois grupos, não apresentando prejuízo do relaxamento vascular na exposição ao metal, corroborando resultados de Faria et al., (2014). Entretanto, estudos com o mesmo modelo de tratamento em machos, demonstram que estes apresentam menor relaxamento induzido pela ACh, indicando que em machos a lesão endotelial é mais severa quando comparado a fêmeas expostas ao HgCl<sub>2</sub> (WIGGERS et al., 2008; BOTELHO et al., 2019).

Diante da alteração vascular observada na reatividade a fenilefrina e estudos que demonstram que um denominador comum no desenvolvimento de doenças cardiovasculares é a disfunção endotelial (BONETTI et al., 2003; WIDLANSKY et al., 2003; SEALS et al., 2011; OMANWAR et al., 2015), investigamos possíveis mecanismos envolvidos. Sabendo que a redução da biodisponibilidade do NO decorrente da sua produção reduzida ou do aumento da degradação por EROs marca o início da disfunção endotelial, uma vez que o NO é o principal regulador do tônus vascular e da homeostase (DRÖGE, 2002; FÖRSTERMANN e MÜNZEL, 2006; INCALZA et al., 2018), investigamos o endotélio. Este, é importante na modulação do tônus vascular, através da liberação de produtos vasoconstritores e vasodilatadores. Para isso, foram desenvolvidos experimentos com anéis de aorta onde o endotélio foi removido mecanicamente e isto acarretou em aumento da reatividade vascular em ambos os grupos estudados, porém, esse aumento teve uma menor magnitude no grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, sugerindo que este metal provoca disfunção endotelial através da alteração na produção de fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio nessas ratas. Resultados semelhantes foram observados em machos expostos a mesma concentração de mercúrio (WIGGERS et al., 2008; PEÇANHA et al., 2010; RIZZETTI et al., 2017).

Seguindo com a análise dos fatores vasoativos envolvidos no aumento da reatividade e nas lesões induzidas pelo HgCl<sub>2</sub>, investigamos o óxido nítrico, reconhecido como o mais importante fator vasodilatador derivado do endotélio (FÖRSTERMANN e MÜNZEL, 2006). Sua participação foi avaliada em anéis de aorta na presença do L-NAME e este foi capaz de induzir aumento da resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos. Quando avaliada a dAAC, observamos menor magnitude de efeito dessa resposta no grupo exposto ao mercúrio, demonstrando que neste grupo existe redução na produção do óxido nítrico. Resultados semelhantes

foram encontrados por Furieri et al., (2011) em coronária e por Wiggers et al., (2008) em aorta de machos expostos ao HgCl<sub>2</sub>. Corroborando nossos dados funcionais, a análise *in situ* de óxido nítrico no grupo mercúrio apresentou fluorescência reduzida quando comparado ao grupo Controle. Avaliamos também, nas aortas dos animais, o conteúdo proteico da eNOS e da peNOS através da técnica de Western Blotting. Os resultados demonstram que a expressão da proteína eNOS não foi alterada nos grupos estudados, no entanto, a expressão da peNOS e da relação eNOS/peNOS foi reduzida no grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, sugerindo que esta enzima está com sua atividade reduzida, o que sugere uma menor produção de NO, condizente com nossos achados funcionais.

Outra causa da disfunção endotelial é a produção de espécies reativas de oxigênio pelo endotélio (WOLF & BAYNES, 2007). Sabe-se que essas EROs têm grande participação no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, agindo através da modulação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras e da degradação metabólica do óxido nítrico (DOWELL et al., 1999; DOHI et al., 1996). As principais vias responsáveis pela geração vascular de EROs incluem a NADPH oxidase, xantina oxidase, eNOS desacoplada e liberação de EROs induzida por EROs, onde o aumento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> é convertido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e isso pode estimular a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, iniciando um ciclo de autopromoção (WESELER e BAST, 2010; ZINKEVICH e GUTTERMAN, 2011; SCHRAMM, et al., 2012). Nesse sentido, incubamos os anéis de aorta com o mimético da SOD – Tempol, por esta ser uma importante enzima antioxidante capaz de dismutar rapidamente radicais superóxido a peróxido de hidrogênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A presença do Tempol foi capaz de reduzir a resposta contrátil no grupo Hg, sem alterá-la no grupo Ct, sugerindo aumento da produção de ânion superóxido neste modelo de exposição. Este resultado foi confirmado pela quantificação *in situ* de O<sub>2</sub><sup>-</sup> que apresentou aumento da fluorescência ao DHE em aorta de ratas expostas ao HgCl<sub>2</sub>. Além disso, ao analisarmos o conteúdo proteico da SOD pelo método de Western Blotting, observamos que a expressão da SOD-Cu/Zn se encontra reduzida em ratas do grupo Mercúrio podendo este ser um dos fatores envolvidos no aumento de espécies reativas encontrado. A SOD-Mn teve sua expressão semelhante entre os grupos estudados.

