



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

KÉREN ALVES DE SOUZA BELLO

**A exposição crônica ao mercúrio agrava os efeitos do
infarto agudo do miocárdio em ratos**

VITÓRIA, ES

2022

KÉREN ALVES DE SOUZA BELLO

A exposição crônica ao mercúrio agrava os efeitos do infarto agudo do miocárdio em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aurélia Araújo Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

VITÓRIA, ES

2022

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

B446e Bello, Kéren Alves de Souza, 1992-
A exposição crônica ao mercúrio agrava os efeitos do infarto
agudo do miocárdio em ratos. / Kéren Alves de Souza Bello. -
2022.
77 f. : il.

Orientadora: Aurélia Araújo Fernandes.

Coorientador: Dalton Valentim Vassallo.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Infarto do miocárdio. 2. Mercúrio. 3. Eletrocardiografia.
4. Arritmia. 5. Hemodinâmica. 6. Stress oxidativo. I. Fernandes,
Aurélia Araújo. II. Vassallo, Dalton Valentim. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Kéren Alves de Souza Bello

“A exposição crônica ao mercúrio agrava os efeitos do infarto agudo do miocárdio em ratos”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado(a) em 1º de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Aurélio Araújo Fernandes – Orientadora



Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Coorientador

Dr. Fabiana Vasconcelos Campos – Examinador Interno



Dr. Paulina Langa – Examinador Externo

Vitória/ES
2022

ASSINATURA

Documento original assinado eletronicamente, conforme MP 2200-2/2001, art. 10, § 2º, por:

FABIANA VASCONCELOS CAMPOS
CIDADÃO

assinado em 02/08/2022 18:42:57 -03:00



INFORMAÇÕES DO DOCUMENTO

Documento capturado em 02/08/2022 18:42:58 (HORÁRIO DE BRASÍLIA - UTC-3)

por FABIANA VASCONCELOS CAMPOS (CIDADÃO)

Valor Legal: ORIGINAL | Natureza: DOCUMENTO NÃO-DIGITAL

A disponibilidade do documento pode ser conferida pelo link: <https://e-docs.es.gov.br/d/2022-3072320>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
AURELIA ARAUJO FERNANDES - SIAPE 2786095
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 03/08/2022 às 13:37

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.leplisma.ufes.br/arquivos-assinados/529609?tipoArquivo=O>

“Se você pode sonhar, você pode realizar!”
Walt Disney

À minha vizinha Maria (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me ter me dado saúde e guardado minha vida. Agradeço por Ele ter sido meu amigo e força nos momentos que eu achava que não suportaria.

Agradeço à minha família, pois sem eles eu não teria conseguido, obrigada por serem minha base. À minha mãezinha, que sempre foi uma guerreira, nunca permitiu me faltasse nada, principalmente amor. Mãe, seu amor faz toda a diferença na minha vida. À minha vizinha Maria, que sempre cuidou de mim, eu não seria nada sem a senhora, sinto sua falta todos os dias e sempre sentirei. Ao meu irmão, que é o grande amor da minha vida, o melhor presente que ganhei nessa vida. Sei que o mundo pode cair, mas sempre teremos um ao outro. Obrigada por ser minha força desde sempre!

Ao meu marido. Obrigada meu amor, por fazer a minha vida mais leve, caminhar ao seu lado faz essa vida ser muito linda. Ainda bem que nossas vidas se cruzaram!

À Babi, minha amiga-irmã, só o fato de eu saber que tenho você, faz com que eu me sinta mais feliz e segura nessa vida. Obrigada por estar comigo em todos os momentos da minha vida. A sua amizade faz toda diferença em minha vida!

À minha amada orientadora e eterna professora Aurélia. Se eu tivesse mil chances de escolher uma orientadora eu sempre escolheria você. Você é uma mulher maravilhosa e me inspira muito com sua inteligência, competência, força e equilíbrio. Eu quero te agradecer por tudo que fez por mim, por ter segurado em minha mão e caminhado junto comigo durante todo esse tempo e quando eu não podia caminhar, você me carregou. Você fez por mim muito além do que orientar, você foi como uma mãe, me protegeu, ajudou, ensinou, aconselhou, direcionou, acalmou e foi uma base muito forte e consistente. Você não faz ideia o quanto eu te admiro e me orgulho de você!! Muito obrigada por tudo que fez por mim, você está gravada em meu coração pelo resto da minha vida!

Ao Chefe, que muito além de um coorientador, é um pai científico do qual eu tenho um orgulho incalculável! Em qualquer oportunidade que tenho, menciono você! Obrigada por ser tão generoso e bom, obrigada por me ensinar com tanto carinho e dedicação, eu espero algum dia ser pelo menos 1% do que você é e representa pra mim. Muito obrigada, por toda a minha vida eu me lembrarei de você com muito carinho e gratidão!

Aos professores do LEMC, que fazem com que o nosso laboratório seja um lugar maravilhoso de se trabalhar. Em especial, gostaria de agradecer à professora Ivanita, que sempre me ajudou e ensinou com muita generosidade e competência!

A todos meus colegas da UFES, que permitiram que meus dias fossem mais leves! Em especial, agradeço à Maria Clara que esteve comigo desde o início, e que foi minha mão direita e esquerda durante todo esse tempo. À Carmen, que tão generosamente me ajudou tanto! Você é uma pessoa sensacional e inesquecível para mim! À Raquel que foi uma grande parceira, ter convivido com você foi um presente para mim! Obrigada Adrielle, Igor, Vanylla, Luíza, Pedro, Filipe, Anna K., Michele, Silas, Ingridy, Maylla e Sabrina, a ajuda de vocês fez muita diferença para mim.

Ao Charles, que mesmo não me conhecendo, abriu as portas do seu laboratório e me ensinou e ajudou de uma maneira incrivelmente generosa!

Ao Enildo, que desde a primeira semana me ensinou e ajudou tanto! Muito obrigada, do fundo do meu coração, sua ajuda foi essencial para mim!

À Paulina Langa, que foi tão incrível ao dedicar seu valioso tempo para ler meu trabalho e me ajudar a enriquecê-lo com os seus ensinamentos e sugestões de melhora. Fez toda a diferença para mim! Muito obrigada por me ajudar tão generosamente!

À Fabiana que fez por mim muito além do que se poderia imaginar! Obrigada por, em meio a uma mudança de país, ter parado sua vida para corrigir meu artigo. Obrigada por, mesmo tendo milhares de coisas para fazer, ter me ajudado a treinar minha apresentação. Obrigada por ter passado horas e dias se dedicando em me ajudar. Sua inteligência e bondade são surreais! Eu já te admirava antes de te conhecer, e depois de tudo que você fez por mim eu me tornei sua fã! Você foi primordial nessa conquista.

Ao LEMC, LABIOM e LHMI que permitiram que eu pudesse executar todos os meus experimentos!

Ao biotério da UFES e todos os seus funcionários, em especial ao Rodolpho e Jailson, que sempre estavam disponíveis para me ajudar.

À UFES e seus funcionários, ao programa de pós-graduação em bioquímica, ao programa de pós-graduação em ciências fisiológicas e todos os professores

compartilharam seus conhecimentos comigo. Para mim, essa profissão é a mais linda e respeitável que existe. Obrigada Aurélia, Dalton, Ivanita, Alessandra, Léo, Enildo, Lucas, Suely, Juliana, Cristina, Marco, Rita e Renata! Não poderia deixar de agradecer a querida Damiana que sempre me deu tanto suporte e que sempre fez seu trabalho com enorme eficiência e carinho!

Enfim, sou só grata e cada esforço foi recompensado por tudo que aprendi, pelo quanto eu evoluí e por cada pessoa que eu conheci nessa jornada! Obrigada!

RESUMO

Introdução: A contaminação ambiental tem exposto os seres humanos a agentes metálicos, incluindo o mercúrio (Hg). Estudos sugerem que a exposição crônica ao Hg pode afetar o sistema cardiovascular. O presente estudo avaliou se a exposição crônica ao Hg pode aumentar a mortalidade por arritmias em ratos submetidos a Infarto do Miocárdio (IM). Ratos machos (12 semanas de idade) foram divididos em quatro grupos: SHAM + Salina, SHAM + Hg, IM + Salina e IM + Hg. Os animais receberam injeções i.m de HgCl₂ (1ª dose contendo 4,6µg/kg e dose subsequente contendo 0,07µg/kg/dia para cobrir a perda diária) ou veículo (Salina) por três semanas. Ao final da terceira semana, os animais foram submetidos à cirurgia de infarto através da ligadura da artéria coronária esquerda descendente anterior. Os animais SHAM foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto para ligadura coronariana. Os registros eletrocardiográficos (ECG) foram realizados 5 minutos antes e 20 minutos após as cirurgias. O número de extrassístoles ventriculares (EV); duração da taquicardia ventricular (TV) e bloqueios atrioventriculares (BAV) foram analisados. Uma semana após o IM, as medidas hemodinâmicas foram realizadas e os dados ponderais foram analisados. Além disso, os níveis das espécies reativas de oxigênio (ROS), ânion superóxido (O²⁻) e óxido nítrico (NO) no músculo cardíaco dos animais foram realizados através de análises de fluorescência utilizando Dihidroetídio (DHE) e Diaminofluoresceína (DAF), respectivamente. O protocolo foi aprovado pelo CEUA (20/2018 e 24/2020). O tamanho da cicatriz não foi diferente entre os grupos IM. A taxa de mortalidade em IM + Hg foi de 31,82% enquanto IM + Salina foi de 21,43%. Os registros de ECG mostraram um aumento no BAV nos grupos MI (min: SHAM + Salina = 0,00 ± 0,00%; SHAM + Hg = 0,81 ± 0,67%; IM + Salina = 4,35 ± 0,96%*#; IM + Hg = 3,64 ± 0,88% *#; *p <0,05 vs SHAM + Salina, #p <0,05 vs SHAM + Hg). O coeficiente de Basckó mostrou que as arritmias após IM foram agravadas pela exposição ao Hg (SHAM + Salina = 0,24 ± 0,19; SHAM + Hg = 0,75 ± 0,35; IM + Sal = 2,97 ± 0,30*#; IM + Hg = 4,00 ± 0,21*#+; *p <0,05 vs SHAM + Salina, #p <0,05 vs SHAM + Hg, +p <0,05 vs IM + Salina). Além disso, houve forte correlação entre mortalidade e BAV (r=0,7379), EV (r=0,9487), TV (r=0,9487) e coeficiente de Basckó (r=0,9487). O grupo SHAM + Hg apresentou aumento da pressão arterial sistólica, porém esses valores foram diminuídos nos grupos IM (mmHg: SHAM + Sal = 105 ±

2,98; SHAM + Hg = $115 \pm 3,71^*$; IM + Salina = $95,47 \pm 3,58^{*#}$; IM + Hg = $90,01 \pm 2,96^{*#}$; *p <0,05 vs SHAM + Salina, #p <0,05 vs SHAM + Hg). A pressão diastólica final do ventrículo esquerdo foi aumentada no grupo IM + Salina (SHAM + Salina = $7,31 \pm 1,25$; SHAM + Hg = $5,38 \pm 1,44$; IM + Salina = $15,95 \pm 2,84^{*#}$; IM + Hg = $9,56 \pm 1,38^+$; *p <0,05 vs SHAM + Salina, #p <0,05 vs SHAM + Hg, +p <0,05 vs IM + Salina). Os valores de dP/dt+ e dP/dt- diminuíram nos grupos IM (dP/dt+ em mmHg: SHAM + Salina = 5515 ± 543 ; SHAM + Hg = 5779 ± 728 ; IM + Salina = $3623 \pm 315^{*#}$; IM + Hg = $2782 \pm 322^{*#}$; dP/dt- em mmHg: SHAM + Salina = -3500 ± 403 ; SHAM + Hg = -3180 ± 354 ; IM + Salina = $-2248 \pm 122^{*#}$; IM + Hg = $-1833 \pm 125^{*#}$; *p <0,05 vs SHAM + Salina, #p <0,05 vs SHAM + Hg). A razão do peso do coração pelo peso corporal aumentaram nos grupos IM (SHAM + Salina = $2,82 \pm 0,04$; SHAM + Hg = $2,87 \pm 0,12$; IM + Salina = $3,83 \pm 0,26^{*#}$; IM + Hg = $3,73 \pm 0,22^{*#}$; *p <0,05 vs SHAM + Salina, #p <0,05 vs SHAM + Hg), bem como a razão do peso pulmonar pelo peso corporal (SHAM + Salina = $5,11 \pm 0,19$; SHAM + Hg = $4,69 \pm 0,17$; IM + Salina = $8,97 \pm 0,79^{*#}$; IM + Hg = $7,50 \pm 0,67^{*#}$; *p <0,05 vs SHAM + Salina, #p <0,05 vs SHAM + Hg, +p <0,05 vs IM + Salina). Os níveis de ROS foram maiores nos grupos que se associaram a exposição ao Hg e o IM (O²⁻ em u.a: SHAM + Salina = $1,79 \pm 1,79$; SHAM + Hg = $58,88 \pm 6,01$; IM + Salina = $171 \pm 7,26^{*#}$; IM + Hg = $221 \pm 12,14^{*#}$; NO em u.a: SHAM + Salina = $57,27 \pm 8,05$; SHAM + Hg = $106 \pm 10,97$; IM + Salina = $207 \pm 8,87^{*#}$; IM + Hg = $246 \pm 4,54^{*#}$; *p <0,05 vs SHAM + Salina, #p <0,05 vs SHAM + Hg, +p <0,05 vs IM + Salina). A intoxicação por mercúrio causou mais arritmias em animais infartados, o que levou a um aumento na mortalidade. Também foi observado um aumento de ERO e alteração dos parâmetros pressóricos. Esses resultados sugerem que a exposição ao mercúrio piora dos eventos cardíacos desencadeados pelo IM.

Palavras-chave: infarto do miocárdio; mercúrio; arritmia; eletrocardiograma, ERO.

ABSTRACT

Environmental contamination has exposed humans to metal agents, including mercury (Hg). Studies suggest that chronic exposure to Hg can affect the cardiovascular system. However, the present study evaluated whether chronic exposure to Hg can increase mortality due to arrhythmias in rats underwent Myocardial Infarction (MI).

Methods: Male rats (12 weeks old) were divided into four groups: SHAM + Sal, SHAM + Hg, MI + Sal, and MI + Hg. Animals received i.m injections of HgCl₂ (1st dose 4.6µg/kg, subsequent dose 0.07µg/kg/day to cover daily loss) or vehicle-saline (Sal) for three weeks. At the end of the third week, the animals were submitted to infarction surgery through of ligation of the anterior descending left coronary artery. SHAMs were submitted the same procedure except to coronary ligation. Electrocardiographic (ECG) recordings were performed 5 minutes before and 20 minutes after surgeries. Number of ventricular extra systoles (VES); duration of ventricular tachycardia (VT) and atrioventricular blocks (AVB) were analyzed. One week after MI, hemodynamic measurements were performed and ponderal data were analyzed. Also, levels of the reactive oxygen species (ROS) superoxide anion (O²⁻) and nitric oxide (NO) in the cardiac muscle of the animals were performed through fluorescence analyses using Dihydroethidium (DHE) and Diaminofluorescein (DAF), respectively. The protocol was approved by CEUA (20/2018 and 24/2020). The scar size was not different between MI groups. The mortality rate in MI + Hg was 31.82% while MI + Sal was 21.43%. ECG recordings showed an increase in AVB in IM groups (min: SHAM + Sal = 0.00±0.00%; SHAM + Hg = 0.81 ± 0.67%; MI + Sal = 4.35 ± 0.96%*#; MI + Hg = 3.64 ± 0.88%*#; *p < 0.05 vs SHAM + Sal, #p < 0.05 vs SHAM + Hg). Basckó coefficient showed that arrhythmias after MI were aggravated by exposure to Hg (SHAM + Sal = 0.24 ± 0.19; SHAM + Hg = 0.75 ± 0.35; MI + Sal = 2.97 ± 0.30*#; MI + Hg = 4.00 ± 0.21*#+; *p < 0.05 vs SHAM + Sal, #p < 0.05 vs SHAM + Hg, +p<0.05vsMI+Sal). Also, there was strong correlation between mortality and AVB (r=0.7379), VES (r=0.9487), VT (r=0.9487) and Basckó coefficient (r=0,9487). SHAM + Hg group has increased of the systolic blood pressure, however these values were decreased in IM groups (mmHg: SHAM + Sal = 105 ± 2.98; SHAM + Hg = 115±3.71*; MI + Sal = 95.47 ± 3.58*#; MI + Hg = 90.01 ± 2.96*#; *p < 0.05 vs SHAM + Sal, #p < 0.05 vs SHAM + Hg). Left Ventricle end Diastolic Pressure was increased in MI + Sal group (SHAM + Sal = 7.31 ± 1.25;

SHAM + Hg = 5.38 ± 1.44 ; MI + Sal = $15.95 \pm 2.84^{*#}$; MI + Hg = $9.56 \pm 1.38^{+}$; *p < 0.05 vs SHAM + Sal, #p<0.05vsSHAM+Hg, +p<0.05vsMI+Sal). dP/dt+ and dP/dt- values, were decreased in IM groups (dP/dt+ in mmHg :SHAM + Sal = 5515 ± 543 ; SHAM + Hg = 5779 ± 728 ; MI + Sal = $3623 \pm 315^{*#}$; MI + Hg = $2782 \pm 322^{*#}$; dP/dt- in mmHg: SHAM + Sal = -3500 ± 403 ; SHAM + Hg = -3180 ± 354 ; MI + Sal = $-2248 \pm 122^{*#}$; MI + Hg = $-1833 \pm 125^{*#}$; *p < 0.05 vs SHAM + Sal, #p < 0.05 vs SHAM + Hg). The heart weight and body weight ratio was increased in IM groups (SHAM + Sal = $2,82 \pm 0,04$; SHAM + Hg = $2,87 \pm 0,12$; MI + Sal = $3,83 \pm 0,26^{*#}$; MI + Hg = $3,73 \pm 0,22^{*#}$; *p < 0,05 vs SHAM + Sal, #p < 0.05 vs SHAM + Hg) as well as the lung weight and body weight ratio (SHAM + Sal = $5,11 \pm 0,19$; SHAM + Hg = $4,69 \pm 0,17$; MI + Sal = $8,97 \pm 0,79^{*#}$; MI + Hg = $7,50 \pm 0,67^{*#}$; *p < 0,05 vs SHAM + Sal, #p < 0.05 vs SHAM + Hg, +p < 0,05 vs MI + Sal). ROS levels were higher in groups that associated exposed to Hg and IM (O_2^- in a.u: SHAM + Sal = 1.79 ± 1.79 ; SHAM + Hg = 58.88 ± 6.01 ; MI + Sal = $171 \pm 7.26^{*#}$; MI + Hg = $221 \pm 12.14^{*#}$; NO in a.u: SHAM + Sal = $57,27 \pm 8.05$; SHAM + Hg = 106 ± 10.97 ; MI + Sal = $207 \pm 8.87^{*#}$; MI + Hg = $246 \pm 4.54^{*#}$; *p< 0.05 vs SHAM + Sal, #p < 0.05 vs SHAM + Hg, +p< 0.05 vs MI + Sal). Mercury intoxication caused more arrhythmias in infarcted animals, increased ROS and changed pressure parameters. These results suggest a worsening of cardiac events triggered by MI, as well as increased mortality after the injury.