Diante destes resultados, investigamos quais caminhos poderiam ser responsáveis pelo aumento na produção de EROs encontrado, além da redução de expressão da SOD. Para isso, utilizamos a Apocinina, que nesta concentração é

inibidor da NADPH oxidase, importante fonte de EROs nos vasos (DRUMMOND et al., 2011; TOUYZ e BRIONES, 2011; HERNANZ et al., 2014) e a Catalase, “varredor” enzimático de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), visto que o  $O_2^{\cdot-}$  pode ser facilmente convertido em  $H_2O_2$  via SOD. Porém, nenhuma alteração foi observada na reatividade vascular nos grupos avaliados, indicando que o aumento de radicais livres encontrado em fêmeas não ocorre via NADPH oxidase e que a produção de peróxido de hidrogênio, um radical livre que é capaz de desempenhar tanto função vasodilatadora como vasoconstritora (FÉLÉTOU e VANHOUTTE, 2006), está preservada. Em contrapartida estudos realizados em machos expostos a mesma concentração observaram que em artérias coronárias, artérias cerebrais e aorta de machos expostos ao  $HgCl_2$  houve aumento de  $O_2^{\cdot-}$  produzido via NADPH oxidase contribuindo com a disfunção endotelial (WIGGERS et al., 2008; FURIERI et al., 2011; WIGGERS et al., 2016). Nosso resultado pode ser explicado pelo fato de o estrogênio ter propriedades antioxidantes, diminuindo a expressão da NADPH oxidase (KHALIL, 2013).

A fim de identificar por qual via estaria sendo produzido os radicais livres encontrados anteriormente, e sabendo que a produção de NO está reduzida, investigamos se a eNOS poderia estar desacoplada produzindo assim ânion superóxido (FÖSTERMANN E SESSA, 2012; ZHANG et al., 2018; GEBHART et al., 2019). Para isso avaliamos a reatividade vascular dos anéis de aorta na presença do BH4, um cofator essencial para a atividade da óxido nítrico sintase e produção de NO. Nosso resultado demonstra que a incubação com BH4 induziu aumento na reatividade vascular apenas em aorta de fêmeas expostas ao mercúrio, confirmando nossa hipótese de que a eNOS está exercendo seu papel em modo desacoplado com consequente formação de ânion superóxido. Devemos enfatizar que o BH4 determina a atividade da eNOS e a consequente produção de NO em condições normais, reduzindo a reatividade vascular (KATUSIK, 2001), o que não foi observado em nosso estudo. No entanto, evidência demonstra que o mercúrio é capaz de deslocar o zinco das proteínas como metalotioneínas (DAY et al., 1984). Sabemos que o zinco é um fator que mantém a eNOS em seu estado acoplado (FÖRSTERMANN E MUNZEL, 2006). Portanto, estando a eNOS desacoplada devido ao deslocamento de zinco pelo mercúrio, o BH4 é oxidado em BH2 e não pode funcionar como cofator, reforçando o desacoplamento da eNOS com aumento subsequente na produção de radicais livres, principalmente ânion superóxido, aumentando assim a disfunção endotelial e a

reatividade vascular de ratas expostas ao HgCl<sub>2</sub> (WERNER et al. 2003; NUNES et al. al. 2018).

Quando a produção de EROs excede os mecanismos antioxidantes, um estado de estresse oxidativo é gerado (MASI et al., 2019). O endotélio vascular é extremamente sensível ao estresse oxidativo e esta é a principal causa de disfunção endotelial. A produção excessiva de EROs acompanhada de uma reduzida produção de NO induz a produção de citocinas pró-inflamatórias iniciando um processo apoptótico nas células com consequente denudação endotelial e dando início ao processo de aterosclerose (ROSS, 1973; ROSS, 1999; INCALZA et al., 2018). Ao analisarmos a estrutura endotelial observamos que ratas do grupo Controle apresentavam uma superfície endotelial escamosa normal, enquanto ratas do grupo Mercúrio apresentaram danos na superfície endotelial com evidente perda da estrutura normal. Resultados semelhantes foram observados em estudo de Cordeiro et al., (2019), em fêmeas expostas agudamente ao HgCl<sub>2</sub>.

Além disso um aumento no estresse oxidativo induz a produção de prostanóides vasoconstritores da COX dando origem a um ciclo vicioso associado ao aumento da reatividade vascular e disfunção endotelial em doenças cardiovasculares (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; MILLÁN LONGO et al., 2017; RIZZETTI et al., 2017). Estudos descrevem que os produtos derivados da COX modulam efeitos vasodilatadores e vasoconstritores, e além disso, induz a produção de EROs em situações patológicas como na aterosclerose e hipertensão (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; ANTMAN et al., 2005). Com o intuito de avaliarmos a via da COX-2, visto que esta é a isoforma induzida e se encontra mais relacionada a processos inflamatórios, utilizamos o NS 398, inibidor específico da COX-2. Ao inibir essa via observamos redução significativa da reatividade em ratas expostas ao mercúrio, evidenciando um importante envolvimento da COX-2 no aumento da contratilidade vascular encontrado. Confirmando nossos dados funcionais, essa maior participação da COX-2 na reatividade vascular, foi acompanhada por um aumento na expressão proteica da COX-2 em aorta de ratas do grupo Mercúrio. Em consonância com esses dados, Peçanha et al., (2010) observaram redução da contratilidade vascular à fenilefrina quando foi bloqueado esta via em aorta de machos expostos cronicamente ao HgCl<sub>2</sub>.

Visando investigar quais prostanóides derivados da COX-2 estariam envolvidos, os anéis de aorta foram incubados com SC-19220, antagonista de receptor de

prostaglandina E2 (EP1), SQ 29,598, antagonista seletivo do receptor de tromboxano (TP) ou CAY10441, antagonista do receptor de prostaciclina - PGI<sub>2</sub> (IP). Ao analisar o bloqueio dos receptores EP1, não observamos alteração em ambos os grupos, indicando que estes não participam das respostas encontradas. Já ao investigar o receptor TP, o bloqueio deste reduziu significativamente a resposta contrátil à fenilefrina no grupo mercúrio, enquanto a presença do antagonista de receptor IP, induziu aumento apenas da reatividade vascular no grupo Ct. Esses resultados sugerem maior participação do prostanóide vasoconstritor TXA<sub>2</sub> e menor participação do prostanóide vasodilatador PGI<sub>2</sub> nas alterações promovidas pelo HgCl<sub>2</sub>, contribuindo com o aumento de reatividade vascular observado. Resultados em aorta de machos expostos ao mercúrio, também demonstram uma maior participação da COX-2, entretanto com maior produção dos prostanóides vasoconstritores PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> (PEÇANHA et al., 2010).

Outro mecanismo que pode induzir a formação de EROs é o sistema renina-angiotensina, através da angiotensina II, sendo está também um potente agente vasoconstritor via ativação de receptores AT<sub>1</sub> (MEHTA e GRIENGLING, 2007; DIKALOV et al., 2014). Ao incubarmos os anéis de aorta de fêmeas com Losartan, bloqueador de receptor AT<sub>1</sub>, houve redução da resposta contrátil à fenilefrina apenas em ratas expostas ao Hg, sugerindo maior participação do SRA nas alterações encontradas, resultados semelhantes, foram encontrados em aorta de machos expostos ao mercúrio, porém, em maior magnitude (PEÇANHA, et al., 2010; RIZZETTI, et al., 2013). Provavelmente essa menor magnitude de efeito observada nas fêmeas ocorre pela ação benéfica do estrogênio sobre o SRA alterando o equilíbrio vasoconstritor-vasodilatador, tanto através da redução da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), reduzindo assim a produção de angiotensina II e conseqüentemente a vasoconstrição via receptor AT<sub>1</sub>, quanto através do aumento na atividade da ECA-2 induzindo aumento na produção de angiotensina (1-7), produzindo vasodilatação via receptor MAS (BROSNIHAN et al., 1997; GALLAGHER et al., 1999, COSTA-FRAGA et al., 2018).

O estrogênio possui múltiplos efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular em mulheres durante a idade reprodutiva (MARIC-BILKAN & MANIGRASSO, 2012), prevenindo a disfunção endotelial por suas propriedades antioxidantes como regulação da expressão e atividade de enzimas antioxidantes, inibição da expressão da NADPH oxidase, aumentando a produção de PGI<sub>2</sub>, aumento da biodisponibilidade

de NO e reduzindo a produção de substâncias vasoconstritoras como endotelina e angiotensina II (WHITE, 2002; STREHLOW et al., 2003; WAGNER et al., 2001). Marsh et al., (1995), realizaram estudo em humanos que consumiam peixes contaminados com MeHg e observaram a possibilidade de os efeitos do mercúrio serem sexo-dependentes, sugerindo que os hormônios sexuais podem influenciar direta ou indiretamente tal toxicidade. De acordo com Rossi et al., (1997), camundongos machos expostos a baixas doses de metilmercúrio tiveram alterações celulares no cerebelo que só foram observadas em fêmeas quando expostas a altas doses, porém pouco se sabe sobre os efeitos desta exposição em fêmeas.

A fim de investigar possíveis alterações na via do estrogênio causadas pela exposição ao mercúrio, avaliamos a participação dos receptores de estrogênio, alfa (ER $\alpha$ ), beta (ER $\beta$ ) e GPER na reatividade vascular à fenilefrina. Incubamos o ICI 182.780, antagonista de ER $\alpha$ /ER $\beta$  e o G-36, antagonista de GPER. Não observamos alteração na reatividade vascular à fenilefrina tanto no grupo Controle, quanto Mercúrio, indicando que esses receptores não estão envolvidos nas alterações encontradas na reatividade vascular. Em contrapartida, estudo recente do nosso grupo demonstra que a exposição aguda ao mercúrio induziu prejuízo na ativação dos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  reduzindo a produção de NO (CORDEIRO et al., 2019), o que não se observa com 30 dias de tratamento. Ou seja, podemos sugerir que após 4 semanas de exposição ao mercúrio, talvez haja mecanismos de compensação que restaurem as alterações na via estrogênica observadas na exposição aguda ao metal.