Keywords: myocardial infarction; mercury; arrhythmias; electrocardiogram; ROS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Limites semanais toleráveis para consumo de metilmercúrio. (OPAS, 2011)27
- Figura 2** - Tomoko, uma das vítimas da contaminação por mercúrio em Minamata. (Inoue, 2019)29
- Figura 3** - Reações para formação de espécies reativas de oxigênio (Barbosa et. al., 2010)31
- Figura 4** - Sistema antioxidante. Durante a respiração aeróbica celular, a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria produz o radical superóxido (O_2^-). Este radical é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima Superóxido Dismutase (SOD), então a enzima Glutathione Peroxidase (GPx) oxida a Glutathione (GSH) em Glutathione dissulfeto (GSSG) e converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em seus álcoois e água, deste modo completa sua ação antioxidante (Adaptado: Osredkar e Sustar, 2011; Martinez et. al., 2014)32
- Figura 5** - Esquema de evolução das placas de ateroma e trombos que levam ao infarto do miocárdio. 1) Artéria e endotélio normais; 2) O ateroma começa a ser formado quando, por ação de células inflamatórias e circulação aumentada de lipídeos sanguíneos, ocorre a deposição de núcleos de lipídeos nas artérias; 3) A capa fibrosa que envolve o núcleo de lipídeos torna-se suscetível à ruptura quando leucócitos secretam proteinases que degradam a matriz extracelular, e quando citocinas pró-inflamatórias limitam a síntese de colágeno. 4) Ao se romper, a placa entra em contato com o sangue, que se coagula e as plaquetas são ativadas pela trombina e propiciam a formação de trombos; 5) Quando o trombo oclui a artéria ocorre o infarto agudo do miocárdio (Adaptado: Lizzy, 2002)34

Figura 6 - Comparando as diferenças entre os potenciais de ação e suas correntes iônicas em: A) Humanos B) Ratos (repolarização mais rápida). Traçado do Eletrocardiograma, derivação DII, em C) Humanos D) Ratos. (Hundahl et al., 2017)

.....35

Figura 7 - Traçados do Eletrocardiograma (ECG) representando a atividade elétrica cardíaca. Onda P: depolarização dos átrios; onda QRS: despolarização dos ventrículos; onda T: repolarização dos ventrículos; intervalo PR: transmissão da despolarização dos átrios para os ventrículos; intervalo RR: relacionado ao ritmo cardíaco; intervalo QT: atividade de despolarização e repolarização ventricular; segmento ST: fase inicial da repolarização dos ventrículos (Guyton e Hall, 2011)

..... 36

Figura 8 - Traçados alterados após infarto. A) Diferença das ondas do eletrocardiograma antes e após infarto, observa-se que após a cirurgia ocorre alargamento e aumento de QRS, bem como supra de ST; B) Extrassístoles seguidas de ondas normais de eletrocardiograma; C) Taquicardia ventricular registrada no período de 4min59s até 5min1s em eletrocardiograma de rato submetido à cirurgia de infarto

.....37

Figura 9 - Protocolo de Exposição Crônica ao HgCl₂. Adaptado de Wiggers et al.

(2008)41

Figura 10 - A) Cirurgia de indução ao infarto agudo do miocárdio. 1) Toracotomia entre o terceiro e quarto espaço intercostal; 2) Exposição do coração; 3) Localização do ramo interventricular anterior da coronária esquerda; 4) Ligadura da artéria (Adaptado: Mahmoud et al., 2014). B) Cirurgia de indução ao infarto do miocárdio (Arquivo da professora Aurélia)

..... 42

Figura 11 - Animal anestesiado e submetido à análise eletrocardiográfica após a cirurgia de indução do infarto (Fonte: própria)43

Figura 12 - Cronograma de Experimentos. Durante três semanas os animais receberam injeções intramusculares com cloreto de mercúrio. No final da terceira semana foram realizadas análises eletrocardiográficas nos animais durante 5 minutos, em seguida foram submetidos à cirurgia de infarto ou cirurgia fictícia, finalmente, mais 20 minutos de eletrocardiograma foram registrados. Os animais sobreviventes receberam injeções intramusculares com cloreto de mercúrio por mais uma semana. No final da quarta semana os animais foram anestesiados para a aferição dos dados hemodinâmicos. Após a realização do exame os animais foram eutanasiados, órgãos retirados e pesados, e amostras do músculo cardíaco foram armazenadas para posteriores análises bioquímicas.....45

Figura 13 - Bordas do ventrículo esquerdo contornadas em papel milimetrado: tecido não infartado e da área de cicatriz (Fonte: Própria)47

Figura 14 - A) Tamanho da área de Infarto do Miocárdio (IM) comparada à área total do ventrículo esquerdo (VE), dado expresso em porcentagem (%). Dados expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student não pareado, valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes ($p = 0,96$). B) Imagem do pulmão e coração com área de cicatriz de infarto (Fonte: Arquivo Professora Aurélia)48

Figura 15 - Probabilidade de morte dos animais durante as 24, 48 e 72 horas posteriores às cirurgias. Os dados estão expressos em porcentagem (%). Para análise estatística foi utilizado Kaplan-Meier.....49

Figura 16 - Peso do Pulmão/Peso corporal (PP/PC), dado expresso em gramas (g). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg; +vs IM+Salina.....50

Figura 17 - Pressão Arterial Sistólica (PAS), expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). Dados expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg.....51

Figura 18 - Pressão Arterial Diastólica (PAD), expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). Dados expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg; +vs IM + Salina51

Figura 19 - Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDfVE), expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). Dados expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM+Salina; #vs SHAM+Hg; +vs IM+Salina.....52

Figura 20 - A) Número de Extrassístoles ventriculares isoladas (ESI), expressas em unidades. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina. B) Imagem de extrassístoles observadas em registro visualizado pelo programa LabChart (Fonte: Própria)54

Figura 21 - A) Porcentagem de tempo de ocorrência de taquicardias ventriculares (TV). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de

Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina. B) Imagem de taquicardia ventricular observada em registro visualizado pelo programa LabChart (Fonte: Própria)55

Figura 22 - Escore de Basckó. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg56

Figura 23 - Altura de ST antes da cirurgia, expressa em milivolts (mV). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.....58

Figura 24 - A) Intensidade de Fluorescência (DAF), com e sem L-NAME, expressa em unidade arbitrária (u.a). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: 'vs com L-NAME; *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg; +vs IM + Salina. B) DAF – Comparação dos grupos com e sem L-NAME. Imagens de fluorescência de óxido nítrico obtidas através de microscópio invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x) e câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.....59

Figura 25 - DAF – Comparação entre grupos. Imagens de fluorescência de óxido nítrico obtidas através de microscópio invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x) e câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.....59

Figura 26 - A) Intensidade de Fluorescência (DHE), com e sem TIRON, expressa em unidade arbitrária (u.a). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: 'vs com TIRON; *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg; +vs IM + Salina. B) DHE – Comparação dos grupos com e sem L-NAME. Imagens de fluorescência de

óxido nítrico obtidas através de microscópio invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x)
e câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.....60

Figura 27 - DHE – Comparação entre grupos. Imagens de fluorescência de ânion
superóxido obtidas através de microscópio invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x) e
câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas de Escores para a Caracterização da Gravidade das Taquiarritmias Cardíacas Após o Infarto.....	44
Tabela 2 - Dados ponderais.....	49
Tabela 3 - Dados Hemodinâmicos.....	52
Tabela 4 - Dados do Eletrocardiograma.....	53
Tabela 5 - Correlação de Arritmias e Mortalidade	56
Tabela 6 - Traçado do eletrocardiograma (Pré e Pós-cirurgia)	57
Tabela 7 - Intensidade de Fluorescência DAF e DHE.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

BAV: Bloqueio Atrioventricular

BPM: Batimentos por Minuto

Cor/PC: Peso do Coração pelo Peso Corporal

DCVs: Doenças Cardiovasculares

dP/dt+: Derivada de Pressão pela Derivada de Tempo (máx)

dP/dt-: Derivada de Pressão pela Derivada de Tempo (mín)

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ECC: Eletrocardiograma

EPM: Erro Padrão da Média

ESI: Extrassístole Isolada

FC: Frequência Cardíaca

FV: Fibrilação Ventricular

GPx: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione

GSSG: Glutathione disulfeto

Hg: Mercúrio

HgCL₂: Cloreto de Mercúrio

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

IM: Infarto do Miocárdio

iPR: Intervalo PR

iQT: Intervalo QT

mmHg: Milímetros de Mercúrio

ms: Milisegundos

NaCl: Cloreto de Sódio

NCX: Trocador Sódio e Cálcio

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NKA: Sódio Potássio ATPase

O²⁻: Radical Superóxido

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PDfVE: Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo

PLB: Proteína Fosfolambam

PP/PC: Peso do Pulmão pelo Peso Corporal

PSVE: Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo

QRS: Complexo QRS

s: Segundos

SERCA: Cálcio ATPase do Retículo Sarcoplasmático

SHAM: Cirurgia fictícia

SOD: Superóxido Dismutase

sPR: Seguimento PR

sST: Segmento ST

TV: Taquicardia Ventricular

VE: Ventrículo Esquerdo

XO: Xantina oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1 O ÍON DE MERCÚRIO.....	26
1.2 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DO MERCÚRIO.....	26
1.3 LIMITES DE CONSUMO E CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE MERCÚRIO.....	27
1.4 HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO.....	28
1.5 MERCÚRIO E O ORGANISMO HUMANO.....	29
1.6 MERCÚRIO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	30
1.7 MERCÚRIO E O SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	33
1.8 ELETROCARDIOGRAMA.....	35
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 GRUPOS DE ESTUDO.....	40
3.2 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl ₂)	40
3.3 CIRURGIA DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO.....	42
3.4 AVALIAÇÃO DO RITMO CARDÍACO APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO.....	42
3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PONDERAIS E HEMODINÂMICOS	44
3.6 ESTUDO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS: ESTRESSE OXIDATIVO DO CORAÇÃO.....	45
3.6.1 Detecção “in situ” da formação de ânion superóxido.....	45
3.6.2 Detecção “in situ” da formação de óxido nítrico.....	46
3.7 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO.....	47
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	47
4. RESULTADOS.....	48
4.1 ÁREA DE INFARTO.....	48
4.2 MORTALIDADE.....	48
4.3 DADOS PONDERAIS.....	49
4.4 DADOS HEMODINÂMICOS.....	50
4.5 DADOS DO ELETROCARDIOGRAMA	53
4.6 DADOS BIOQUÍMICOS.....	58
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ÍON MERCÚRIO (Hg)

O mercúrio (Hg) é um metal pesado e está entre os mais tóxicos presentes na natureza. Ele pode ser encontrado em diferentes formas (metálico, orgânico e inorgânico) e apresentar três níveis de oxidação que são facilmente interconvertíveis (0, +1, +2) (Bernhoft, 2012).

O mercúrio metálico em estado de oxidação zero (Hg^0), em temperatura ambiente, apresenta-se no estado líquido, é volátil e pode liberar vapor de mercúrio. Este vapor é estável e pode permanecer na atmosfera por longos períodos de tempo podendo se converter ao estado mercurioso (Hg^{+1}) e mercúrico (Hg^{+2}). A forma inorgânica do metal é constituída quando este se liga ao cloro, enxofre ou oxigênio. Já na forma orgânica, o átomo de mercúrio se liga covalentemente a pelo menos um átomo de carbono (Silva et. al., 2019).

1.2 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DO MERCÚRIO

O mercúrio é liberado naturalmente no meio, através de intemperismo de rochas, atividade vulcânica, desgaseificação da crosta terrestre e erosão do solo. Além disso, a corrida industrial, intensificou-se as liberações de mercúrio na atmosfera. Atualmente, a atividade humana que ocorre através da mineração, queima de carvão residencial, usinas termoelétricas a carvão, processos industriais, mineração de ouro e incineradores de resíduos, é a principal causa de liberação do metal no meio ambiente (UNEP, 2013; WHO, 2017; Rizzetti et. al., 2017).

A intoxicação humana ocorre principalmente devido a inalação de vapores de mercúrio liberados pela indústria e pelo consumo de moluscos ou peixes contaminados por metil-mercúrio (WHO, 2017; Rizzetti et. al., 2017). Para que ocorra a contaminação dos peixes, o mercúrio metálico é liberado na atmosfera (Hg^0), reage com o oxigênio formando o íon mercúrico (Hg^{2+}) que se une a vapores de água e através da chuva, chega ao solo. No solo o íon mercúrico (Hg^{2+}) liga-se ao cloro, enxofre e oxigênio formando os sais de mercúrio que são levados aos ambientes aquáticos. Finalmente, estes sais sofrem ação de microrganismos e são transformados na forma orgânica do metal. Este, por sua vez, contamina os plânctons,

mariscos e peixes. Na cadeia alimentar, sofre biomagnificação até chegar aos seres humanos (Rice et. al., 2014).

1.3 LIMITES DE CONSUMO E CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE MERCÚRIO

Estudos mostram que o consumo de peixes promove aumento na ingestão de ácidos graxos poli-insaturados n-3 de cadeia longa (ômega 3), que possui efeito protetor contra doenças cardiovasculares. No entanto, este hábito alimentar pode também aumentar o risco de intoxicação por mercúrio, e é sabido que este metal possui ação deletéria à saúde cardiovascular. Um estudo que quantificou níveis de mercúrio na unha e níveis de ácido docosahexaenóico (DHA) no tecido adiposo de 1408 homens, concluiu que os efeitos protetivos do consumo de peixe são diminuídos devido ao consumo de altos níveis de mercúrio. Os autores observaram que os níveis de DHA foram inversamente associados ao risco de infarto do miocárdio, enquanto os níveis de mercúrio foram diretamente associados a este risco (Guallar, et. al, 2002).

Tendo em vista, a presença do metal no meio ambiente e a contaminação de peixes, agências regulamentadoras estabeleceram recomendações para limites de consumo do metal. No entanto, tais limites para consumo dietético do metilmercúrio são muito variáveis.

A WHO (1990) recomenda o máximo de 0,47 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, enquanto a FDA (2004) recomenda o 0,43 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$. Já para a National Research Council (2000), o limite seria de 0,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$.

Além disso, conforme observado na Figura 1, governos e organizações estimam limites semanais toleráveis para consumo de metilmercúrio para que não haja prejuízo à saúde. No Brasil, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ é o nível de referência máximo (OPAS, 2011).

País / Organização	Níveis de Referência ($\mu\text{g MeHg}/\text{Kg}$ peso corpóreo/semana)	Ano
Canadá	1,4	1997
Japão	2,0	2005
Holanda	0,7	2000
Estados Unidos	0,7	2001
JECFA*	1,6	2003

Figura 1: Limites semanais toleráveis para consumo de metilmercúrio. *Joint Expert Committee on Food Additives (OPAS, 2011).

Populações ribeirinhas no Brasil apresentam um elevado consumo de peixes contaminados por mercúrio, levando a uma ingestão média diária de 4 µg de mercúrio/Kg de peso, valor muito acima do preconizado (Passos e Mergler, 2008).

No que diz respeito à população geral, os valores de referência para a concentração de mercúrio na urina ficam entre 4 e 5 µg/L (Sato, 2000). No Brasil, é estabelecido o limite máximo de tolerância biológica de 33 µg Hg/g de creatinina urinária e 0,04 mg Hg/m³ no ambiente de trabalho, considerando as normas regulamentadoras da Organização Mundial de Saúde, Ministério do Trabalho e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 10004, 2004).

Os limites de mercúrio no cabelo variam de acordo com a frequência de consumo de peixes. As referências variam de 1.4 µg/g, 1,9 µg/g, 2.5 µg/g ou 11.6 µg/g caso o consumo ocorra, respectivamente uma vez ao mês, duas vezes ao mês, uma vez por semana ou 1 vez por dia. Em relação à concentração de mercúrio no sangue ficam definidos valores de 1 a 8 µg/L. Porém esses valores também podem variar. Caso o consumo semanal de peixe seja zero, dois, dois a quatro ou mais que quatro, a referência é modificada para 2.0 µg/L, 4.8 µg/L, 8.4 µg/L ou 44.4 µg/L, respectivamente (Sato, 2000).

De fato, em relação à concentração de mercúrio sanguíneo, não há um consenso. De acordo com a WHO (2008), populações não expostas apresentariam de 5 a 10 µg de mercúrio por litro de sangue, enquanto para a NCR (2000) o valor seria de 2 µg/L. Alguns autores sugerem que as concentrações de mercúrio sanguíneo em pessoas sem amálgama dentária seria de <0,5 nmolHg/L (Reichl et al., 2001; de Assis et al., 2003), enquanto indivíduos com amálgama dentária apresentariam níveis de ~10nmolHg/L (Reichl et al., 2001) ou ~16nmolHg/L (Vamnes et al., 2000). O valor de referência limite para mercúrio sanguíneo recomendado pela União Europeia (UE), por meio do comitê científico para os limites de exposição ocupacional (SCOEL) é de 10µg.L⁻¹ (SCOEL, 2007). Para indivíduos ocupacionalmente expostos, a concentração sanguínea de mercúrio fica em torno de 20 – 30 µg/L (Mahaffey, 2005).

1.4 HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO

O efeito tóxico do mercúrio sobre os seres humanos é bem documentado e a primeira morte registrada causada pelo metal foi a do imperador da China, Qin Shi Huang (260-

210 aC) (Rice et. al., 2014). Em Minamata, no Japão, entre os anos de 1932 e 1968, cerca de cento e cinquenta toneladas de metil mercúrio foram despejados na baía da cidade por uma fábrica de ácido acético. Por ter como a principal fonte de alimentação os peixes contaminados por mercúrio, mais de cinquenta mil pessoas da região foram afetadas e mais de duas mil pessoas foram acometidas pela “doença de Minamata” que tinha como sintomas delírio, fala incoerente, danos cerebrais e paralisia (Figura 2) (Genchi et. al., 2017).

Em 1971, no Iraque, cerca de quinhentas pessoas morreram após consumirem pão produzido com trigo tratado com fungicidas que continham mercúrio orgânico em sua composição (Bakir et.al., 1973).

No Brasil, na cidade de Mariana-MG (2015) e em Brumadinho-MG (2019) houve rompimento de barragens que liberaram no meio ambiente cerca de cinquenta milhões de metros cúbicos de lama de rejeitos da mineração de ferro, contendo altos níveis de metais pesados, dentre eles, o mercúrio (Passos et. al., 2017; Valenti e Garner, 2019).



Figura 2: Tomoko, uma das vítimas da contaminação por mercúrio em Minamata. (Inoue, 2019)

1.5 MERCÚRIO E O ORGANISMO HUMANO

O efeito do mercúrio sobre a saúde e a gravidade desses efeitos depende de algumas variáveis, como, composição química do metal, a dose, o estágio de desenvolvimento ou idade do exposto (WHO, 2017).

Sabe-se que fetos e indivíduos expostos cronicamente (geralmente de modo ocupacional) são os grupos mais sensíveis aos efeitos negativos causados pelo metal (WHO, 2017; Rizzetti et. al., 2018).

A contaminação pelo mercúrio metálico ocorre através da inalação e segue para os pulmões onde liga-se aos eritrócitos. O mercúrio orgânico é absorvido através do sistema gastrointestinal, também ligando-se aos eritrócitos (Rizzetti et. al., 2017). A partir desta ligação o mercúrio atinge diversos órgãos e sistemas como o respiratório, imunológico, digestivo (Genchi et. al., 2017), reprodutor (Martinez et. al., 2017), renal (Kobal et.al., 2000), nervoso (Fernandes et. al., 2012) e cardiovascular, causando múltiplos efeitos deletérios nestes sistemas (Vassallo et. al., 2018).