Em continuação a investigação dos receptores de estrogênio, avaliamos através da ativação do receptor de estrogênio acoplados a proteína G (GPER) pelo G-1 (agonista de GPER) se o mercúrio poderia estar alterando os mecanismos vasorelaxantes da via do estrogênio, e não observamos diferença entre os grupos estudados.

Em conclusão, os resultados demonstrados aqui nos permitem afirmar, pela primeira vez, que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio foi capaz de induzir disfunção vascular, sem alterar a pressão arterial de ratas. Essa disfunção vascular ocorre principalmente pelo desacoplamento da eNOS, resultando em diminuição da produção de óxido nítrico e aumento da produção de ânion superóxido, maior ativação da via da COX-2 com aumento na participação do prostanóide vasoconstritor TXA2 e redução do prostanóide vasodilatador PGI2, maior participação do SRA sem, no entanto, promover alterações na via estrogênica. Assim, esses achados oferecem

evidências de que a exposição ao cloreto de mercúrio implica em disfunção vascular de aorta de ratas, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e ajudando a esclarecer os mecanismos pelos quais esse metal atua no sistema vascular de ratas.

## 6 REFERÊNCIAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR (2019) Substance Priority List. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl>.
- AGUSA, T., et al. Mercury in Hair and Blood from Residents of Phnom Penh (Cambodia) and Possible Effect on Serum Hormone Levels. **Chemosphere**. v.68, n.3, p.590-6, 2007.
- AIRES, M.M. Fisiologia. 3 ed. Brasil: Guanabara Koogan, 2008.
- AKARASEREENONT, P., TECHATRAISAK, K., THAWORN, A., CHOTEWUTTAKORN S. The induction of cyclooxygenase-2 by 17beta-estradiol in endothelial cells is mediated through protein kinase C. **Inflamm Res**. v.49, p.460-5, 2000.
- ALVAREZ, Y. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **J Hypertens**. v.23, n.4, p.767–777, 2005.
- ALVAREZ, Y. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther**. v.321, p.381-388, 2007.
- American Heart Association Scientific Statement. Evidence-Based Guidelines for Cardiovascular Disease Prevention in Women. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v.24, p.29-50, 2004.
- ANDREW, P.J., MAYER, B. Enzymatic Function of Nitric Oxide Synthases. **Cardiovasc Res**. v.43, n.3, p.521-31, 1999.
- ANGELI, J.K. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009. 139f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.
- ANTMAN, E.M., DEMETS, D., LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**. v.112, p.759-770, 2005.
- ASANO, S., et al. Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. **Pathol Int**. v.50, n.3, p.169-74, 2000.

AZEVEDO B.F., et al. Chronic Mercury exposure at different concentrations produces opposed vascular responses in rat aorta. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.43, p.712-19, 2016.

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

BECKER, C.G., BECKER, E.L., MAHER, J.F., SCHREINER, G.E. Nephrotic Syndrome After Contact With Mercury. A Report of Five Cases, Three After the Use of Ammoniated Mercury Ointment. **Arch Intern Med**. v.110, p.178-86, 1962.

BENZECRY, R.N. The increase of levels of heavy metals in the rivers and the soil of Minas Gerais and Espírito Santo, after the Mariana accident: Their effects and consequences. 2018.

BHALLA, R.C., et al. Estrogen reduces proliferation and agonist-induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells. **Am J Physiol**. v.272, n.(4 Pt 2), p.1996-2003, 1997.

BHAN, A., SARKAR, N.N. Mercury in the Environment: Effect on Health and Reproduction. **Rev Environ Health**. v.20, n.1, p.39-56, 2005.

BONETTI, P.O., LERMAN, L.O., LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.23, n.2, p.168-75, 2003.

BOOTH, E.A., et al. Estrogen protects the heart from ischemia-reperfusion injury via COX-2-derived PGI<sub>2</sub>. **J Cardiovasc Pharmacol**. v.52 n.3 p.228-235, 2008.

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

BRIONES, A.M., TOUYZ, R.M. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. **Curr Hypertens Rep**. v.12, p.135–142, 2010.

BROSNIHAN, K.B., LI, P., GANTEN, D., FERRARIO, C.M. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. **Am J Physiol**. v.273, n.6, p.1908-15, 1997.

CARMIGNANI, M., et al. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats. **British Journal of Industrial Medicine**. v.49, p.226–232, 1992.

CASTARDO-DE-PAULA, J.C., et al. Cardiovascular risk and the effect of nitric oxide synthase inhibition in female rats: The role of estrogen. **Exp Gerontol**. v.15, n.97, p.38-48, 2017.

CHUNG, I.M., et al. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II type I receptor pathway. **Atherosclerosis**. v.213, n.1, p.109-14, 2010.