1.6 MERCÚRIO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os radicais livres possuem funções biológicas importantes. Eles mediam a transferência de elétrons e têm papel importante na ativação de genes, no sistema imunológico na produção de ATP, na cadeia transportadora de elétrons, entre outros. De todo modo, é essencial que haja um equilíbrio entre os radicais livres e o sistema antioxidante. Em situações em que as espécies reativas de oxigênio superam a capacidade do corpo em combatê-las, ocorre o estresse oxidativo que é capaz de afetar negativamente a estrutura e a função de diversos órgãos e sistemas. Além disso, as EROs, em excesso, podem levar a danos no DNA e como consequência, desencadear diversos tipos de doenças, tais como diabetes, cânceres, doenças degenerativas e aterosclerose (Dröge, 2002).

Na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, a enzima citocromo oxidase retira elétrons do citocromo c. Quando quatro desses elétrons se unem ao O_2 presente na organela, há a formação de água e energia (Figura 3-1). Em alguns casos, a molécula de O_2 recebe apenas um elétron, o que desencadeia a formação de radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^\bullet) (Figura 3-2). Quando o O_2^\bullet recebe íons de hidrogênio ocorre a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo este, catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 3-3). O H_2O_2 , por sua vez, não é considerado um radical livre, por não possuir em sua última camada um elétron desemparelhado. Porém é bastante prejudicial devido sua capacidade de atravessar a barreira celular. Além disso, o H_2O_2 também produz o radical hidroxila (OH^\bullet) através das reações de Fenton e Haber-Weiss (Figura 3-4 e 3-5). O OH^\bullet é uma

espécie extremamente reativa, capaz de alterar significativamente estruturas biológicas. Inclusive, ao reagir com o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o radical $\text{O}_2\cdot$ pode gerar o peroxinitrito (ONOO^-) (Figura3-6) (Barbosa et. al., 2010; Sies, 2017).

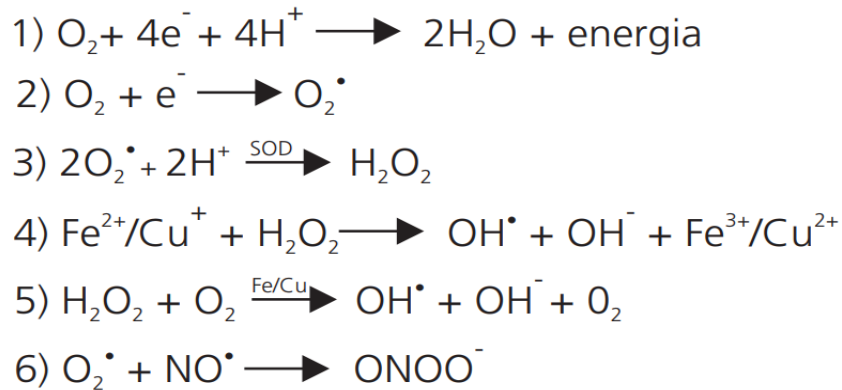


Figura 3: Reações para formação de espécies reativas de oxigênio (Barbosa et. al., 2010)

A formação de outros tipos de radicais livres ocorre quando ácidos graxos poli-insaturados das membranas das células perdem um átomo de hidrogênio pela ação do radical $\text{OH}\cdot$, formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Posteriormente o LOOH é convertido nos radicais alcóxila ($\text{LO}\cdot$) e peróxila ($\text{LO}_2\cdot$) com a participação catalítica de íons de ferro (Barbosa et. al., 2010).

A enzima NADPH oxidase, presente em na membrana de macrófagos, células endoteliais ou polimorfonucleares; possui alto potencial na geração de radicais livres. A enzima é um complexo transmembrana, que atua na transferência de elétrons, através das membranas celulares. Quando os elétrons transferidos pela NADPH oxidase se unem ao oxigênio, como mencionado anteriormente, ocorre a formação do radical $\text{O}_2\cdot$ (Subramanian et. al., 2010; Sies et. al., 2017).

É importante enfatizar que os organismos biológicos possuem um sistema de defesa contra tais radicais livres, o sistema de defesa antioxidante (Figura 4). Este sistema atua no controle da produção e ação de radicais livres, bem como no controle dos danos causados por estes radicais. O estresse oxidativo, de fato, ocorre apenas quando a produção de espécies reativas de oxigênio supera a capacidade do sistema antioxidante lidar com tais substâncias tóxicas (Sies, 1997; Sies, 2015; Dröge, 2002; Valko et. al., 2005).

O sistema antioxidante pode ser não-enzimático, quando é composto por substâncias dietéticas como vitaminas, fitoquímicos e minerais. O sistema enzimático é composto

pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutaciona Peroxidase (GPx). A SOD tem como cofatores cobre, zinco e manganês, enquanto uma das formas da GPx é dependente de selênio (Betteridge,2000).

Conforme mostrado na Figura 4, durante a respiração aeróbica celular, a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria produz o radical superóxido (O_2^-). Este radical é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima Superóxido Dismutase (SOD), então a enzima Glutaciona Peroxidase (GPx) oxida a Glutaciona (GSH) em Glutaciona dissulfeto (GSSG) e converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em seus álcoois e água, deste modo completa sua ação antioxidante (Martinez et. al., 2014).

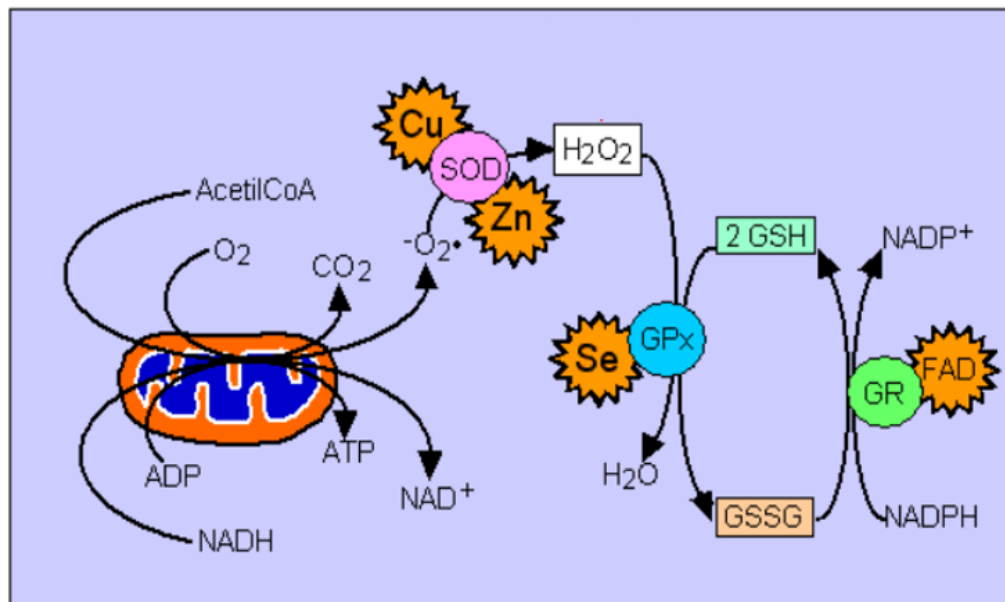


Figura 4: Sistema antioxidante. (Adaptado: Osredkar e Sustar, 2011)

Outro exemplo de antioxidante é a coenzima Q10 (CoQ) ou ubiquinona, que é um lipídio sintetizado de maneira endógena e possui função redox. Deste composto deriva a mitoquinona (MitoQ), que tem a capacidade de atravessar bicamadas fosfolipídicas e possui alta afinidade que permite seu acúmulo dentro a matriz mitocondrial. Ao passar pela cadeia respiratória da organela, a MitoQ é transformada em sua forma ativa, ubiquinol. O ubiquinol atua como antioxidante ao doar um hidrogênio para um lipídio radical peroxil, inibindo propagação da peroxidação lipídica, além disso, atua na mitocôndria através da regulação de permeabilidade, diminuição da oxidação de membrana e previne danos funcionais, estruturais e de DNA na célula (Vasconcelos et.al., 2007; Subramanian et. al., 2010).

Sabe-se que o mercúrio interfere negativamente no funcionamento dos sistemas antioxidantes, pois possui alta afinidade com os grupos tiol e selênio, encontrados em aminoácidos como o Se-cisteína e cisteína, ácido lipóico, N-acetilcisteína, enzimas e proteínas. Uma das mais importantes moléculas antioxidantes, a glutatona, é dependente, por exemplo, de cisteína e selênio, ambos afetados pelo mercúrio (Brancoet. al., 2017; Genchi et. al., 2017; Houston, 2007).

Além disso, estudos mostraram que o mercúrio está relacionado ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) por provocar a auto oxidação da membrana interna da mitocôndria, levando a organela a uma disfunção e produção excessiva de radicais livres. Portanto, o mercúrio além de estimular a produção de ERO, também diminui a ação de enzimas antioxidantes, levando a um desequilíbrio redox que leva ao aumento da peroxidação de fosfolipídios, proteínas e DNA (Genchi et. al., 2017).

1.7 MERCÚRIO E O SISTEMA CARDIOVASCULAR

A intoxicação por mercúrio foi relacionada a alterações cardiovasculares como aumento da pressão sistólica, desregulação do sistema renina-angiotensina, hipertensão, disfunções no endotélio, reatividade vascular e inflamação devido ao estresse oxidativo (Rizzetti et. al., 2017), doença arterial coronariana, aterosclerose da carótida e infarto do miocárdio (Salonen et al. 2005).

Estudos realizados em modelos animais expostos à intoxicação crônica por mercúrio, demonstraram alterações contráteis em corações isolados, bem como diminuição da atividade do trocador sódio e cálcio (NCX), diminuição da ATPase transportadoras de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) e diminuição da sódio potássio ATPase (NKA), estruturas importantes para o funcionamento cardíaco (Vassallo et. al., 2018). Outros trabalhos indicaram que o mercúrio atua na formação de lipoproteínas de baixa densidade ligadas à aterosclerose e conseqüentemente aumenta a predisposição ao infarto agudo do miocárdio. Isso ocorre porque o mercúrio leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), intensificando estímulos inflamatórios e a formação de produtos de glicação avançada. Somado a isto, o metal pode atuar também na inativação da enzima paraoxonase, que tem função importante na prevenção de aterosclerose, por diminuir a oxidação de LDL e atuar no transporte reverso de colesterol (Lemos et. al., 2012; Genti et. al., 2017).

Já está bem documentado na literatura que o infarto agudo do miocárdio ocorre quando há uma interrupção do fluxo sanguíneo para o miocárdio ventricular devido ao estreitamento das artérias coronárias ou sua total obstrução (pela ruptura aguda da placa de ateroma). Sem o fluxo sanguíneo, o fornecimento de nutrientes e oxigênio para as células é interrompido, causando isquemia e necrose, isso afeta o funcionamento cardíaco e pode levar à morte (Figura 5) (Stefanon et. al., 1994; Fernandes, et.al., 2015; Begoña et. al., 2019).

Contudo, não há relatos se indivíduos expostos cronicamente ao mercúrio apresentam aumento da magnitude dos eventos ocasionados pelo infarto agudo do miocárdio.

Os valores de referência aceitáveis de mercúrio, estabelecidos pelos órgãos regulamentadores, não discriminam os indivíduos com risco de doenças cardiovasculares, dentre elas, o infarto agudo do miocárdio, responsável por maior índice de mortalidade entre as doenças cardíacas.

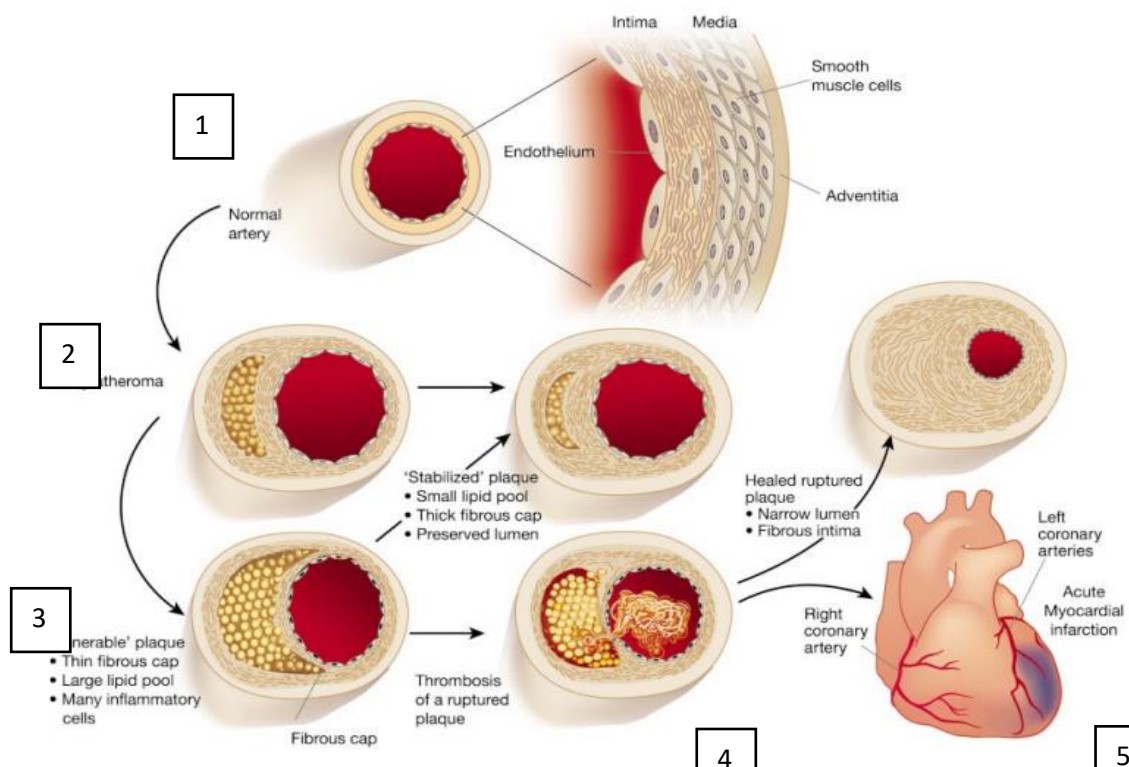


Figura 5: Esquema de evolução das placas de ateroma e trombose que levam ao infarto do miocárdio.

1) Artéria e endotélio normais; 2) O ateroma começa a ser formado quando, por ação de células inflamatórias e circulação aumentada de lipídeos sanguíneos, ocorre a deposição de núcleos de lipídeos nas artérias; 3) A capa fibrosa que envolve o núcleo de lipídeos torna-se suscetível à ruptura quando leucócitos secretam proteinases que degradam a matriz extracelular, e quando citocinas pró-inflamatórias limitam a síntese de colágeno. 4) Ao se romper, a placa entra em contato com o sangue, que se coagula e as plaquetas são ativadas pela trombina e propiciam a formação de trombos; 5) Quando o trombo oclui a artéria ocorre o infarto agudo do miocárdio (Adaptado: Lizzy, 2002).

1.8 ELETROCARDIOGRAMA

A análise funcional da atividade elétrica do coração é um recurso bastante viável, muito utilizado na prática clínica por ter um custo relativamente baixo, não ser invasivo e representar de modo eficiente a sequência e a ciclagem de ativação elétrica do coração

A partir do nó sinoatrial é gerado um potencial de ação que segue ao nó atrioventricular, feixe de His, ramos direito e esquerdo, e por fim, rede de Purkinje e finalmente ao miocárdio ventricular. Esse potencial elétrico é captado por eletrodos e posteriormente representado através do traçado do eletrocardiograma (ECG) (Figura 6). O traçado do ECG é uma representação da atividade elétrica cardíaca, e através das ondas, segmentos e intervalos deste traçado pode-se analisar informações relacionadas à sequência de ativação elétrica miocárdica.

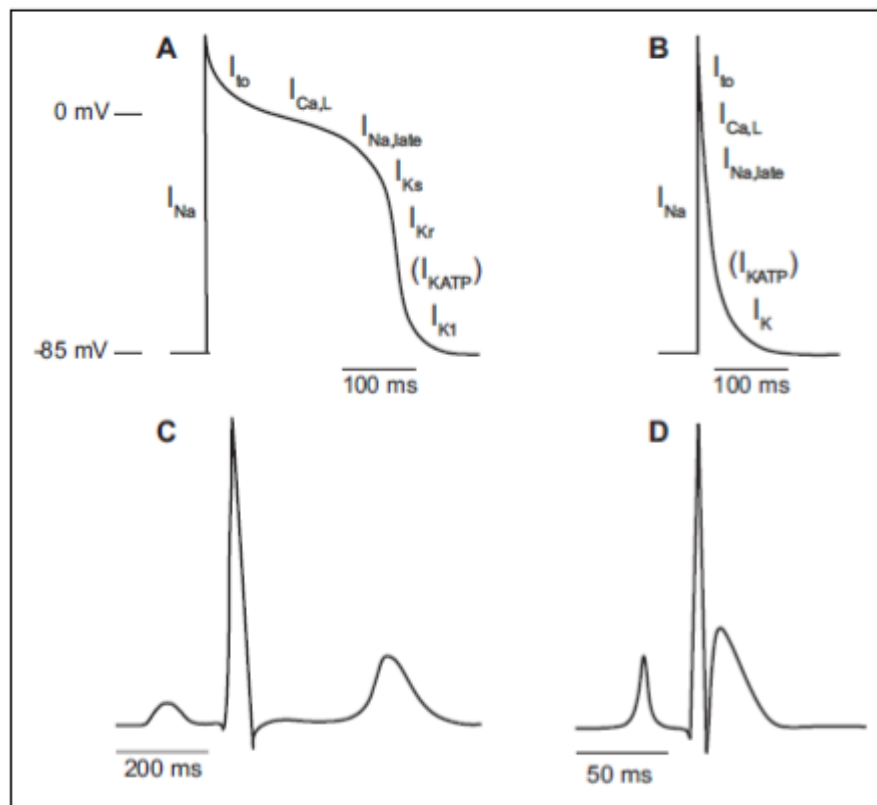


Figura 6: Comparando as diferenças entre os potenciais de ação e suas correntes iônicas em: A) Humanos B) Ratos (repolarização mais rápida). Traçado do Eletrocardiograma, derivação DII, em C) Humanos D) Ratos. (Hundahl et al., 2017).

A Onda P é a primeira onda do ECG normal e representa a depolarização dos átrios, o complexo QRS mostra a depolarização dos ventrículos e a Onda T indica a repolarização ventricular (Figura 7).

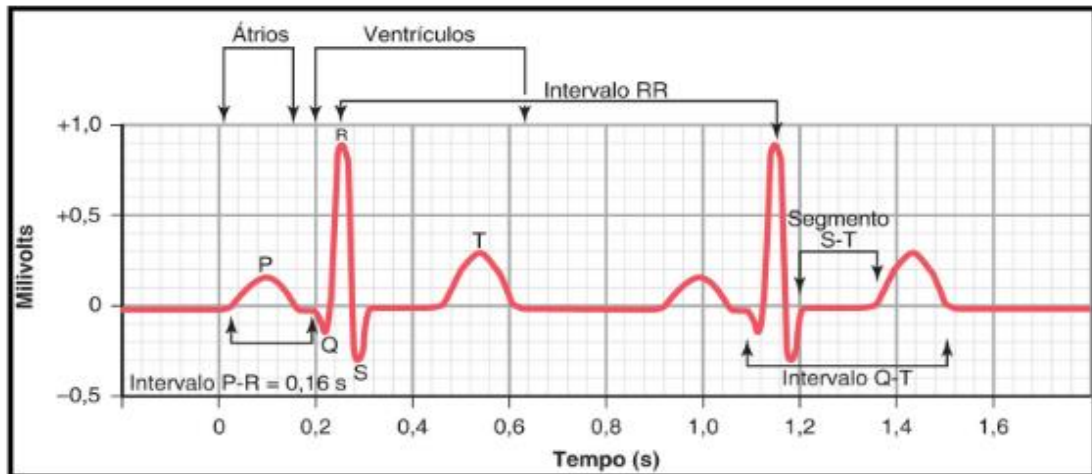


Figura 7: Traçados do Eletrocardiograma (ECG) representando a atividade elétrica cardíaca. Onda P: depolarização dos átrios; onda QRS: despolarização dos ventrículos; onda T: repolarização dos ventrículos; intervalo PR: transmissão da despolarização dos átrios para os ventrículos; intervalo RR: relacionado ao ritmo cardíaco; intervalo QT: atividade de despolarização e repolarização ventricular; segmento ST: fase inicial da repolarização dos ventrículos (Guyton e Hall, 2011).