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

CLARKSON, T.W., MAGOS, L. The toxicology of Mercury and its chemical compounds. **Crit Ver Toxicol**. v.36, n.8, p.609-62, 2006.

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

COSTA-FRAGA, F.P., et al. Age-related changes in vascular responses to angiotensin (1-7) in female mice. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**. v.19, n.3, 2018.

COUTO, G.K., et al. Exercise training induces eNOs coupling and restores relaxation in coronary arteries of heart failure rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.314, n.4, p.H878-887, 2018.

DA CUNHA, G.K., et al. Thimerosal-containing vaccines and deficit in child development: population-based study in Southern Brazil. **Vaccine**. v.38, n.9, p.2216-2220, 2020.

DALLE LUCCA J.J., ADEAGBO A.S.O., ALSIP N.L. Influence of oestrous cycle and pregnancy on the reactivity of the rat mesenteric vascular bed. **Human Reproduction**. v.15, n.4, p.961-968, 2000.

DASH H.R., DAS S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. **Int Biodeterior Biodegrad**. v.75, p.207–213, 2012.

DAVIS, B.J., et al. Mercury vapor and female reproductive toxicity. **Toxicol Sci**. v.59, n.2, p.291-6, 2001.

DAY, F.A., FUNK, A.E., BRADY, F.O. In vivo and ex vivo displacement of zinc metallothionein by cadmium and by mercury. **Chem Biol Interact.** v.50, n.2, p.159-74, 1984.

DE OLIVEIRA, W.K., ROHLFS, D.B., GARCIA, L.P. The Brumadinho disaster and work of the Health Surveillance servisse. **Epidemiol Serv Saúde.** v,28, n.1, 2019.

DESCHAMPS, A.M., MURPHY, E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. **Am j Physiol Heart Circ Physiol.** v.297, n.5, p.H1806-13, 2009.

DIKALOV, S.I., et al. Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II – mediated endothelial oxidative stress and hypertension. **Antioxid Redox Signal.** v.20, n.2, p.281-94, 2014.

DOHI, Y., KOJIMA, M., SATO, K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. **Hypertension.** v.28, n.5, p.732-7, 1996.

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

DOWELL, F.J., et al. Decreased basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old strokeprone spontaneously hypertensive rat. **Eur J Pharmacol.** v.379 p.175-182, 1999.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** v.82, n.1, p.47-95, 2002.

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

EGAN, K.M., et al. COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. **Science.** v.306, n.5703, p.1954-7, 2004.

EHARA S., et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. **Circulation.** v.103, p.1955–1960, 2001.

FARIA T de O. Efeitos cardiovasculares da associação entre baixas doses de cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio em ratos. 2014.106f. Tese de Doutorado –

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

FÉLÉTOU, M., VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.26, n.6, p.1215-25, 2006.

FÉLÉTOU, M., HUANG, Y., VANHOUTTE, P.M. Vasoconstrictor prostanoids. **Pflugers Arch.** v.459, n.6, p.941-50, 2010.

FERREIRA, A.J., SANTOS, R.A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Braz J Med Biol Res.** v.38, n.4, p.499-507, 2005.

FILARDO E.J. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. **Molecular endocrinology.** v.14, n.10, p.1649-1660, 2000.

FILLION, M., et al. Neurotoxic sequelae of mercury exposure: an intervention and follow-up study in the Brazilian Amazon. **Ecohealth.** v.8, n.2, p.2010-22, 2011.

FÖRSTERMANN, U., MÜNDEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation.** v.113, n.13, p.1708-14, 2006.

FÖRSTERMANN, U., SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J.** v.33, n.7, p.829-37, 2012.

FRAGA-SILVA, R.A., FERREIRA, A.J., DOS SANTOS, R.A.S. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. **Curr Hypertens Rep.** v.15, n.1, p.31-8, 2013.

FRIQUES, A.G., et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **J Transl Med.** v.13, p.390, 2015.

FURCHGOTT R.F., ZAWADZKI J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** v.288, n.5789, p.373-376, 1980.

FURIERI L.B., et al. Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. **Toxicol Appl Pharmacol.** v.255 n.2 p.193-199, 2011.

GALLAGHER, P.E., et al. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension**. v.33, n.1, p.323-8, 1999.

GALLAGHER, P.E., et al. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension**. v.33, n.(1 Pt 3), p.323-8, 1999.

GASPARO, M., SIRAGY, H.M. The AT<sub>2</sub> Receptor: Fact, Fancy and Fantasy. **Regul Pept**. v.81, n.1-3, p.11-24, 1999.

GEBHART, V., et al. Site and mechanism of uncoupling of nitric-oxide synthase: Uncoupling by monomerization and other misconceptions. **Nitric oxide**. v.89, p.14-21, 2019.

GRIENDLING, K.K., FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**. v.21 n.108(16), p.1912-6, 2003.

HARMAN, S.M. Estrogen replacement in menopausal women: recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPS. **Gend Med**. v.3, p.254–69, 2006.