Alterações no traçado eletrocardiográfico, como uma onda Q com amplitude e duração aumentada pode estar relacionada a uma necrose no tecido cardíaco, assim como um aumento na amplitude de QRS pode indicar uma hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) (SBC, 2003).

O ritmo cardíaco é avaliado através da medida dos intervalos entre os ciclos cardíacos (R-R). A frequência cardíaca corresponde a quantos ciclos ocorrem a cada minuto, sendo expressa por batimentos por minuto (BPM). Ratos Wistar adultos apresentam uma frequência cardíaca de 300 a 400 bpm, estes valores podem variar de acordo com a idade, situação de estresse ou efeito de anestésicos, por exemplo (SBC, 2003; Pezolato et. al., 2017).

Os intervalos entre as ondas do eletrocardiograma representam a sequência de ativação completa do coração. Por exemplo, o Intervalo PR (iPR) está relacionado à transmissão da despolarização dos átrios para os ventrículos, por esse motivo relaciona-se à ocorrência de bloqueios atrioventriculares.

O segmento ST (sST) representa a fase inicial da repolarização dos ventrículos e encontra-se ao nível da linha de base do eletrocardiograma. Desnivelamentos neste seguimento podem sugerir lesão isquêmica cardíaca.

O infarto agudo do miocárdio leva a uma isquemia do músculo cardíaco e, posteriormente a uma injúria seguida de necrose. Tais eventos levam às seguintes alterações no ECG: mudança na onda T durante a isquemia (Figura 8-A); supra desnivelamento de ST na injúria ou lesão; modificações no perfil da onda Q como consequência de necrose (SBC, 2003).

Também são observadas extrassístoles isoladas (ESI) que são geradas por focos ectópicos e representadas por complexo QRS prematuro, não precedidos pela onda P (Figura 8-B); bloqueios atrioventriculares que são representados por ondas P não seguidas pelo complexo QRS, indicando uma falha na transmissão do impulso elétrico dos átrios para os ventrículos; e as taquicardia ventriculares (TV) que são determinada por ritmo cardíaco instável, FC aumentada e por três ou mais contrações ventriculares prematuras e seguidas (Figura 8-C) (Walker et.al., 1988).

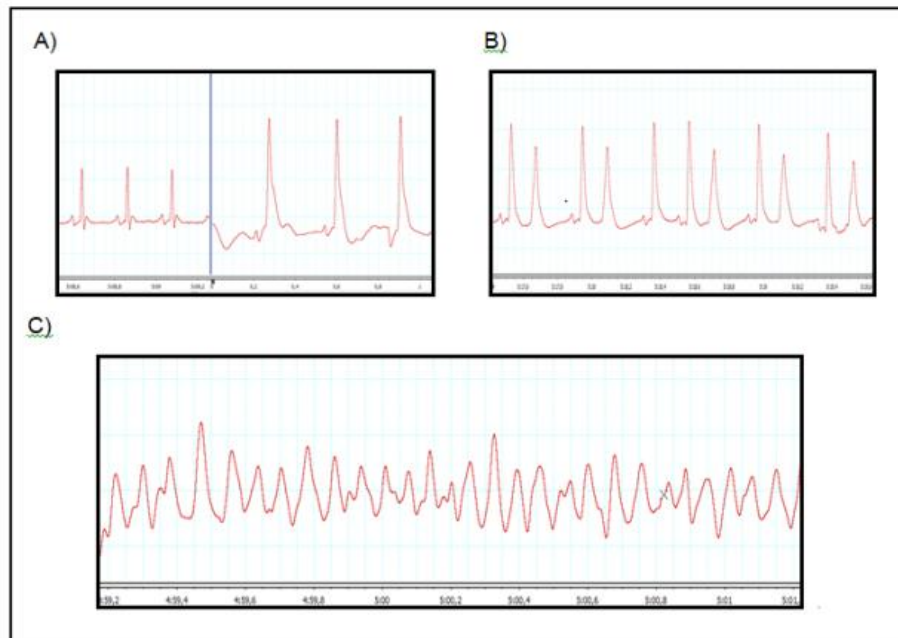


Figura 8: Traçados alterados após infarto. A) Diferença das ondas do eletrocardiograma antes e após-infarto, observa-se que após a cirurgia ocorre alargamento e aumento de QRS, bem como supra de ST; B) Extrassístoles seguidas de ondas normais de eletrocardiograma; C) Taquicardia ventricular registrada no período de 4min59s até 5min1s em eletrocardiograma de rato submetido à cirurgia de infarto.

Considerando todas as alterações isoladas que o infarto agudo do miocárdio e a intoxicação por mercúrio podem causar ao sistema cardiovascular, o presente estudo busca analisar a relação entre esses dois fatores. Apenas no ano 2016, cerca de 17,9 milhões de indivíduos foram a óbito devido às DCVs, o que corresponde a 31% do total de mortes no mundo. Deste total de óbitos, cerca de 85% foram atribuídos à acidentes vasculares cerebrais e infartos agudos do miocárdio (WHO, 2019).

A relevância do presente estudo, se destaca pelo alto índice de mortalidade e comorbidades relacionada a essa doença. Como o mercúrio está associado ao agravamento das doenças cardiovasculares (DCVs), é de extrema importância que a interferência deste metal sobre o sistema cardiovascular seja melhor compreendida. Vassallo et al. (2018) destacaram a importância de analisar a influência desse metal no sistema cardiovascular, e sugeriram que pacientes acometidos por doença coronariana, hipertensão e doenças vasculares, deveriam ter seus níveis sanguíneos de mercúrio avaliados. Adicionalmente, os autores, sugeriram a criação de uma função dose-resposta relacionando o infarto do miocárdio à exposição ao mercúrio, afim de embasar futuras regras para uma regulação mais rígida das emissões de mercúrio no meio ambiente.

Diante do exposto, o presente estudo foi realizado a fim de verificar se a exposição ao mercúrio exerce influência sobre a atividade elétrica cardíaca, parâmetros hemodinâmicos, produção de espécies reativas e oxigênio e mortalidade de animais submetidos à cirurgia de infarto.

Considerando os efeitos da exposição ao mercúrio sobre o sistema cardiovascular e os prejuízos causados ao músculo cardíaco, após o infarto do miocárdio, a hipótese deste estudo é que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio agrava os desfechos fisiopatológicos desencadeados pelo infarto agudo do miocárdio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Objetivo 1) Avaliar se as alterações eletrocardiográficas, hemodinâmicas e a produção de espécies reativas de oxigênio são magnificadas ao associar dois fatores que afetam o sistema cardiovascular: a exposição crônica ao Hg e o Infarto do Miocárdio (IM).

Objetivo 2) Avaliar se há aumento da mortalidade em animais submetidos ao IM que foram previamente expostos ao mercúrio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar medidas hemodinâmicas de pressões arteriais e intraventriculares do ventrículo esquerdo e suas derivadas temporais;

2.2.2 Quantificar arritmias cardíacas (Extrassístoles, bloqueios atrioventriculares, taquicardias ventriculares e fibrilações) e analisar alterações na frequência cardíaca e no traçado do EGC na fase aguda (20min).

2.2.3 Analisar a hipertrofia cardíaca e a congestão pulmonar;

2.2.4 Analisar o estresse oxidativo a partir da detecção do ânion superóxido e óxido nítrico no tecido cardíaco.

2.2.5 Correlacionar os achados relacionados aos objetivos acima com a exposição ao mercúrio

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS DE ESTUDO

Nesse estudo foram utilizados 290 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com idade entre 10 e 12 semanas de vida e peso entre 230 a 250 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo biotério central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração, sob controle da temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas. O uso e cuidado destes animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob número 14/2018 e 24/2020.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- Cirurgia Fictícia + Controle Veículo (SHAM+Salina)
- Cirurgia Fictícia + Exposição Crônica ao Cloreto de Mercúrio (SHAM+Hg)
- Infarto do Miocárdio + Controle Veículo (IM+Salina)
- Infarto do Miocárdio + Exposição Crônica ao Cloreto de Mercúrio (IM+Hg)

Foram utilizados 200 ratos para a indução do infarto do miocárdio distribuídos entre os grupos: IM, IM+Hg. Os demais (90 ratos) foram distribuídos entre os grupos que submetidos à cirurgia fictícia: SHAM+Salina, SHAM+Hg.

Durante as cirurgias, cerca de 33% dos animais vieram a óbito. Considerando os animais que sobreviveram à cirurgia, não houve índice de mortalidade posterior entre aqueles que compunham os grupos SHAM. Cerca de 21,43% dos animais do grupo IM+Salina foram a óbito em até 24 horas após o IM. 27,72% dos animais do grupo IM+Hg morreram em até 24 horas após a cirurgia, 4,54% morreram nas 48 horas seguintes e mais 4,54% nas próximas 72 horas.

3.2 EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂)

Os ratos pertencentes ao grupo Controle Veículo (SHAM + Salina) receberam, diariamente, injeções intramusculares de salina (NaCl 0.9% - 0,1 mL/300g de rato) durante 4 semanas.

Os ratos pertencentes ao grupo de exposição crônica ao cloreto de mercúrio receberam, no primeiro dia do tratamento, uma injeção intramuscular (no músculo quadríceps) contendo quantidade suficiente de solução de cloreto de mercúrio (4,34µg/kg), dissolvido em salina, para atingir a concentração plasmática de 20nM. Nos dias subsequentes, levando em consideração que a meia-vida do HgCl₂ é 37 dias (Azevedo, 2003), os ratos receberam doses diárias de reforço (0,07 µg/kg) contendo somente a quantidade que eles excretariam em um dia, durante 4 semanas, para o cálculo das doses foi utilizada a seguinte equação: Dose (D)= Volume de Distribuição (VD) x Concentração Plasmática (CP), segundo protocolo experimental desenvolvido por Wiggers et al. (2008), apresentado na figura 9.

<p>Massa Molar do HgCl₂ = 271,5g</p> <p>271,5g – 1L – 1M</p> <p>271,5 mg – 1ml – 1M</p> <p>Concentração de HgCl₂ desejada: 20nM</p> <p>0,000000271mg – 1ml – 1nM</p> <p>x – 1ml – 20nM</p> <p>x= 5,43ng/ml (Concentração Plasmática)</p> <p>Dose= Volume de Distribuição x Concentração Plasmática (D=VDxCP)</p> <p>Dose: ?</p> <p>VD: Quantidade total de água corporal (80%). 1kg de animal = 800ml de líquido</p> <p>CP: 5,43ng/ml</p> <p>D=800x5,43=4344ng/ml ou Dose de Ataque= 4,34mg/kg</p> <p>Dose de manutenção</p> <p>Eliminação total: 2,17mg/kg → 0,07mg/kg/dia</p>

Figura 9: Protocolo de Exposição Crônica ao HgCl₂. Adaptado de Wiggers et al. (2008)

3.3 CIRURGIA DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Após 3 semanas de exposição ao cloreto de mercúrio ou salina os animais foram anestesiados com Cetamina (70-90mg/Kg) e Xilazina (7-9mg/Kg) para realização de cirurgia de indução do infarto do miocárdio. Após toracotomia do lado esquerdo entre o terceiro e quarto espaço intercostal, o músculo peitoral foi separado e as costelas expostas. O coração foi gentilmente exteriorizado. O ramo interventricular anterior da coronária esquerda foi ligado aproximadamente a 3 mm distal à sua origem através do uso de fio mononylon 6.0 (Figura 10). Após o coração ser colocado no lugar e o tórax fechado, os animais retornaram à respiração normal. O procedimento cirúrgico do infarto, após abertura do tórax, durou no máximo 30 s. Os grupos, SHAM e Hg + SHAM, passaram pelas mesmas etapas citadas acima com exceção da ligadura da artéria coronariana.

A

B

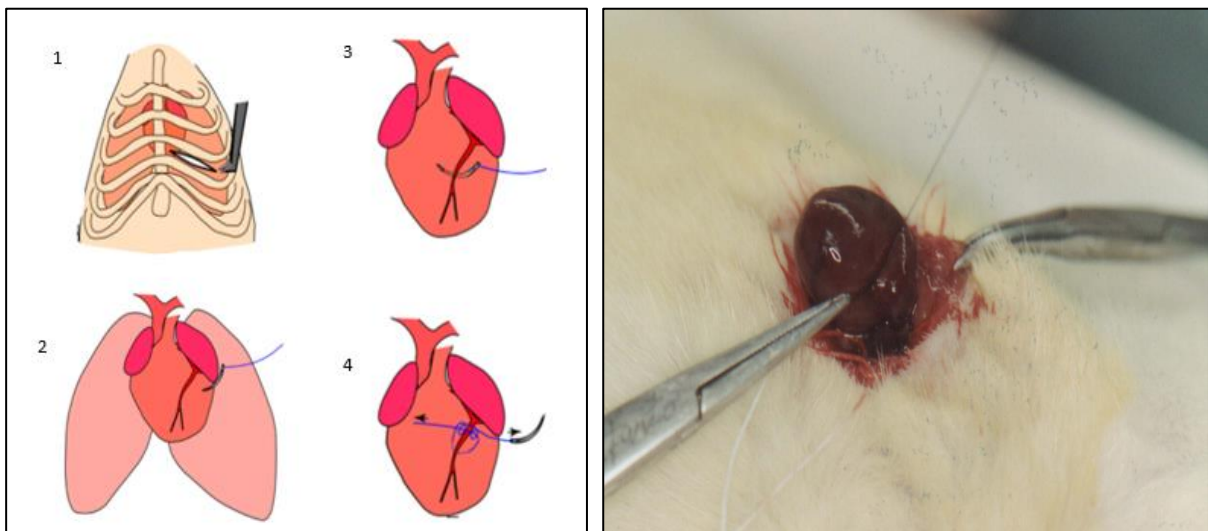


Figura 10: A) Cirurgia de indução ao infarto agudo do miocárdio. 1) Toracotomia entre o terceiro e quarto espaço intercostal; 2) Exposição do coração; 3) Localização do ramo interventricular anterior da coronária esquerda; 4) Ligadura da artéria (Adaptado: Mahmoud et al., 2014). B) Cirurgia de indução ao infarto do miocárdio (Arquivo da professora Aurélia).

3.4 AVALIAÇÃO DO RITMO CARDÍACO APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO

Para avaliação das arritmias, os animais previamente anestesiados foram posicionados em mesa cirúrgica para registro eletrocardiográfico com o auxílio de um pré-amplificador (BioAmp, AdInstruments, Austrália) conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, AdInstruments, Austrália ou Byopac Systems, Inc; CA)

por 5 minutos antes da cirurgia, na derivação D1. Após indução do infarto do miocárdio, descrito anteriormente, foi obtido o registro eletrocardiográfico por 20 minutos após à cirurgia e gravados para análise off-line (Figura 11).



Figura 11: Animal anestesiado e submetido à análise eletrocardiográfica após a cirurgia de indução do infarto (Fonte: própria).

A análise de arritmias ventriculares foi realizada de acordo com a padronização de Walker et al. (1988). Os seguintes parâmetros foram medidos:

- A frequência cardíaca em intervalos de 5 minutos, sempre em períodos de ritmo sinusal;
- O número de extra-sístoles ventriculares;
- O número e a duração das taquicardias ventriculares (TV), caracterizado pela ocorrência de quatro ou mais extra-sístoles ventriculares consecutivas;
- A incidência de fibrilação ventricular (FV). A irreversibilidade da FV foi caracterizada após cinco minutos de cardioversão mecânica. Além disso, os animais tiveram suas arritmias analisadas pelo sistema de escores (Baczkó et al., 1997). A Tabela 1 apresenta os valores específicos para cada condição.

Tabela 1. Sistemas de Escores para a Caracterização da Gravidade das Taquiarritmias Cardíacas Após o Infarto

Arritmias	Escores
Nenhuma arritmia	0
TV < 10 segundos, sem F	1
TV entre 11 - 30 segundos, sem F	2
TV entre 30 - 90 segundos, sem F	3
TV entre 91-180 segundos ou FV < 10 segundo	4
TV > 180 segundos ou FV > 10 segundo	5
FV irreversível	6

(Baczko et al., 1997)

3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PONDERAIS E HEMODINÂMICOS

Após as quatro semanas de experimentação, o que equivaleu a uma semana após a indução do IM, todos os grupos experimentais foram submetidos a estudos hemodinâmicos (Figura 12).

Os animais foram mantidos aquecidos (37°C) e sob plano anestésico adequado (Cetamina: 70-90mg/Kg e Xilazina: 7-9mg/Kg). A artéria carótida comum direita foi canulada com cateter de polietileno (PE-50) que foi conectado a um transdutor de pressão TSD 104 ligado ao sistema de aquisição de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA). As medidas de pressão arterial sistólica (PAS em mmHg), pressão arterial diastólica (PAD em mmHg), pressão arterial média (PAM em mmHg), frequência cardíaca (em batimentos por minuto) e as derivadas de pressão positiva e negativa (dP/dt_{\pm} em mmHg/s) foram realizadas. Posteriormente, o cateter foi introduzido no interior do VE para medida da pressão diastólica final (PDfVE em mmHg) e pressão sistólica no VE (PSVE em mmHg). Após as avaliações, os animais foram sacrificados através de sobredosagem da associação de anestésicos cetamina e xilazina, administrados por via intravenosa. Em seguida o tórax foi aberto para a exposição e remoção do coração e pulmões. As câmaras cardíacas foram separadas e septo interventricular foi considerado parte do ventrículo esquerdo. Para estimar a hipertrofia cardíaca, foi realizado o cálculo da razão do peso do coração pelo peso corporal total dos animais (Cor/PC) e posteriormente este valor foi comparado entre os grupos.

Para avaliar a congestão pulmonar, o peso úmido dos pulmões também foi corrigido pelo peso corporal dos animais (PP/PC) e igualmente, comparado entre os grupos.



Figura12: Cronograma de Experimentos. Durante três semanas os animais receberam injeções intramusculares com cloreto de mercúrio. No final da terceira semana foram realizadas análises eletrocardiográficas nos animais durante 5 minutos, em seguida foram submetidos à cirurgia de infarto ou cirurgia fictícia, finalmente, mais 20 minutos de eletrocardiograma foram registrados. Os animais sobreviventes receberam injeções intramusculares com cloreto de mercúrio por mais uma semana. No final da quarta semana os animais foram anestesiados para a aferição dos dados hemodinâmicos. Após a realização do exame os animais foram eutanasiados, órgãos retirados e pesados, e amostras do músculo cardíaco foram armazenadas para posteriores análises bioquímicas.

3.6 ESTUDO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS: ESTRESSE OXIDATIVO DO CORAÇÃO

O experimento foi realizado em papilar de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Após a dissecação, os papilares foram imersos em eppendorf com solução tampão de Krebs-HEPES com 30% de sacarose durante uma hora. A seguir, foram embebidas em meio de inclusão para criostato (Tissue-Tek O.C.T.) e mantidas em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de realização dos cortes. Os papilares foram cortados com o criostato em seções de $10\text{ }\mu\text{m}$ de espessura e colocados em lâminas de vidro gelatinizadas.

3.6.1 Detecção “in situ” da formação de ânion superóxido

As lâminas foram colocadas em estufa a 37 °C por uma hora para derreter o meio de inclusão. Logo em seguida foram incubados durante 30 min a 37°C em tampão Krebs-Hepes (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 0,24 MgCl₂, 8,3 HEPES e 11 glucose, pH 7,4). Em seguida, o tampão foi escorrido. Posteriormente foi realizada a incubação com uma solução contendo HEPES, DHE (2 µM) e DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato -DAPI, 1:10.000), com ou sem TIRON, por 30 min em uma câmara umidificada protegida contra luz a 37 °. Decorrido este tempo, as lâminas foram montadas com meio de montagem cobertas com lamínula e então visualizadas com um microscópio invertido de fluorescência (Leica DM 2500, objetiva 40x), com uma câmera fotográfica Leica DFC 310 FX, foram utilizados os mesmos ajustes de imagem em ratos controle e expostos ao cloreto de mercúrio. A fluorescência foi detectada com um filtro de 568 nm e a quantificação foi realizada utilizando o software Image J (National Institutes of Health, EUA).

3.6.2 Detecção “in situ” da formação de óxido nítrico

As lâminas foram colocadas em estufa a 37 °C por uma hora para derreter o meio de inclusão. Logo em seguida foram incubados durante 30 min a 37°C em tampão fosfato (0,1 M) contendo CaCl₂ (0,45M), segundo protocolo de Marques, et.al. (2015). Em seguida, o tampão foi escorrido e o excesso, secado. Posteriormente foi realizada a incubação com uma solução contendo 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 a 8µM) diluído em solução tampão fosfato com CaCl₂ e DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato -DAPI, 1:10.000), com ou sem L-NAME, por 30 min em uma câmara umidificada protegida contra luz a 37°. Decorrido este tempo, as lâminas foram montadas com meio de montagem cobertas com lamínula e então visualizado com um microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x), com uma câmera fotográfica Leica DFC 310 FX. Foram utilizados os mesmos ajustes de imagem em ratos controle e expostos ao cloreto de mercúrio. A fluorescência foi detectada com um filtro ~500-560nm e a quantificação foi realizada utilizando o software Image J (National Institutes of Health, EUA).

3.7 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO

Para quantificar a área infartada o ventrículo esquerdo foi aberto e o tecido infartado foi visualizado por transluminação, uma vez que se diferencia do tecido remanescente por ser fibroso e fino. Após a visualização, a área de infarto foi separada do tecido remanescente e as bordas foram contornadas em papel milimetrado que posteriormente foi escaneado e a área de infarto calculada em mm² utilizando o programa IMAGE J.



Figura 13: Bordas do ventrículo esquerdo contornadas em papel milimetrado: tecido não infartado e da área de cicatriz. Fonte: Própria.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

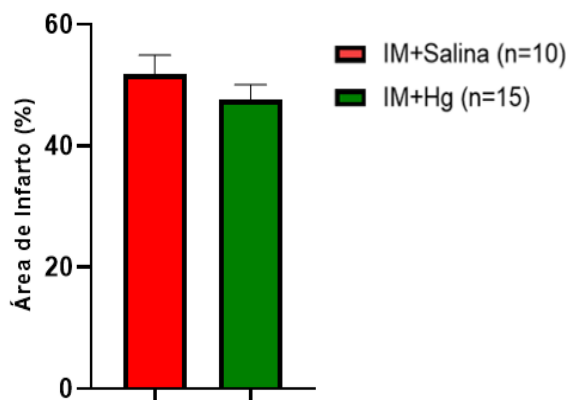
Todas as medidas foram apresentadas como média \pm EPM. Foram realizados testes de normalidade e usamos ANOVA uma ou duas vias para comparar as médias entre grupos seguida de post hoc de Tukey ou Fisher. Nos casos de comparação entre duas médias usamos o teste t de Student. Os valores foram considerados significantes para um mínimo de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 ÁREA DE INFARTO

A porcentagem da área de infarto do miocárdio não foi diferente entre os grupos IM (51,87±3,07) e IM+Hg (47,62±2,44), o que possibilitou a avaliação de um grupo mais homogêneo de animais infartados (Figura 14).

A



B



Figura 14: A) Tamanho da área de Infarto do Miocárdio (IM) comparada à área total do ventrículo esquerdo (VE), dado expresso em porcentagem (%). Dados expressos como média ±E.P.M. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student não pareado, valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes ($p = 0,96$). B) Imagem do pulmão e coração com área de cicatriz de infarto (Fonte: Arquivo Professora Aurélia).

4.2 MORTALIDADE

Após a cirurgia de indução ao infarto, o grupo que havia sido tratado com $HgCl_2$ apresentou mortalidade de 31,82% enquanto o grupo controle apresentou 21,43% de mortalidade em até 72 horas após as cirurgias (Figura 15).

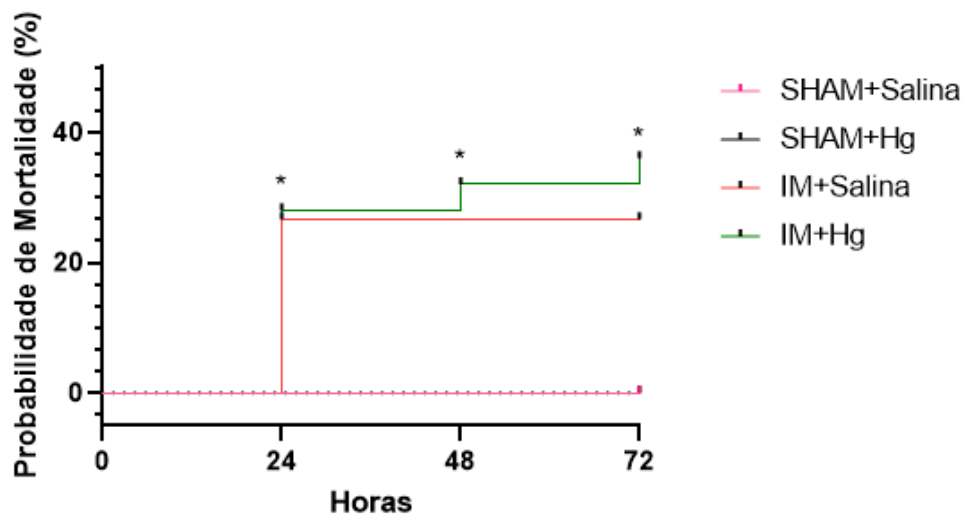


Figura 15: Probabilidade de mortalidade dos animais durante as 24, 48 e 72 horas posteriores às cirurgias. Os dados estão expressos em porcentagem (%). Para análise estatística foi utilizado Kaplan-Meier.

4.3 DADOS PONDERAIS

Foram utilizados para esse estudo animais de 12 semanas pesando entre 230-250g. Eles foram distribuídos entre os 4 grupos. Como esperado, todos os grupos apresentaram ganho de peso entre o primeiro e o último dia de tratamento, quando o protocolo de exposição ao mercúrio foi finalizado. Na quarta semana, os grupos infartados apresentaram menor ganho de peso em relação aos animais SHAM. Os grupos infartados não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao peso corporal (Tabela 2).

Tabela 2. Dados Ponderais

	SHAM+Sal (n=18)	SHAM+Hg (n=10)	IM (n=15)	IM+Hg (n=14)
Peso Inicial (g)	263,89±2	266,13±2	266,90±2	262,00±2
Peso Final (g)	361,72±5"	357,00±10"	341,10±7"	332,87±11*#"
Ganho de Peso (g)	98,33±4,76	99,21±7,34	74,20±8,85*#	77,21±8,26*#
Cor/PC (g)	2,82±0,04	2,87±0,12	3,83±0*#	3,73±0,22*#
VD/PC (g)	0,61±0,04	0,65±0,04	0,87±0,08*#	0,76±0,07*
PP/PC (g)	5,11±0,19	4,69±0,17	8,97±0,79*#	7,50±0,67*#+

Peso do Pulmão/Peso Corporal (PP/PC). Peso do Coração/Peso Corporal (Cor/PC). Dados expressos como média ±E.P.M. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: "vs Peso Corporal Inicial (PCi); *vs SHAM+Salina; #vs SHAM+Hg; +vs IM+Salina.

No presente estudo, foi detectada hipertrofia cardíaca nos animais infartados, como demonstrado pela razão entre o peso do coração e peso corporal (Cor/PC). A razão entre o peso do ventrículo direito e o peso corporal (VD/PC) foi maior no grupo IM + Salina quando comparado aos grupos SHAM, enquanto o grupo IM + Hg foi diferente apenas do grupo controle (Tabela 2).

Além disso, evidenciou-se um aumento na razão entre peso dos pulmões e peso corporal (PP/PC) dos animais infartados. O aumento neste índice foi estatisticamente maior no grupo IM + Salina quando comparado ao grupo IM + Hg (Figura 16).

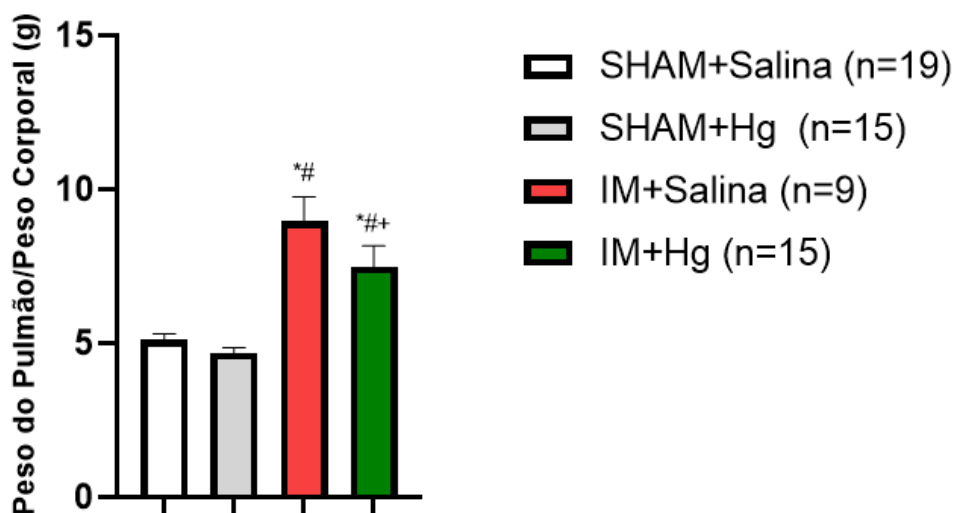


Figura 16: Peso do Pulmão/Peso corporal (PP/PC), dado expresso em gramas (g). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg; +vs IM + Salina.

4.4 DADOS HEMODINÂMICOS

Após uma semana da cirurgia, observou-se que o mercúrio provocou aumento na pressão arterial sistólica (PAS) dos animais, enquanto o infarto levou a uma diminuição deste parâmetro (Figura 17).

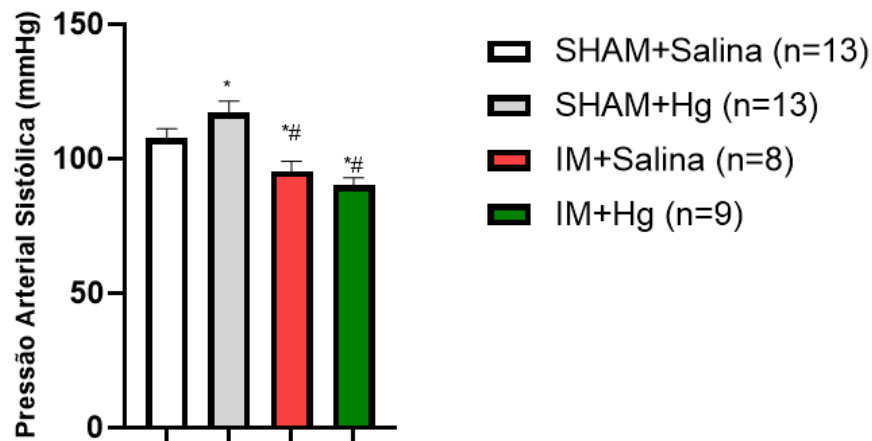


Figura 17: Pressão Arterial Sistólica (PAS), expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). Dados expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg.

A pressão arterial diastólica (PAD) também foi aumentada como consequência da exposição ao cloreto de mercúrio. Em contrapartida, a associação entre o mercúrio e o infarto desencadeou uma diminuição nesta medida (Figura 18).

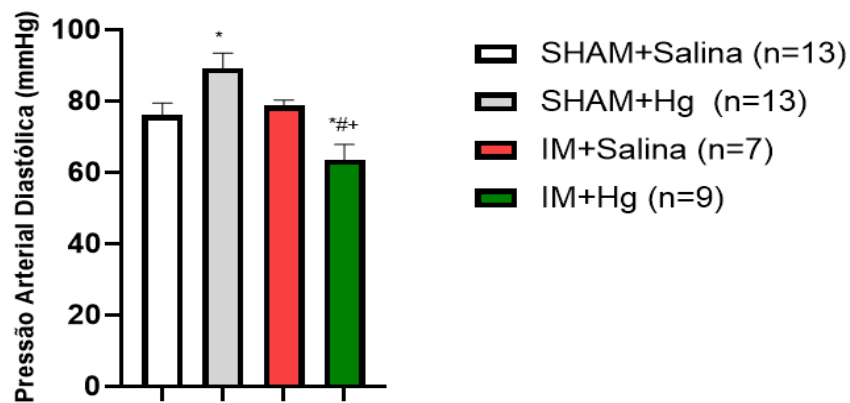


Figura 18: Pressão Arterial Diastólica (PAD), expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). Dados expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg; +vs IM + Salina.

Conforme demonstrado na Tabela 3, tanto a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), quanto a derivada temporal de máxima positiva e máxima negativa (dP/dt+ e dP/dt-) foram diminuídas nos grupos IM.

Tabela 3. Dados Hemodinâmicos

	SHAM+Salina (n=13)	SHAM+Hg (n=13)	IM (n=8)	IM+Hg (n=9)
PAS (mmHg)	105,08±3	114,71±4*	95,47±3,58*#	90,01±2,96*#
PAD (mmHg)	76,13±3,30	89,23±4,19*	78,82±1,44	63,60±4,27*#+
PSVE (mmHg)	113,96±5	118,3±5	98,61±2,94*#	91,70±4,04*#
PDfVE (mmHg)	7,31±1,25	5,38±1,44	15,95±2,84*#	9,56±1,38+
dP/dt+(mmHg/s)	5514,56±543	5779,31±728	3623,05±315*#	2782,07±322*#
dP/dt- (mmHg/s)	-3500,43±403	-3179,75±354	-2247,60±122*#	-1832,74±125*#

Pressão Arterial Sistólica (PAS); Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo (PSVE), Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDfVE), Derivada de Pressão pela Derivada de Tempo Máxima (dP/dt+), Derivada de Pressão pela Derivada de Tempo Mínima (dP/dt-). Dados expressos como média ±E.P.M. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de p<0,05 foram considerados significantes. p<0,05: *vs SHAM + Salina, #vs SHAM + Hg; +vs IM + Salina.

Os animais do grupo IM+Salina apresentaram aumento significativo na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE) em comparação com todos os outros grupos deste estudo (Figura 19).

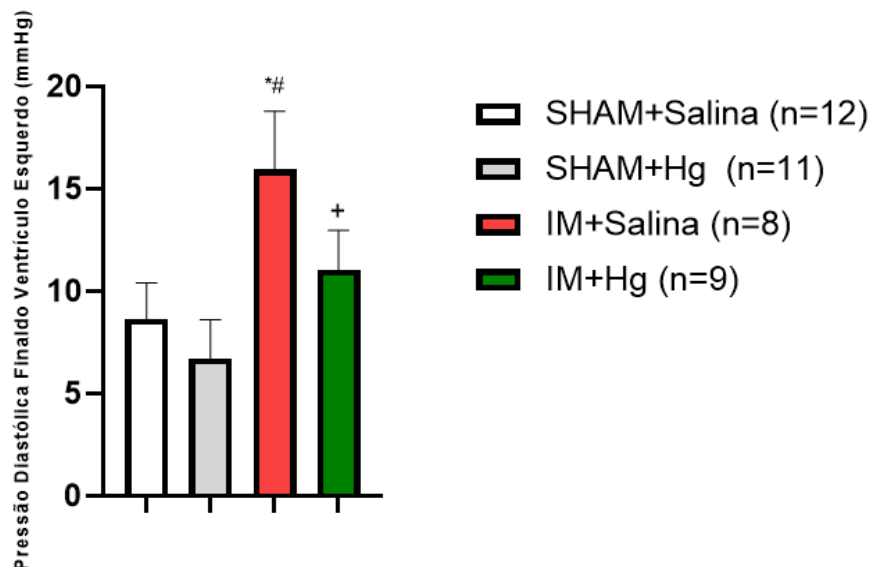


Figura 19: Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDfVE), expressa em milímetros de mercúrio (mmHg). Dados expressos como média ±E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de p<0,05 foram considerados significantes. p<0,05: *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg; +vs IM + Salina.

4.5 DADOS DO ELETROCARDIOGRAMA

Sabe-se que o infarto agudo do miocárdio provoca uma isquemia no tecido cardíaco que leva a uma súbita diminuição no aporte de nutrientes e oxigênio. Sem oxigênio, o miócito passa a utilizar o metabolismo anaeróbico e conseqüentemente promove acúmulo de lactato e ADP, enquanto há depleção de ATP no tecido. A diminuição de ATP afeta a função de bombas como a de Ca^{2+} e Na^{+}/K^{+} ATPase, o que promove alterações nos gradientes iônicos de membrana e potenciais de ação, afetando a contração e a eletrofisiologia cardíaca. Isto propicia a ocorrência de arritmias (Hundahl et al., 2017). Igualmente, o $HgCl_2$ foi associado a alterações de proteínas e bombas importantes na eletrofisiologia do coração (Fernandes et al., 2015; Vassallo et. al., 2018).

No presente estudo, foram realizadas análises eletrocardiográficas dos corações dos animais 5 minutos antes e 20 minutos após a cirurgia de indução do IM. Foram avaliadas frequência cardíaca e a ocorrência de arritmias como extrassístoles, taquicardias e bloqueios da condução elétrica cardíaca. A Tabela 4 apresenta as médias de FC, bloqueios atrioventriculares (BAV), número de extrassístoles ventriculares (ESI), taquicardia ventriculares (TV) e o coeficiente de Baszckó.