HAYNES M.P. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase–Akt pathway in human endothelial cells. **Circulation research**. v.87, n.8, p.677-682, 2000.

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

HERON M. Deaths: leading causes for 2010. National vital statistics reports: from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, v.62, n.6, p.1-96, 2013.

HOUSTON M.C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Altern Ther Health Med**. v.13 n.2 p.128-133, 2007.

HOUSTON, M.C. Role of Mercury Toxicity in Hypertension, Cardiovascular Disease, and Stroke. **J Clin Hypertens (Greenwich)**. v.13, n.8, p.621-7, 2011.

HUNYADY, L., CATT, K.J. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. **Mol Endocrinol.** v.20, n.5, p.953-70, 2006.

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

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.

KATUSIK, Z.S. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.281, n.3, p.H981-986, 2001.

KHALIL, R.A. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. **Biochem Pharmacol.** v.86, n.12, p.1627-42, 2013.

KHAN, A.T., et al. Effects of Inorganic Mercury on Reproductive Performance of Mice. **Food Chem Toxicol.** v.42, n.4, p.571-7, 2004.

KOBAL, A.B., et al. Renal Function in Miners Intermittently Exposed to Elemental Mercury Vapour. **Arh Hig Rada Toksikol.** v.51, n.4, p.369-80, 2000.

KURLAND, L.T., FARO, S.N., SIEDLER, H. Minamata Disease. The outbreak of a Neurologic Disorder in Minamata, Japan, and its Relationship to the Ingestion of Seafood Contaminated by Mercuric Compounds. **World Neurol.** v.1, p.370-95, 1960.

KURT, A.H., BUYUKAFSAR, K. Vasoconstriction induced by G1, a G-protein-coupled oestrogen receptor1 (GPER-1) agonist, in the isolated perfused rat kidney. **European journal of pharmacology.** v.702, n.1, p.71-78, 2013.

LASSÈGUE, B., SAN MARTÍN, A., GRIENGLING, K.K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circ Res.** v.11, n.110(10), p.1364-90, 2012.

LI Y., et al. Comparative metalloproteomic approaches for the investigation of proteins involved in the toxicity of inorganic and organic forms of mercury in rice (*Oryza sativa* L.) roots. **Metallomics.** v.8, p.663–671, 2016.

LI, X.C., ZHANG, J., ZHUO, J.L. The Vasoprotective Axes of the Renin-Angiotensin System: Physiological Relevance and Therapeutic Implications in Cardiovascular, Hypertensive and Kidney Diseases. **Pharmacol Res.** v.125, n.Pt A, p.21-38, 2017.

LINDSEY, S.H., et al. Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.305, n.1, p.E113-8, 2013.

LIU, J., et al. Mercury sulfides are much less nephrotoxic than mercury chloride and methylmercury in mice. **Toxicology Letters.** v.262, p.153-160, 2016.

LOBATO, N.S., et al. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** v.21, p.808-816, 2011.

MAGOS L. Physiology and toxicology of mercury. **Met Ions Biol Syst.** v.34, p.321–370, 1997.

MAIA, L.F.O, Avaliação toxicológica e remoção do mercúrio (II) em águas contaminadas e resíduos de mineração da bacia do rio doce usando nanoadsorventes de  $\delta$ -feooH modificado quimicamente. 2019. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni.

MANSUR, A.P., FAVARATO, D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. **Arg Bras Cardiol.** v.99 n.2 p.755-61, 2012.

MARCONDES, F.K., BIANCHI, F.J., TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Brazilian J. Biol.** v.62, n.4A, p.609-14, 2002.

MARIC-BILKAN, C., MANIGRASSO, M.B. Sex differences in hypertension: contribution of the renin–angiotensin system. **Gender medicine.** v.9, n.4, p.287-291, 2012.

MARSH, D.O., et al. Fetal methylmercury study in a Peruvian fish-eating population. **Journal of Neurotoxicology.** v.16 n.4 p.717-26, 1995.

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

MASI, S., ULIANA, M., VIRDIS, A. Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation. **Vascul Pharmacol**. v.115, p.13-17, 2019.

MCGUIRE, J.J., DING, H., TRIGGLE, C.R. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). **Can J Physiol Pharmacol**. v.79, n.6, p.443-470, 2001.

MENDELSON, M.E., KARAS, R.H. HRT and the young at heart. **The New England Journal Medicine**. v.356, p.2639-2641, 2007.

MENDELSON, M.E., KARAS, R.H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **N Engl J Med**. v.340, n.23, p.1801-11, 1999.

MERLO, E., et al. Mercury leads to features of polycystic ovary syndrome in rats. **Toxicology Letters**. v.312, p.45-54, 2019.

MEYER, MR; PROSSNITZ, ER; BARTON, M. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. **Vascular pharmacology**. v.55, n.1-3, p.17-25, 2011.

MICARONI, R.C.C.M., BUENO, M.I.M.S., JARDIM, W.F. Mercury compounds. Review on determination, treatment and disposal methods. **Química Nova**. v.23 n.4 p.487-495, 2000.

MILLÁN LONGO, A., et al. Mercury exposure induces proinflammatory enzymes in vascular fibroblasts. **Clín Investig Arterioscler**. v.29, n.6, p.231–238, 2017.

MONCADA S., PALMER R.M., HIGGS E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**. v.43, n.2, p.109-42, 1991.

MOREIRA C.M., et al. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v.135C, n.3, p.269-75, 2003.

MURPHY, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. **Circ Res**. v.109, p.687-696, 2011.

MUTTER, J., et al. Alzheimer disease: mercury as pathogenic factor and apolipoprotein E as a moderator. **Neuro Endocrinol Lett.** v.25, p.331-339, 2004.

NODE, K., et al. Roles of NO and Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels in coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in ischemic heart failure. **Faseb J.** v.11, p.793–9, 1997.

NUNES, D.O., et al. Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. **Lipids Health Dis.** v.13, p.107, 2014.

NUNES, K.Z., et al. Acute copper overload induces vascular dysfunction in aortic rings due to endothelial oxidative stress and increased nitric oxide production. **J Toxicol Health A.** v.81, n.8, p.218-28, 2018.

OMANWAR S., FAHIM, M. Mercury exposure and endothelial dysfunction: An interplay between nitric oxide and oxidative stress. **Int J Toxicol.** v.34, n.4, p.300-7, 2015.

OMS - Organização Mundial de Saúde. Diretrizes sobre expectativas regulatórias relacionadas à eliminação, redução ou substituição do timerosal em vacinas. Relatório Técnico Série. 926:95-102, 2004.

ORSHAL, J.M., KHALIL, R.A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.** v.286, n.2, p.R233-R249, 2004.

PACHECO-FERREIRA, H. Epidemiologia das Substâncias Químicas. Capítulo 26. In MEDRONHO, R. A. Epidemiologia. 2a. Edição. Atheneu. Rio de Janeiro. 2008. 790p.

PACYNA, E.G., et al. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. **Atmospheric Environment.** v.44, n.20, p.2487–99, 2010.

PAMPHLETT, R., KUM-JEW, S. Mercury vapor uptake into the nervous system of developing mice. **Neurotoxicol Teratol.** v.23, n.2, p.191-196, 2001.

PARAVICINI, T.M., TOUYZ, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care.** v.31, n.Suppl 2, p.S170-180, 2008.

PEÇANHA, F.M. A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) altera a reatividade vascular da aorta de ratos – Papel das espécies reativas de

oxigênio e dos prostanóides da via da ciclooxigenase. 2009. 158f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

PEÇANHA, F.M., et al. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. **J Physiol Pharmacol**. v.61, n.1, p.29-36, 2010.

RADDINO, R., et al. Effects of 17 beta-estradiol on the isolated rabbit heart. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. v.281, p.57–65, 1986.

REEDER, R.J., SCHOONEN, M.A.A., LANZIROTTI, A. Metal Speciation and Its Role in Bioaccessibility and Bioavailability. **Rev Mineral and Geochem**. v.64, p.59–113, 2006.

REVANKAR C.M. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**. v.307, n.5715, p.1625-1630, 2005.

RICE, K.M., et al. Environmental Mercury and its toxic effects. **J Prev Med Public Health**. v.47, n.2, p.74-83, 2014.

RIVERA-MANCÍA, S., et al. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. **Chem Biol Interact**. v.186, n.2, p.184–199, 2010.

RIZZETTI, D.A., TORRES, J.G., ESCOBAR, A.G. Apocynin prevents vascular effects caused by chronic exposure to low concentrations of mercury. **PLoS One**. v.8, n.2, p.e55806, 2013.

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

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

ROSS, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **Am Heart J**. v.138, n.5 p.S419-20, 1999.

ROSS, R., GLOMSET, J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. **Science**. v.180, n.93, p.1332-9, 1973.

- ROSSI, A.D; AHLBOM, E; OGREN, S.O; NICOTERA, P; CECCATELLI, S. Prenatal exposure to methylmercury alters locomotor activity of male but not female rats. **Exp Brain Research**. v.17 n.3 p.428-36, 1997.
- ROWLAND, A.S., et al. The effect of occupational exposure to Mercury vapour on the fertility of female dental assistants. **Occup Environ Med**. v.51, n.1, p.28-34, 1994.
- RUIZ-SANZ, J.L., et al. 17  $\beta$ -estradiol affects in vivo the low density lipoprotein composition, particle, and oxidizability. **Free radical Biology e Medicine**. 2001.
- SADER, M.A., CELERMAJER, D.S. Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. **Cardiovasc Res**. v.53, p.597-604, 2002.
- SALAZAR, G. NADPH oxidases and mitochondria in vascular senescence. **Int J Mol Sci**. v.19, n.5, p.1327, 2018.
- SALONEN, J.T., et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. **Circulation**. v.91, n.3, p.645-655, 1995.
- SANTOS, R.A.S., et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin (1-7) and Mas: New players of the renin-angiotensin system. **J Endocrinol**. v.216, n.2, p.R1-R17, 2013.
- SCHRAMM, A., et al. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. **Vascular Pharmacology**. v.56, n.5-6, p.216–231, 2012.
- SEALS, D.R., JABLONSKI, K.L., DONATO, A.J. Aging and vascular endothelial function in humans. **Clin Sci (Lond)**. v.120, n.9, p.357-75, 2011.
- SHAH, Y.M., et al. Attenuation of Estrogen Receptor Alpha (ER alpha) Signaling by Selenium in Breast Cancer Cells via Downregulation of ER alpha Gene Expression. **Breast Cancer Res Treat**. v.92, n.3, p.239-50, 2005.
- SHENKER, B.J., GUO, T.L., SHAPIRO, I.M. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: Evidence of mitochondrial dysfunction. **Environ Res**. v.77, n.2, p.149-59, 1998.
- SHERMAN T.S., et al. Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v.26, p.610-6, 2002.