Tabela 4. Dados Eletrocardiograma

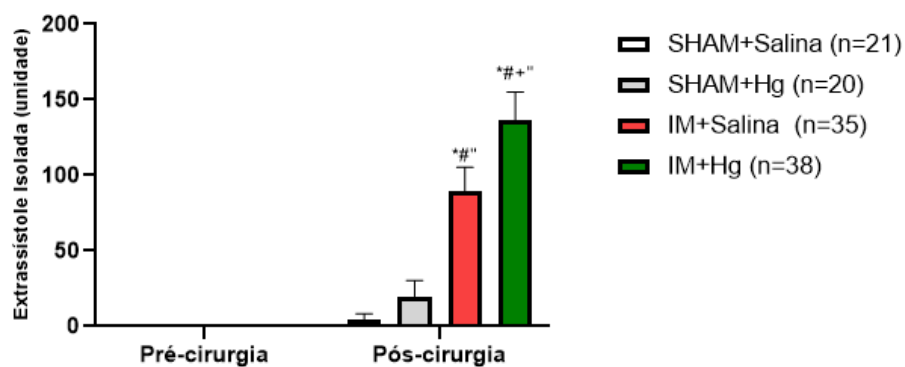
Após cirurgia	SHAM+Sal (n=21)	SHAM+Hg (n=20)	IM+Salina (n=37)	IM+Hg (n=40)
FC (bpm)	274,36±9	263,56±13	236,10±9*"	256,72±9
BAV (min)	0,00±0,00	0,81±0,67	4,35±0,96*#"	3,64±0,88*#"
ESI (uni)	4,24±4,14	19,70±10,77	89,13±16,19*#"	136,59±18*#"
TV (minutos)	0,00±0,00	0,36±0,30	1,67±0,33*#"	3,26±0,47*#"
Baszckó (escore)	0,24±0,19	0,75±0,35	2,97±0,30*#"	4,00±0,21*#"

Dados expressos como média \pm E.P.M. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey e Sidak. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: "vs Pré-cirurgia; *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg, +vs IM + Salina. Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm); Bloqueio Atrioventricular (BAV); Extra-sístole Isolada (ESI); Taquicardia Ventricular (TV).

Não houve diferenças significativas em relação à frequência cardíaca (FC) dos animais em nenhum dos grupos e em nenhum tempo analisado, nem antes ou após as cirurgias (Tabela 4).

A incidência de bloqueios atrioventriculares (BAV) após a cirurgia foi maior nos animais infartados (IM + Salina e IM + Hg), porém não houve diferença entre ambos. Em relação às extrassístoles ventriculares (ESI) e taquicardias ventriculares (TV), foi observado significativo aumento nos grupos de animais infartados quando comparados aos animais dos grupos SHAM. Além disso, as ESI e TV foram amplificadas nos animais que associaram o infarto à intoxicação por mercúrio (Figura 20 e 21).

A

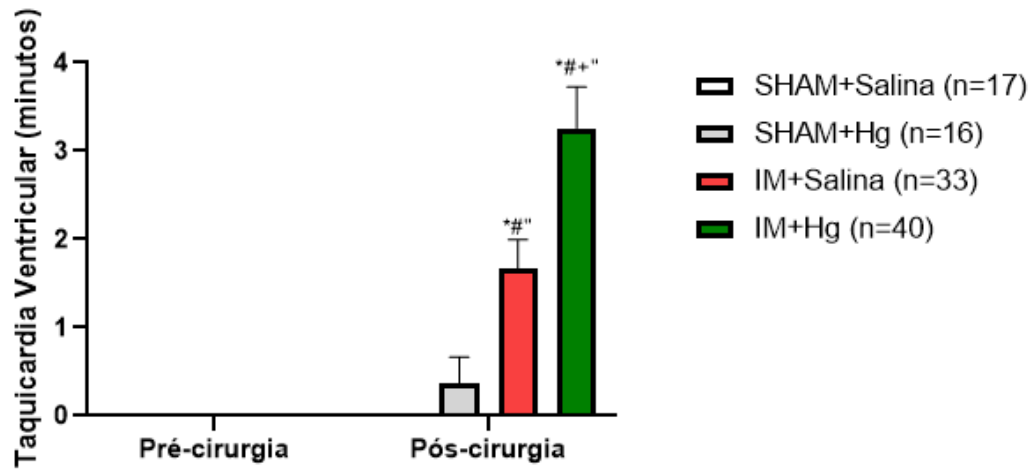


B



Figura 20: A) Número de Extrassístoles ventriculares isoladas (ESI), expressas em unidades. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina. B) Imagem de extrassístoles observadas em registro visualizado pelo programa LabChart (Fonte: Própria).

A



B

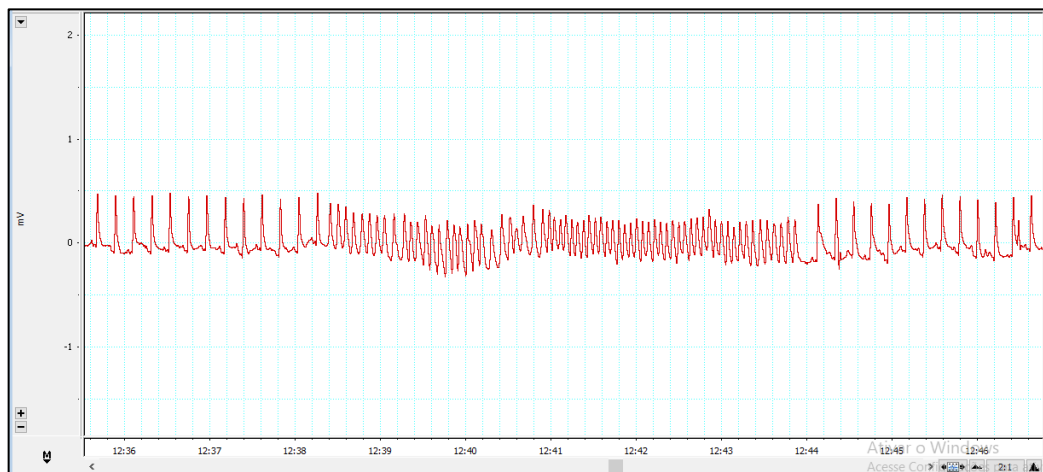


Figura 21: A) Porcentagem de tempo de ocorrência de taquicardias ventriculares (TV). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM + Salina. B) Imagem de taquicardia ventricular observada em registro visualizado pelo programa LabChart (Fonte: Própria).

O score de Basckó leva em consideração a gravidade das taquicardias ventriculares e a ocorrência de fibrilação ventricular, nesta avaliação também foi observado um pior índice nos grupos IM+Salina e IM+Hg quando comparados aos grupos SHAM+Salina e SHAM+Hg. Mais uma vez, os resultados foram ainda piores no grupo IM+Hg quando comparado a todos os outros grupos (Figura 22).

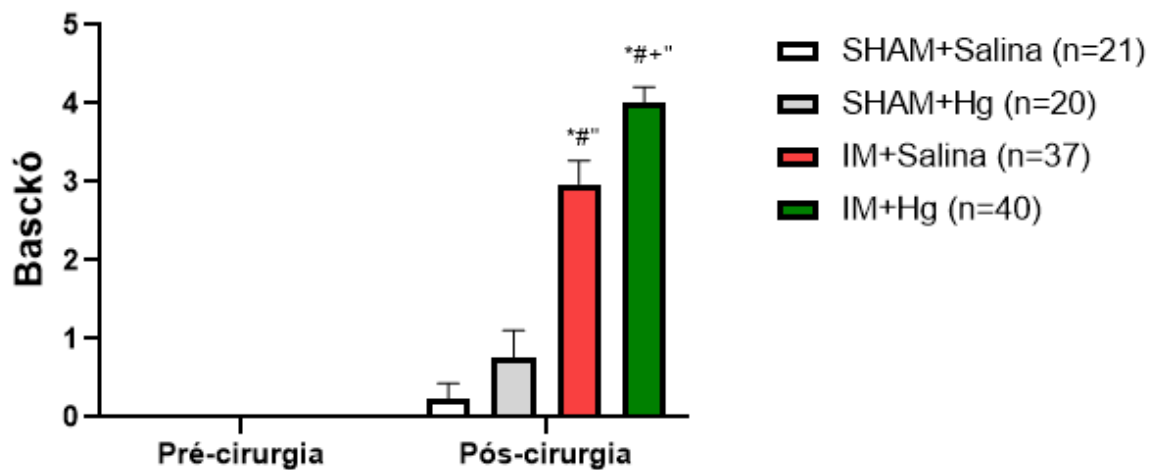


Figura 22: Escore de Basckó. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs SHAM+Salina; #vs SHAM+Hg

Conforme demonstrado na Tabela 5, houve forte correlação entre mortalidade e bloqueios, extrassístoles isoladas, taquicardias ventriculares e coeficiente de Bacskó.

Tabela 5. Correlação de Arritmias e Mortalidade

Arritmia	Mortalidade
BAV	$r=0,9487$
ESI	$r=0,9487$
TV	$r=0,7379$
Bacskó	$r=0,9487$

Para a análise estatística foi utilizada Correção de Spearman. Valores $> 0,70$ representam uma forte correlação. Frequência Cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm); Extrassístole Isolada (ESI); Taquicardia Ventricular (TV); Bloqueio Atrioventricular (BAV).

Seguindo as análises elétricas, além de alterações rítmicas, podemos fazer considerações a partir de mudanças no traçado do eletrocardiograma (ECG), onde avalia-se a amplitude da onda R, S e T e altura de ST (Tabela 6). Esses parâmetros demonstram alterações do ritmo cardíaco e, portanto, sua avaliação é essencial para o diagnóstico de algumas doenças cardíacas, como o IM.

Os parâmetros relacionados ao desnivelamento de ST são bem documentados em humanos para o diagnóstico do infarto, mas também podem ser observados em situações de desequilíbrio hidroeletrólítico, bloqueios de condução e canalopatias, por exemplo. Alguns estudos relacionam alterações no seguimento ST de ratos à isquemia e infarto, no entanto, não existem critérios bem definidos. Nos ratos, pode ser conveniente analisar a onda T, pois esta eleva-se acompanhando a onda S, ou analisar o intervalo QT, que tende a se alongar com o prolongamento do ST (Konopelski e Ufnal,2016).

Tabela 6 - Traçado do eletrocardiograma (Pré e Pós-cirurgia)

	Pré-cirurgia				Pós-cirurgia			
	SHAM+Sal (n=18)	SHAM+Hg (n=15)	IM+Sal (n=36)	IM+Hg (n=37)	SHAM+Sal (n=18)	SHAM+Hg (n=15)	IM+Sal (n=36)	IM+Hg (n=37)
Amplitude R (mV)	0,17±0,02	0,16±0,02	0,18±0,02	0,19±0,02	0,16±0,03	0,23±0,05	0,33±0,03*"	0,32±0,03*"
Amplitude S (mV)	-0,03±0,01	-0,03±0,01	-0,02±0,02	-0,02±0,2	0,00±0,02	0,00±0,02	0,13±0,02*#"	0,10±0,02*#"
Altura ST (mV)	0,03±0,01	0,01±0,01	0,00±0,01	0,00±0,01	0,09±0,03	0,14±0,06	0,39±0,03*#"	0,36±0,03*#"
Amplitude T (mV)	0,10±0,02	0,07±0,03	0,08±0,02	0,18±0,04	0,10±0,03	0,15±0,06	0,42±0,04*#"	0,39±0,04*#"

Dados expressos como média ±E.P.M. Os valores foram considerados significantes para $p < 0,05$. $p < 0,05$: "vs Pré-cirurgia; *vs SHAM + Salina; #vs SHAM + Hg.

Ao comparar as médias entre os grupos, não foi observada diferença na altura de ST no período anterior às cirurgias. Porém, no período após as cirurgias foi possível observar que os animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio (IM + Salina e IM + Hg) apresentaram supra desnivelamento de ST quando comparados aos animais submetidos à cirurgia fictícia (SHAM + Salina e SHAM + Hg) (Figura 23).

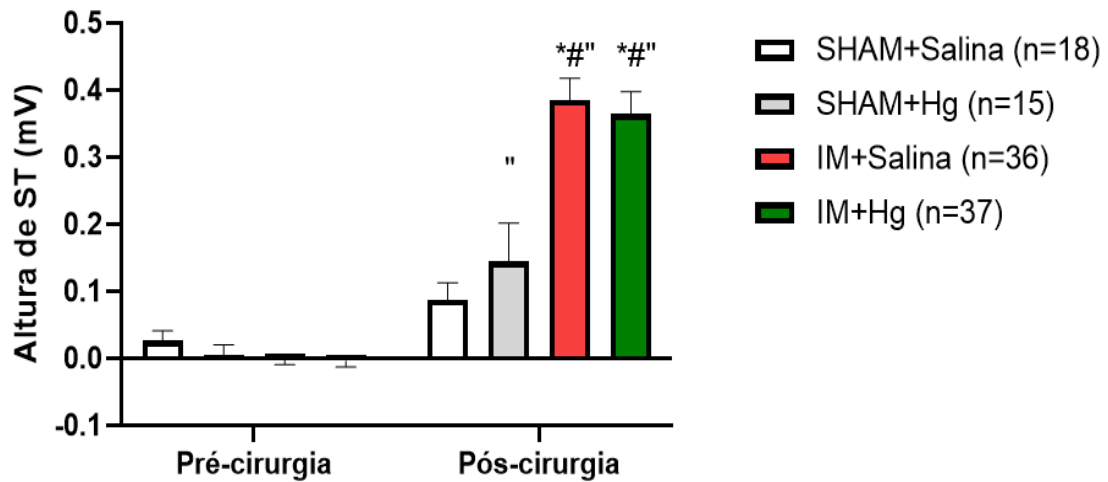


Figura 23: Altura de ST antes da cirurgia, expressa em milivolts (mV). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.6 DADOS BIOQUÍMICOS

Conforme demonstrado na Tabela 7, os animais infartados, apresentaram níveis de fluorescência mais intensos nos experimentos de DAF (Figura 24 e 25) e DHE (Figura 26 e 27). Tais dados indicam uma maior produção de óxido nítrico e ânion superóxido no tecido cardíaco dos animais infartados. Ao comparar os animais apenas infartados e os animais infartados e expostos ao mercúrio é possível afirmar que a exposição ao metal gera um agravamento na produção das espécies reativas de oxigênio aqui analisadas.

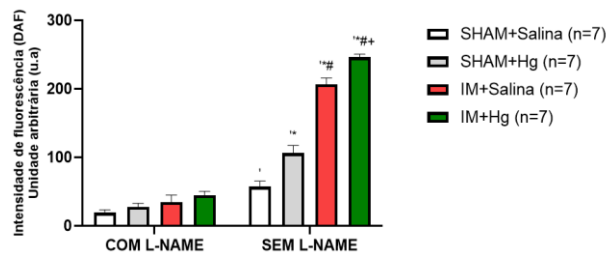
Tabela 7 – Intensidade de Fluorescência DAF e DHE – Unidade Arbitrária (u.a)

	Com L-NAME/TIRON				Sem L-NAME/TIRON			
	SHAM+Sal (n=7)	SHAM+Hg (n=7)	IM+Sal (n=7)	IM+Hg (n=7)	SHAM+Sal (n=7)	SHAM+Hg (n=7)	IM+Sal (n=7)	IM+Hg (n=7)
DAF	19,47±3,8	27,86±4,9	34,63±10	44,98±5,3	57,27±8	106,3±11*	206,98±9*#'	246,1±4*#+'
DHE	2,50±1,7	2,29±1,5	12,38±5,9	35,31±4,6	1,79±1,8	58,88±6*	170,88±7,3*#'	220,76±12*#+'

Dados expressos como média \pm E.P.M. Os valores foram considerados significantes para $p < 0,05$.

$p < 0,05$: 'vs L-NAME/Tiron; *vs SHAM+Salina; #vs SHAM+Hg, +vs IM+Salina.

A



B

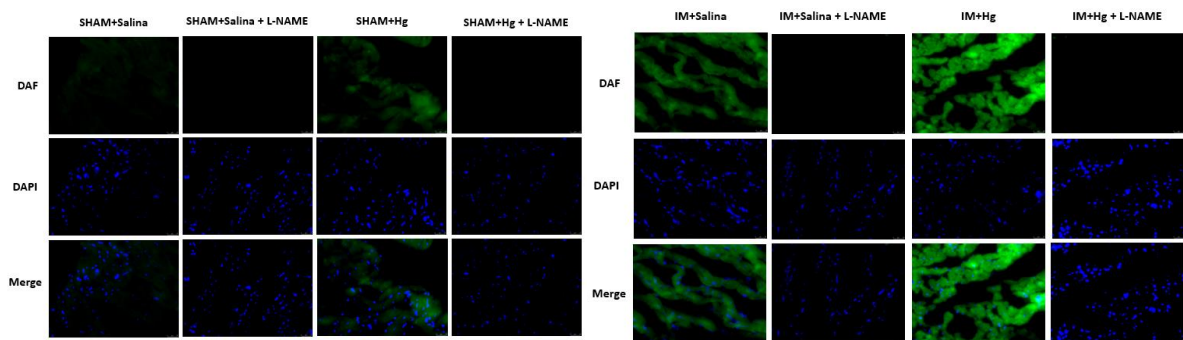


Figura 24: A) Intensidade de Fluorescência (DAF), com e sem L-NAME, expressa em unidade arbitrária (u.a). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs com L-NAME; *vs SHAM+Salina; #vs SHAM+Hg; +vs IM+Salina. B) DAF – Comparação dos grupos com e sem L-NAME. Imagens de fluorescência de óxido nítrico obtidas através de microscópio invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x) e câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.

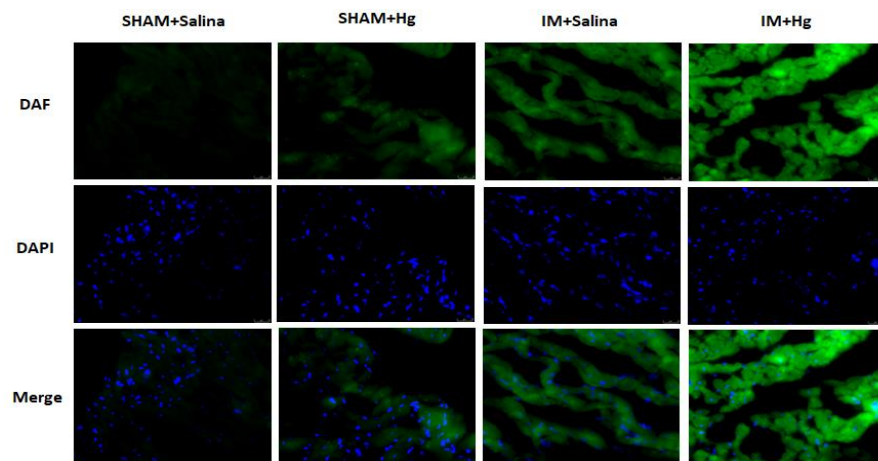
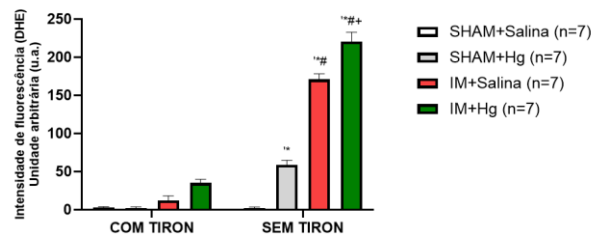


Figura 25: DAF – Comparação entre grupos. Imagens de fluorescência de óxido nítrico obtidas através de microscópio invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x) e câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.