SHIMOKAWA, H. Reactive oxygen species in cardiovascular health and disease: special references to nitric oxide, hydrogen peroxide, and Rho-kinase. **J Clin Biochem Nutr.** v.66, n.2, p.83-91, 2020.

SMITH, W.L., GARAVITO, R.M., DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem.** v.271, p.33157–160, 1996.

STREHLOW K., et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circ Res.** v.93 n.2 p.170-7, 2003.

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

TAKEUCHI T., et al. Human brain disturbance by methylmercury poisoning, focusing on the long-term effect on brain weight. **Neurotoxicology.** v.17, p.187-190, 1996.

TANIYAMA, Y., GRIENGLING, K.K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension.** v.42, n.6, p.1075-81, 2003.

TAUEG, C., et al. Acute and chronic poisoning from residential exposures to elemental mercury-Michigan, 1989-1990. **J Toxicol Clin Toxicol.** v.30, n.1, p.63-7, 1992.

TEP-AREENAN, P; KENDALL, D A; RANDALL, M D. Mechanisms of vasorelaxation to 17 $\beta$ -oestradiol in rat arteries. **European journal of pharmacology.** v.476, n.1, p.139-149, 2003.

TOUYZ, R.M., BRIONES, A.M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res.** v.34, n.1, p.5-14, 2011.

TOUYZ, R.M., TABET, F., SCHIFFRIN, E.L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v.30, n.11, p.860- 6, 2003.

United Nations Environment Programme (UNEP). Global Mercury Assessment, 2018. Available from: <https://www.unenvironment.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018>.

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

VALVERDE, M.A., et al. Acute Activation of maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. **Science**. v.285, p.1929-31, 1999.

VANHOUTTE, P.M. Regeneration of the Endothelium in vascular injury. **Cardiovasc Drugs Ther**. v.24, n.4, p.299-303, 2010.

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

VIRTANEN J.K., et al. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.25, n.1, p.228-33, 2005.

WAGNER, A.H., SCHROETER, M.R., HECKER, M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression. In human endothelial cells. **FASEB J**. v.15, n.12, p.2121-30, 2001.

WAKITA, Y. Hypertension induced by methylmercury in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**. v.89, n.1, p.144-7, 1987.

WERNER, E.R., et al. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects. **Exp Biol Med**. v.228, p.1291–1302, 2003.

WESELER, A.R., BAST, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. **Curr Hypertens Rep**. v.12, n.3, p.154-61, 2010.

WHITE, R.E. Estrogen and vascular function. **Vascular Pharmacology**. v.38, p.73-80, 2002.

WHITE, R.E., et al. Estrogen and oxidative stress: A novel mechanism that may increase the risk for cardiovascular disease in women. **Steroids**. v.75, n.11, p.788–793, 2010.

WIGGERS G.A., et al. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.295 n.3 p.1033-1043, 2008.

WIGGERS, G.A., et al. Cerebrovascular Endothelial Dysfunction Induced by Mercury Exposure at Low Concentrations. **Neurotoxicology**. v.53, p.282-289, 2016.

WILDEMANN, T.M., et al. Cardiovascular responses to lead are biphasic, while methylmercury, but not inorganic mercury, monotonically increases blood pressure in rats. **Toxicology**. v.328, p.1-11, 2015.

WOLF, M.B., BAYNES, J.W. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. **Biometals**. v.20, n.1, p.73-81, 2007.

Women's Health Initiative Study Group. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. **Journal of American Medical Association**. v.288, p.321-333, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Environmental Health Criteria 101: Methylmercury. International Program on Chemical Safety. Geneva: World Health Organization, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mercury and health. Geneva: WHO; 2017. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>.

YANG, XP; RECKELHOFF, JF. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. v.20, n.2, p.133-138, 2011.

ZHANG, J.X., et al. Low shear stress induces vascular eNOS uncoupling via autophagy-mediated eNOS phosphorylation. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**. v. 1865, n. 5, p. 709-720, 2018.

ZINKEVICH, N.S., GUTTERMAN, D.D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.301, n.3, p.H647-53, 2011.