A



B

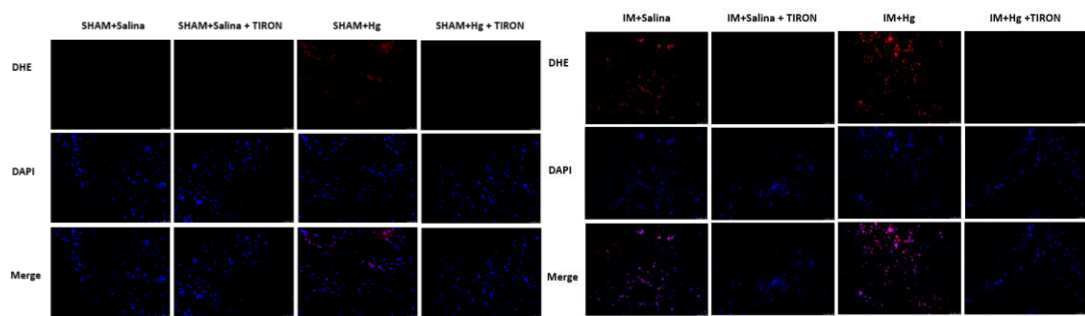


Figura 26: A) Intensidade de Fluorescência (DHE), com e sem TIRON, expressa em unidade arbitrária (u.a). Para a análise estatística foi utilizada ANOVA 2 vias, seguida de post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. $p < 0,05$: *vs com TIRON; *vs SHAM+Salina; #vs SHAM+Hg; +vs IM+Salina. B) DHE – Comparação dos grupos com e sem L-NAME. Imagens de fluorescência de óxido nítrico obtidas através de microscópio invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x) e câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.

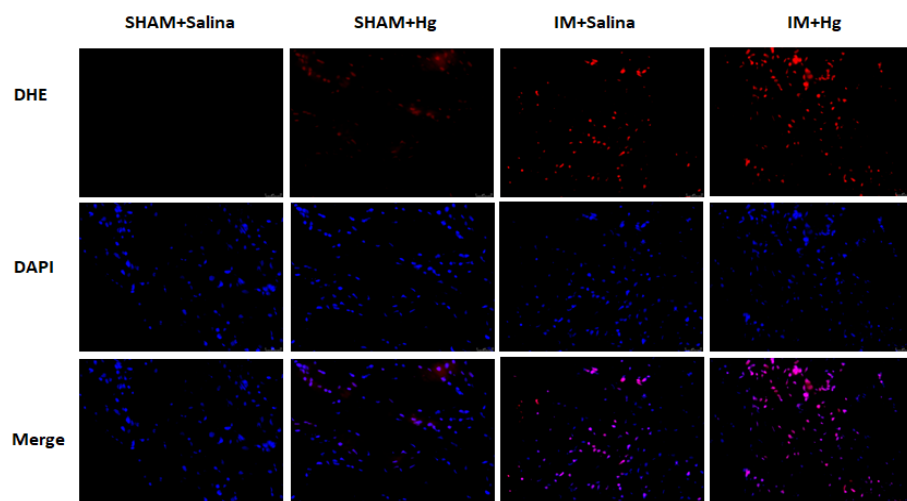


Figura 27: DHE – Comparação entre grupos. Imagens de fluorescência de ânion superóxido obtidas através de microscópio invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x) e câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.

5- DISCUSSÃO

Sabe-se que a mortalidade após o IM está, principalmente, relacionada com o tamanho da área de infarto. Nosso estudo utilizou animais com infartos moderados compreendidos entre 45 a 55%. O fato de não ter havido diferença em relação à área de infarto, permitiu que fosse realizada uma análise homogênea dos resultados, eliminando correlação da mortalidade com o tamanho da área de cicatriz. Os dados demonstram, pela primeira vez, que a mortalidade após a cirurgia foi aumentada nos animais do grupo de animais que associaram o infarto à exposição ao mercúrio. Cerca de 21,43% dos animais do grupo IM + Salina foram a óbito durante as 24 horas após a cirurgia, e não houve mortalidade nas horas seguintes. No grupo IM + Hg, 22,74% dos animais morreram até as 24 horas seguintes ao infarto, mais 4,54% morreram entre 24 a 48 horas e outros 4,54% morreram entre 48 a 72 horas, totalizando uma mortalidade de 31,82%. O aumento na mortalidade de animais infartados e previamente expostos ao mercúrio, pode ser sugerido, nesse estudo, pelo maior escore de arritmias analisado através do índice de Basckó.

O próximo passo do presente trabalho foi buscar entender o que estaria promovendo o aumento de arritmias nos animais que associaram o infarto à exposição ao mercúrio. Alterações no eletrocardiograma poderiam ser explicadas pelo fato de que tanto na intoxicação por mercúrio, quanto no infarto do miocárdio há estímulos pró-inflamatórios e pró-oxidantes (Hori e Nishida, 2008; Tinkov et. al. 2015; Faria et al., 2018).

De fato, os dados do presente estudo indicam uma maior produção de óxido nítrico e ânion superóxido no tecido cardíaco dos animais infartados. Ao comparar os animais apenas infartados e os animais infartados e expostos ao mercúrio, observou-se que a exposição ao metal gerou uma intensificação na produção das espécies reativas de oxigênio aqui analisadas.

Isso pode ser explicado pelo fato de o mercúrio ter relação com o desequilíbrio redox por afetar proteínas e conseqüentemente prejudicar o sistema antioxidante, além de provocar auto oxidação da membrana interna mitocondrial, favorecendo a produção de EROs. O metal também induz a ativação de xantina oxidase (XO) e NADPH-oxidase, ambas relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio (Houston, 2007; Tinkov et. al. 2015; Branco et. al., 2017; Genchi et. al., 2017;).

O aumento na produção de EROs, desencadeado tanto pelo mercúrio quanto pelo infarto, promove peroxidação lipídica de membranas celulares e estimula a abertura do trocador Na-Ca canais Ca^{2+} sensíveis à voltagem, além de promover a liberação e dificultar a recaptção de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático. Ao mesmo tempo as espécies reativas estimulam a transdução de sinal que estimulam a produção de citocinas inflamatórias que, entre outras ações, também interferem no equilíbrio de Ca^{2+} intracelular. Sabe-se que desequilíbrios iônicos em miócitos relaciona-se a alterações elétricas cardíacas e conseqüentemente a arritmias (Mukherjee et al., 2002; Hori e Nishida, 2008).

Prévios estudos realizados pelo nosso grupo também observaram um aumento de EROs em aortas e artérias mesentéricas de ratos expostos cronicamente a baixas doses de mercúrio (Wiggers et. al. 2008)

Sabe-se a produção excessiva de EROs pode causar danos celulares, apoptose devido a oxidação de lipídios, DNA, proteínas, além de estimular ativação de células inflamatórias e disfunção endotelial. Diversos estudos mostram que o mercúrio tanto estimula a produção de EROs quanto favorece a diminuição de proteínas antioxidantes em diversos órgãos e sistemas de animais e humanos (Miller e Woods, 1993; Huang et. al., 1996; Mahboob et. al., 2001; Reus et. al., 2003; Kim e Sharma, 2004; Chen et. al., 2005; Houston et. al., 2007; Pollack et. al, 2012; Santana, et. al., 2018; Oliveira et. al., 2019).

Uma dessas proteínas, a glutathiona, através da glutathionização, tem influência sobre as funções do sarcômero devido a modulação de seu estado redox. Na S-glutathionilação ocorre uma ligação do enxofre com o fósforo, o que interfere nas fosfatases e/ou quinases e influencia vias de fosforilação. A influência sobre vias de fosforilação afeta o funcionamento de estruturas cardíacas cruciais, como o receptor cardíaco de rianodina, SERCA2 e Na^+/K^+ ATPase. Além disso, a glutathionilação de proteínas regula numerosos processos fisiológicos, incluindo contração do miócito, síntese proteica e vasodilatação. Portanto, perturbações no estado de glutathiononização de proteínas podem contribuir para a etiologia da doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, hipertrofia cardíaca e aterosclerose. Estudos sobre proteínas glutathioniladas e seu papel crítico em doenças

cardiovasculares tem trazido perspectivas para o desenvolvimento de drogas e biomarcadores para alterações cardiovasculares (Pastore e Piemonte, 2013).

A relação entre EROs e MI também é bastante conhecida e estudada há muito tempo (Moris et al., 2017). Em 1998, Chen e colaboradores demonstraram que a superexpressão da enzima antioxidante SOD foi capaz de diminuir significativamente a área de infarto de camundongos.

Pesquisadores do nosso grupo, investigaram a associação entre o IM e exposição ao mercúrio, assim como no presente estudo, e também observaram um aumento na produção de EROs no grupo de animais que foram expostos ao mercúrio e submetidos à cirurgia de indução ao infarto. Os autores concluíram que a XO foi a responsável por este aumento de espécies reativas de oxigênio que levaram seus animais a uma disfunção endotelial vascular (Faria et. al., 2018).

Sabe-se que o mercúrio interfere em uma cascata de substâncias reguladoras endoteliais. O metal afeta a atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA), e a angiotensina II estimula a liberação de prostaglandinas em células do músculo liso. O metal ativa a fosfolipase A2 (através da ativação dos receptores AT1) que contribui para a formação do ácido lisofosfatídico e araquidônico ao catalisar a hidrólise de glicerofosfolípídeos na posição sn-2. Deste modo, o mercúrio contribui para a formação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que são metabólitos do ácido araquidônico, além de regular a expressão da COX-2 (Peçanha et. al. 2010; Furieri et. al.2011; Genchi, et. al, 2017).

A COX-2, por sua vez, aumenta a expressão da enzima NADPH oxidase, que estimula a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Rizzetti et. al. 2017). Em situações onde há aumento de espécies reativas de oxigênio (mais especificamente o ânion superóxido), o óxido nítrico (NO) associa-se a ele ficando indisponível para exercer sua função vasodilatadora no endotélio, o que dificulta o relaxamento do músculo liso vascular (Rizzetti et. al., 2018).

Pode-se sugerir também, que a maior mortalidade pudesse estar relacionada a alterações hemodinâmicas, visto que em situações como de IM, ocorrem alterações pressóricas que podem ser desencadeadas por disfunções endoteliais vasculares através do prejuízo na sinalização da enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial eNOS.

Sabe-se que a eNOS é relacionada à produção de óxido nítrico (NO), que por sua vez, possui papel essencial no endotélio vascular. A substância atua como vasorrelaxante, indutor de angiogênese e vasculogênese, além de mediar efeitos bactericidas dos macrófagos. A evolução adequada desse mecanismo foi relacionada à homeostase cardiovascular, biogênese ribossômica e síntese de proteínas. Tais eventos levam a uma adaptação às condições de estresse e se relacionam à longevidade excepcional. No entanto, a disfunção endotelial modifica este mecanismo, levando à alteração no metabolismo da parede vascular, à diminuição na biodisponibilidade e responsividade a vasodilatadores, bem como ao aumento do risco de morte (Villa et al., 2015).

A exposição a baixas concentrações de mercúrio também se relaciona a alterações vasculares, uma vez que favorece o estresse oxidativo endotelial e leva à lesão vascular, promovendo aumento da resistência vascular periférica. Já foi demonstrado anteriormente que tal resistência está associada a um maior risco de mortalidade (Lemos et al., 2012).

Considerando que tais alterações têm influência sobre a hemodinâmica cardíaca, foram analisados os parâmetros pressóricos dos animais.

Não houve diferenças significativas em relação à frequência cardíaca (FC) dos animais em nenhum dos grupos e em nenhum tempo analisado, nem antes ou após as cirurgias. Este resultado corrobora com a literatura, pois trabalhos utilizando este mesmo modelo de intoxicação crônica por mercúrio não demonstraram alterações na FC (Furieri et. al., 2011; Vassallo et. al., 2018). No entanto, alterações na FC foram observadas em estudos que utilizaram grandes concentrações agudas de HgCl₂ em corações isolados de ratos. Os autores sugerem que a alteração na FC poderia ser devido uma sobrecarga de Ca mioplasmático, que levaria a um estímulo do mecanismo de troca Na-Ca e conseqüentemente à geração de correntes despolarizantes (Massaroni et. 1995; Vassallo et. al., 1996).

Os resultados apresentados demonstraram que o grupo SHAM + Hg apresentou aumento dos índices de PAS e PAD comparado com grupo SHAM+Salina.

Massaroni et. al. (1995) não observaram alterações na FC e PAS ao utilizar uma dose aguda de mercúrio (0.5mg/kg). No entanto, Vassallo et. al. (1996) testaram uma dose de mercúrio maior (5mg/kg) que induziu a queda progressiva da PAS, FC e força de contração cardíaca. Uma maior concentração, administrada de forma aguda,

50mg/kg, diminuiu ainda mais esses parâmetros, além de desencadear arritmias em ratos, levando os animais a óbito em 1 minuto.

Em alguns experimentos crônicos com doses de exposição de mercúrio, o metal não foi capaz de influenciar a pressão arterial sistólica (PAS), pressão diastólica (PAD), pressão sistólica do VE (PSVE), $dP/dt+$ e $dP/dt-$. Apenas foi observado um pequeno aumento na pressão diastólica final do VE (PDfVE) (Furieri et. al., 2011; Vassallo et. al., 2018).

Os resultados do presente, bem como de estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, indicam que as alterações são dependentes da dose de mercúrio e tempo de exposição ao metal.

A associação entre mercúrio e IM (grupo IM+Hg), fez com que as PAS e PAD diminuíssem. Apesar da PAS também ter diminuído no grupo IM + Salina, a PAD permaneceu inalterada.

As análises de parâmetros pressóricos, também demonstraram que os animais infartados, expostos ou não ao mercúrio, apresentam diminuição na PAS, PSVE e $dP/dt+$ e $dP/dt-$.

Alterações nesses parâmetros reforçam a piora na funcionalidade cardíaca desencadeada pelo infarto. A PSVE representa a pressão dentro do ventrículo esquerdo, enquanto a PAS representa a pressão arterial durante a ejeção. Já a $dP/dt+$ e $dP/dt-$ são parâmetros que dizem respeito à derivada máxima e mínima da pressão ventricular esquerda ao longo do tempo. Essas medidas influenciam e são influenciadas pela pré e pós-carga ventricular, o que determina sua relação com a contratilidade cardíaca (Hamlin e del Rio, 2012).

Em um estudo realizado por Stefanon et. al (2009), em que os autores analisaram as alterações agudas e tardias após o IM, não foram observadas alterações nos parâmetros de PAS, PAD e PSVE. Contudo os pesquisadores identificaram aumento na PDfVE tanto no período agudo (3 dias) quanto no período tardio (30 dias) após cirurgia de indução de infarto. Em relação à $dP/dt+$ e $dP/dt-$, os autores registraram uma diminuição dos parâmetros apenas no período tardio após IM.

Outros estudos que avaliaram padrões hemodinâmicos também não observaram diferença na PAS, PAD, PSVE e FC quando compararam animais controle a animais

infartados. Porém foi registrado um aumento da PDfVE e diminuição da $dP/dt+$ e $dP/dt-$ nos animais que apresentaram menor função contrátil 60 dias após o IM. (Stefanon et al., 2013; Fernandes et al., 2015).

Os resultados hemodinâmicos obtidos no presente estudo mostraram-se associados àquelas alterações já bem documentadas após o IM. Pode-se inferir que as alterações pressóricas e arteriais foram causadas pelo IM e não pela exposição crônica a baixas doses de Hg.

Ao avaliar os parâmetros ponderais, não foram observadas diferenças significativas quando comparamos o ganho de peso do grupo SHAM + Salina com grupo SHAM + Hg. Este dado sugere que, baixas concentrações crônicas de mercúrio, não interferem no peso corporal dos animais, nesse estudo. De fato, outros estudos compararam a evolução de peso entre animais controle e animais expostos cronicamente ao $HgCl_2$ e também não observaram alterações no peso dos animais expostos ao metal (Furieri et al., 2011; Vassallo et al., 2018).

No entanto, foi observado um menor ganho de peso corporal nos animais infartados. Este resultado corrobora com outros estudos que também demonstraram perda de peso corporal já na primeira semana após o IM (Stefanon et al., 2013; Fernandes et al., 2015).

A perda de peso corporal ocorre após o IM por fatores associados à perda de apetite, o que leva a menor ingestão de alimentos. A caquexia pode se instalar em estágios mais avançados do remodelamento após o IM. (Faria et al., 2011)

A diminuição do peso é um indicativo de desenvolvimento de insuficiência cardíaca (IC). Faria et al. (2011) demonstraram que a perda de peso corporal correlacionou com o desenvolvimento da IC. Este dado é reforçado pelo fato de que os animais do grupo IM + Salina apresentaram um aumento PDfVE, dado que evidencia a instalação da doença já na primeira semana após o IM.

Esta alteração na PDfVE, por se relacionar à instalação da insuficiência cardíaca e congestão pulmonar, pode ser a causa do aumento do PP/PC no grupo IM + Salina quando comparado ao grupo IM + Hg.

Pode-se especular ainda, que a menor razão PP/PC, no grupo IM + Hg quando comparado ao grupo IM + Salina, se deva à ocorrência de resistência pulmonar em ratos expostos ao mercúrio. Rossoni et al. (1999) perfundiram pulmões isolados de

ratos em fluxo constante para medir a resistência pulmonar. Após iniciar infusão contínua de HgCl₂, observaram um aumento constante da pressão média de perfusão pulmonar, indicando um efeito vasoconstritor pulmonar produzido pelo metal. Os autores relacionam este achado ao fato de que o pulmão é um importante local na remoção do mercúrio da corrente sanguínea, visto que 10 a 20% do metal pode ser exalado após injeção intravenosa de mercúrio.

Sugerimos que esta redução na circulação sanguínea no pulmão pode promover uma diminuição na retenção de fluidos, bem como uma menor deposição de proteínas neste órgão, gerando assim um menor incremento de peso local. Além disso, pode haver algum sistema adaptativo, ainda não elucidado, agindo nestes animais sobreviventes à exposição ao mercúrio e ao infarto do miocárdio.

Nossos dados demonstraram um aumento na razão entre peso do coração pelo peso corporal (Cor/PC) nos animais infartados quando comparados aos animais SHAM + Salina e SHAM + Hg.

De fato, é esperado que o remodelamento cardíaco, após o IM gere hipertrofia e dilatação dos ventrículos através do rearranjo de proteínas e disfunção contrátil. Essas alterações estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento na insuficiência cardíaca (Grans et al., 2014). Tais características do remodelamento são detectadas pelo aumento dos parâmetros Cor/PC e PP/PC (Stefanon et al., 2013; Fernandes et al., 2015; Fernandes Corrêa et al., 2019). Além disso, o peso do ventrículo direito pelo peso corporal (VD/PC) foi maior nos grupos IM + Salina e IM + Hg, quando comparados ao grupo SHAM + Salina e SHAM + Hg, o que pode ser tipicamente avaliado como remodelamento cardíaco após o IM (Stefanon et al., 2013; Fernandes et al., 2015; Fernandes Corrêa et al., 2019).

Ainda, o aumento da razão VD/PC, demonstra a hipertrofia do VD. Essa razão foi menor no grupo exposto ao metal. Um estudo realizado pelo nosso grupo mostrou que o VD pode ser considerado um independente preditor da mortalidade e desenvolvimento da insuficiência cardíaca após o IM. Nesse estudo, os pesquisadores demonstraram que a função do VD esteve preservada, em ratos que não apresentaram aumento da PDFVE. Ainda, os autores mostraram que o aumento na expressão da SERCA esteve correlacionado com a preservação da função contrátil nessa câmara, diminuindo a mortalidade/morbidade dos animais submetidos à injúria (Fernandes et al., 2015). No presente estudo, observou-se que os animais que

sobreviveram ao IM e à exposição ao Hg tiveram menor hipertrofia do VD, podendo-se especular que seja esse, um dos fatores, que contribuíram para que os animais do grupo IM + Hg sobrevivessem à associação dos fatores ao fim da quarta semana.

Ainda que, tenham sido encontradas associações entre os dados hemodinâmicos e os dados ponderais, não encontramos nestes dados hemodinâmicos uma resposta para as maiores taxas de mortalidade em IM + Hg.

Outros autores sugeriram que o aumento da mortalidade em animais expostos ao mercúrio pode estar associado a alterações em proteínas importantes para a contratilidade cardíaca, bem como alterações em canais que influenciam os potenciais de ação e o ritmo cardíaco (Vassalo et. al., 1996; Vassallo et al., 2018).

De fato, ao analisar os dados eletrocardiográficos, observamos que animais do grupo IM + Hg apresentaram aumento de arritmias, evidenciadas pelo aumento de extrassístoles ventriculares, taquicardias ventriculares e do coeficiente de Bazckó. Testes estatísticos realizados posteriormente confirmaram uma forte correlação entre as arritmias e mortalidade.

6- CONCLUSÃO

Ao analisar os dados originais desse estudo podemos concluir que os animais expostos ao mercúrio, e com associação do infarto, apresentaram maior mortalidade como sugerido, pelo maior escore de arritmias analisado através do índice de Basckó. No que se refere às alterações hemodinâmicas observadas no grupo IM+Hg, essas não foram, suficientemente, compensatórias para amenizar os malefícios causados pelo aumento de EROs e arritmias neste grupo. Malefícios estes que foram diretamente relacionados ao aumento da mortalidade no grupo. Pode-se, portanto, afirmar que doses de exposição de HgCl₂ tornam piores os efeitos do infarto agudo do miocárdio, promovendo o agravamento dos eventos cardíacos desencadeados pelo IM, que pode indicar um pior prognóstico em infartados.

Os resultados deste estudo apresentam grande relevância para a saúde pública, pois evidenciam que a exposição ao mercúrio pode trazer consequências fisiológicas e bioquímicas que levam a um pior desfecho de uma das doenças que mais mata e que traz gastos importantes para a saúde pública. Além disso, enfatiza a importância de

que sejam criados controles e punições mais rigorosos no que diz respeito à contaminação por mercúrio ao meio ambiente. Também é essencial que a população seja conscientizada sobre os riscos deste metal e que sejam feitas análises mais constantes nas águas, peixes e até mesmo nos níveis sanguíneos da população em geral, e especialmente em indivíduos que sejam do grupo de risco para doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

- ALZAND, BSN. e CRIJNS, HJGM. (2010). Diagnostic criteria of broad QRS complex tachycardia: decades of evolution. **Europace**, 13(4), 465-472. doi:10.1093/europace/euq430
- BAKIR, F. et. al. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**. 1973; 181 (96): 230-241. doi: DOI: 10.1126/science.181.4096.230
- BARBOSA, KBF. et. al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. 2010; 23(4), 629–643. doi:10.1590/s1415-52732010000400013
- BEGOÑA. L.P.et. al. Molecular Imaging in Ischemic Heart Disease..**Curr Cardiovasc Imaging Rep**. 2019; 12(7): 31.Published online 2019 Jun 11. doi: 10.1007/s12410-019-9500-x
- BERNHOF RA. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. **Journal of Environmental and Public Health**. 2012. doi: 10.1155/2012/460508.
- BETTERIDGE, DJ. What is oxidative stress? **Metabolism**, 2000, 49(2), 3–8. doi:10.1016/s0026-0495(00)80077-3.
- BIGARELLA, CL. et. al. Stem cells and the impact of ROS signaling. **The Company of Biologists Ltd | Development**. 2014; 141, 4206-4218.
- BRANCO V. et. al. Impaired cross-talk between the thioredoxin and glutathione systems is related to ASK-1 mediated apoptosis in neuronal cells exposed to Mercury. **Redox Biol**. 2017, Oct. 13: 278–287.Published online 2017 Jun 1. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.024
- BRADY, WJ. et al., (2017). The differential diagnosis of wide QRS complex tachycardia. **The American Journal of Emergency Medicine**, 35(10), 1525–1529. doi:10.1016/j.ajem.2017.07.056
- CADENAS S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. **Free Radic Biol Med**. 2018; 117:76-89. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024.
- CHEN C. et.al., Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2 -deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. **Clin Chem**. 2005, 51: 759 –767.
- CHEN Z, et al. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice, **J Mol Cell Cardiol**. 1998, vol. 30(pg. 2281-2289)
- CHRISTOFOLETTI DC et. al., Electrocardiography: a Useful Method in the Selection of Animals. **Saúde Rev., Piracicaba**. 2013, jan.-abr. v. 13, n. 33, p. 39-46,
- CLARKSON TW. The toxicology of mercury. **Crit Rev Clin Lab Sci**. 1997;34(4):369-403. doi: 10.3109/10408369708998098. PMID: 9288445.

DE ASSIS GP, et. al. Effects of small concentrations of mercury on the contractile activity of the rat ventricular myocardium. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 2003; 134(3):375-83.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** 2002 Jan;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001. PMID: 11773609.

FARIA, TO. et al., Xanthine Oxidase Activation Modulates the Endothelial (Vascular) Dysfunction Related to HgCl₂ Exposure Plus Myocardial Infarction in Rats. **Cardiovasc Toxicol.** 2018, 18, 161–174. <https://doi.org/10.1007/s12012-017-9427-x>.

FARIA, TO. et al. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development. **Arch Med Res.** Maio, 2011;42(4):274-80. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.06.002. PMID: 21820605.

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

FERNANDES, AA. et al. SERCA-2a is involved in the right ventricular function following myocardial infarction in rats. **Life Sciences.** Volume 124, Março 2015, Pag 24-30 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.010>

FERNANDES CORRÊA, RA. et al. Testosterone deficiency reduces the effects of late cardiac remodeling after acute myocardial infarction in rats. **PLoS One.** 2019 Mar 21;14(3):e0213351. doi: 10.1371/journal.pone.0213351. Erratum in: PLoS One. 2019 Dec 12;14(12):e0226664. PMID: 30897106; PMCID: PMC6428328.

FERNANDES AB. et. Al. Toxic effects of mercury on the cardiovascular and central nervous systems. **J Biomed Biotechnol.** 2012; 2012:949048. doi:10.1155/2012/949048

FURIERI LB et. al.,. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. **Br J Pharmacol.** 2011 Apr;162(8):1819-31. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01203.x.

FURIERI LB et. al., . Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. **Toxicol Appl Pharmacol.**2011 [Epub ahead of print]

GENCHI G. et. al.,(2017). Mercury Exposure and Heart Diseases. **Int J Environ Res Public Health.** 2017 Jan 12;14(1). pii: E74. doi: 10.3390/ijerph14010074.

GUALLAR, E, et. al. Mercury, Fish Oils, and the Risk of Myocardial Infarction. **N Engl J Med.** 2002; 347:1747-1754. DOI: 10.1056/NEJMoa020157.

GRANS, CF et al. Treinamento Resistido Após Infarto do Miocárdio em Ratos: Papel na Função Cardíaca e Autonômica. **Arq. Bras. Cardiol.** [online]. 2014, vol.103, n.1, pp.60-68. Julho, 2014. ISSN 0066-782X. <https://doi.org/10.5935/abc.20140093>.

HALL, JE; GUYTON, AC. **Guyton & Hall tratado de fisiologia médica.** 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

- HAMLIN, R. L.; DEL RIO, C. (2012). dP/dtmax - A measure of “baroinometry.” **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 66(2), 63–65. doi:10.1016/j.vascn.2012.01.001.
- HORI, M.; NISHIDA, K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. **Cardiovascular Research**. 2008, 81(3), 457–464. doi:10.1093/cvr/cvn335.
- HOUSTON M. C et. Al. Role of Mercury Toxicity in Hypertension, Cardiovascular Disease, and Stroke. **Official Journal of the American Society of Hypertension, Inc**, 2007.
- HUANG, YL. et. al., Lipid peroxidation in rats administrated with mercuric chloride. **Biol Trace Elem Res**. 1996, 52: 193–206.
- HUNDAHL LA. et al. Rat Models of Ventricular Fibrillation Following Acute Myocardial Infarction. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**. 2017 Nov;22(6):514-528. doi: 10.1177/1074248417702894. Epub 2017 April 5. PMID: 28381093.
- INOUE M. The Ethics of Representation in Light of Minamata Disease: Tsuchimoto Noriaki and His Minamata Documentaries. **Arts**. 2019, 8, 37.DOI: 10.3390/arts8010037.
- KIM, SH; SHARMA RP. Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signalling. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2004, 196: 47–57.
- KOBAL AB et. al. Renal function in miners intermittently exposed to elemental mercury vapour. **Arh Hig Rada Toksikol**. 2000 Dec;51(4):369-80. PMID: 11276964.
- KONOPELSKI P, UFNAL M. Electrocardiography in Rats: a Comparison to Human. **Physiol. Res**. 65: 717-725, 2016.
- LEMOS NB et. al. Low mercury concentration produces vasoconstriction, decreases nitric oxide bioavailability and increases oxidative stress in rat conductance artery. **PLoS One**. 2012;7(11):e49005. doi: 10.1371/journal.pone.0049005.
- LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, 2002; 420(6917), 868–874. doi:10.1038/nature01323.
- MAHAFFEY KR. Mercury exposure: medical and public health issues. **Trans Am Clin Climatol Assoc**. 2005; 116:127-154.
- MAHBOOB, M. et. al., Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. **J Environ Sci Health B**. 2001, 36: 687– 697.
- MAHMOUD AI. et al. Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice. **Nat Protoc**. 2014 Feb;9(2):305-11. doi: 10.1038/nprot.2014.021. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24434799; PMCID: PMC3977725.
- MARQUES VB, et. al. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. **Life Sciences**. 2015 Dec;143:89-97. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.034.

MARTINEZ CS.et. al. Reproductive dysfunction after mercury exposure at low levels: evidence for a role of glutathione peroxidase (GPx) 1 and GPx4 in male rats. **ReprodFertil Dev.** 2017 Sep;29(9):1803-1812. doi: 10.1071/RD16310.

MARTINEZ CS, et. al., Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats. **J Toxicol Environ Health A.** 2014;77(1-3):143-54. doi: 10.1080/15287394.2014.867202.

MASSARONI LV, et. al., Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of mercury in anaesthetized rats and in langendorff perfused rat hearts. **Pharmacol Res.** 1995 Jul-Aug;32(1-2):27-36. doi: 10.1016/s1043-6618(95)80005-0. PMID: 8668644.

MILLER, DM.; WOODS, JS. Urinary porphyrins as biological indicators of oxidative stress in the kidney. Interaction of mercury and cephaloridine. **Biochem Pharmacol.** 1993, 46: 2235–2241.

MORIS D. et al., The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. **Ann Transl Med.** 2017;5(16):326. doi:10.21037/atm.2017.06.27

Mukherjee SB. et. al., Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes, **J Biol Chem.** 2002, vol. 277 (pg. 24717-24727)

NBR 10004 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos Sólidos - Classificação. 2004.

NRC (National Research Council). **Risk assessment in the Federal Government: managing the process.** National Academy Press, Washington, DC. 388p. 2000.

OLIVEIRA, LF. et. al., Deleterious effects of chronic mercury exposure on in vitro LTP, memory process, and oxidative stress. **Environmental Science and Pollution Research.** 2019, 27(7), 7559-7569. doi:10.1007/s11356-019-06625-6

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Cooperação Técnica entre Brasil, Bolívia e Colômbia: Teoria e Prática para o Fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Mercúrio.** Brasília, 2011. < https://www.paho.org/bra/dmdocuments/Mercurio%20PORTUGUES_3101.pdf> Acesso em: 07 jun. 2022.

OSREDKAR J, et, al. Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. **J Clin Toxicol** 2011, S:3 doi: 10.4172/2161-0495.S3-001.

PASSOS, CJ; MERGLER, D. Human Mercury Exposure and Adverse Health Effects in the Amazon: A Review. **Cadernos de Saúde Pública.** 2008. 24, S503-S520. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2008001600004>.

PASSOS FL, et al. Mining territories: territorial planning after the disruption in Mariana, Minas Gerais. **Cad. Metrop.** 2017, Jan./Apr. v.19 p.38 São Paulo .doi.org/10.1590/2236-9996.2017-3811

PASTORE A.; PIEMONTE F. Protein glutathionylation in cardiovascular diseases. **Int J Mol Sci.** 2013 Oct 17;14(10):20845-76. doi: 10.3390/ijms141020845. PMID: 24141185; PMCID: PMC3821647.

PEÇANHA F.M. et. al. (2010) The Role Of Cyclooxygenase (Cox)-2 Derived Prostanoids On Vasoconstrictor Responses To Phenylephrine Is Increased By Exposure To Low Mercury Concentration. **Journal Of Physiology And Pharmacology** 2010, 61, 1, 29-36 www.jpp.krakow.pl

PEREIRA , CLV et. al. Cardiotoxicity of environmental contaminant tributyltin involves myocyte oxidative stress and abnormal Ca²⁺ handling. **Environ Pollut.** 2019 Apr;247:371-382. doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.053. Epub 2019 Jan 16.

PEZOLATO, VA et. al., Eletrocardiographic monitoring in the development of Wistar Rats. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.69, n.1, p.39-47, 2017.

POLLACK AZ. et.al., Relation of blood cadmium, lead, and mercury levels to biomarkers of lipid peroxidation in premenopausal women. **Am J Epidemiol.** 2012, 175(7):645–652.

PÓVOA R; SOUZA D.Critical review of the electrocardiogram and echocardiogram on the diagnosis of the left ventricular hypertrophy. **Rev Bras Hipertens** vol.15(2):81-89, 2008

REICHL FX, et. al. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. **Dent Mater.** 2001; 17(2):95-101.

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

RICE, KM et al. “Environmental mercury and its toxic effects.” **Journal of preventive medicine and public health** = Yebang Uihakhoe chi vol. 47,2 (2014): 74-83. doi:10.3961/jpmp.2014.47.2.74

RIZZETE, DA et. al., (2017) Egg white-derived peptides prevent cardiovascular disorders induced by mercury in rats: Role of angiotensin-converting enzyme (ACE) and NADPH oxidase. **Toxicol Lett.** 2017 Nov 5;281:158-174. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.10.001. Epub 2017 Oct 5.

RIZZETE, DA et. al., (2017) Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. **Food Chem Toxicol.** 2017 Feb;100:253-264. doi: 10.1016/j.fct.2016.12.038. Epub 2016 Dec 30.

RIZZETE, DA et. al, (2018) Mercury-induced vascular dysfunction is mediated by angiotensin II AT-1 receptor upregulation. **Environmental Research.** v 162, April 2018, Pages 287-296

RODRÍGUEZ et. Al. Manual de Enfermería en Arritmias y Electrofisiología Madrid, **Asociación Española de Enfermería en Cardiología**, 2013, 264 pp. isbn 978-84-616-4047-8.

ROSSONI, LV. et. al., Effects of mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 1999, 32(8), 989–997. doi:10.1590/s0100-879x1999000800009.

XIMENES, C.F, et. al. Tributyltin chloride disrupts aortic vascular reactivity and increases reactive oxygen species production in female rats. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.** 2017, 24 (31), 24509e24520.

SANTANA, LNS. et. al., Low doses of methylmercury exposure during adulthood in rats display oxidative stress, neurodegeneration in the motor cortex and lead to impairment of motor skills. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.** 2018. doi:10.1016/j.jtemb.2018.09.004 .

SATOH, H. Occupational and Environmental Toxicology of Mercury and Its Compounds. **INDUSTRIAL HEALTH.** 200; 38(2), 153–164. doi:10.2486/indhealth.38.153.

SCOEL. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Elemental Mercury and Inorganic Divalent Mercury Compounds, **SCOEL/SUM/84**, Maio de 2007.

SIES H., Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol.** 1997, 82(2):291–295.

SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol.** 2015;4:180-3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002. Epub 2015 Jan 3. PMID: 25588755; PMCID: PMC4309861.

SIES H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biol.** 2017 Apr;11:613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035. Epub 2017 Jan 5. PMID: 28110218; PMCID: PMC5256672.

SIES H; BERNDT C; JONES DP. Oxidative Stress. **Annu Rev Biochem.** 2017 Jun 20;86:715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28441057.

SILVA, EFSJD et. al. Mercury at environmental relevant levels affects spermatozoa function and fertility capacity in bovine sperm. **J Toxicol Environ Health A.** 2019;82(4):268-278. doi: 10.1080/15287394.2019.1589608. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30870101.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. **Arq Bras Cardiol** v 80, (suplemento II), 2003.

SOUSA, PA. et al. (2014). Taquicardia de QRS largos – importância eletrocardiográfica no diagnóstico diferencial. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, 33(3), 165–173. doi:10.1016/j.repc.2013.07.016

STEFANON I, Auxiliadora-Martins M, Vassallo DV, Mill JG. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. **Braz J Med Biol Res.** 1994 Nov;27(11):2667-79. PMID: 7549991.

STEFANON, I. et al. Ventricular performance and Na⁺-K⁺ ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** [online]. 2009, v. 42, n. 10 <<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009005000015>>.

STEFANON, I. et al. (2013) Left and Right Ventricle Late Remodeling Following Myocardial Infarction in Rats. **PLoS ONE** 8(5): e64986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064986>.

SUBRAMANIAN, S. et al. Mitochondrially Targeted Antioxidants for the Treatment of Cardiovascular Diseases, 2010. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, 5(1), 54–65. doi:10.2174/157489010790192601.

TINKOV AA. et. al., Mercury and metabolic syndrome: a review of experimental and clinical observations. **BioMetals**. 2015, 28(2), 231–254. doi:10.1007/s10534-015-9823-2

VALENTI VE, GARNER DM. Cardiovascular risks in subjects exposed to the Brumadinho dam collapse, Minas Gerais, Brazil. **Clinics** 2019, oct 28. vol.74 São Paulo. <<https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e1301>>

VALKO M. et. al., Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr Med Chem**. 2005, 12(10):1161–1208

VAMNES, JS. et al. Diagnostic value of a chelating agent in patients with symptoms allegedly caused by amalgam fillings **J Dent Res**. 2000; 79(3):868-74.

VASCONCELOS, SML. et. al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**. 2007, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007

VASSALLO et. al., Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. **Arq. Bras Cardiol**. Vol 67. n1, 1996. Acesso em 29 de mar. 2021 <<http://publicacoes.cardiol.br/abc/1996/6701/67010009.pdf>>

VASSALO et. al (2018) Effects of Chronic Exposure to Mercury on Angiotensin-Converting Enzyme Activity and Oxidative Stress in Normotensive and Hypertensive Rats **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. Print version ISSN 0066-782X Online version ISSN 1678-4170

VILLA, F. et al. Genetic Analysis Reveals a Longevity-Associated Protein Modulating Endothelial Function and Angiogenesis. **Circ Res**. 2015;117(4):333-345. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305875

UNEP. United Nations Environment Programme. **Global Mercury Assessment**, 2013. Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemical Branch, Geneva, Switzerland. 44 p.

Walker MJ. et. al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. **Cardiovasc Res**. 1988 Jul;22(7):447-55. doi: 10.1093/cvr/22.7.447. PMID: 3252968.

WIGGERS GA et. al. Low Mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. **American Journal of Physiol: Heart and circulatory Physiology**, 2008, 95(3):H1033-H1043

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Methyl Mercury. V. 101. **International Programme on Chemical Safety**. Geneva, Switzerland, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure**, 2008. <
https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/11786/IdentifyingPopnatRiskExposuretoMercury_2008Web.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 07 jun. 2022.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **International Programme on Chemical Safety Mercury**. <https://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/mercury/en/> Acesso em: 4 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mercury and Health**, 2017.
<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health#:~:text=Mercury%20is%20considered%20by%20WHO,shellfish%20that%20contain%20the%20compound.>> Acesso em: 07 jun 2022.

WORD HEATH ORGANIZATION (WHO). **Cardiovascular disease**
<https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/> Acesso em 5 de jun. 2019.