

**Efeitos da exposição crônica ao cloreto de  
mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) sobre a reatividade vascular e  
propriedades mecânicas e estruturais de artérias  
de resistência de ratos**

**Giulia Alessandra Wiggers Peçanha**

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas  
(Fisiologia Cardiovascular)**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Dezembro de 2008**

Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>)  
sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e  
estruturais de artérias de resistência de ratos

**Giulia Alessandra Wiggers Peçanha**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau  
de Doutor em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 12 /12 /2008 por:

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador - UFES

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Briones Alonso – Co-orientadora - UAM

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Cleci Menezes Moreira – UNIPAMPA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon - UFES

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Leila Massaroni - UFES

Coordenador do PPGCF: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Dezembro de 2008

*“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhem as mesmas recordações.”*

**Vinícius de Moraes**

*“Sólo cabe progresar cuando se piensa en grande, sólo es posible avanzar cuando se mira lejos.”*

**José Ortega y Gasset**

---

Peçanha, Giulia Alessandra Wiggers, 1975.

**Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos.** [Vitória] 2008.

XIX, 146p., 29,7 cm (UFES, M Sc., Ciências Fisiológicas, 2008)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Cloreto de Mercúrio 2. Reatividade 3. Estrutura 4. Artérias de Resistência

---

***Dedico este trabalho à minha família,  
especialmente ao meu marido  
Franck.***

## AGRADECIMENTOS

Ao final de mais uma jornada, com idas e vindas, encontros e desencontros, e muitas alegrias, é chegado a hora de agradecer àqueles que compartilharam estes momentos e foram parte deles. Após um longo período de leituras, experimentos, chega ao final esta etapa. Não teria sido possível chegar até aqui se não fosse a ajuda de muitas pessoas. Este trabalho é o esforço conjunto de muitas mãos, cabeças e corações.

Agradeço a Deus, pela proteção, e força para o desenvolvimento deste trabalho e para a condução da minha vida.

Aos meus pais, Julio e Laureci, pela educação que foi o alicerce de minhas conquistas, pelo apoio incondicional e a luz que permitiu que tomasse grandes decisões. Às minhas irmãs Adriana e Giorgia, meus sobrinhos Yan, Júlia e Davi e cunhados Gê e Maurício pelo apoio.

Agradeço também minha segunda família, Neide, Maurício e Rock que me apoiaram em todos os momentos.

**Em especial, ao meu companheiro de trabalho de toda a tese e especialmente companheiro de vida Franck, que sempre com suas palavras de apoio, incentivo com todo seu amor e dedicação pode tornar real todas minhas conquistas. Por seus conselhos, correções, re-correções, paciência, muita paciência e por tornar estes últimos 8 anos e 8 meses uma aventura cheia de emoções. Muito Obrigada!**

Ao Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, o idealizador deste projeto e que desde o princípio me deu seu voto de confiança, apoiou-me e nos proporcionou uma experiência ímpar de vida fora do país, muito obrigada é pouco! Desde que me acolheu em seu laboratório pode me dar lições de vida, de trabalho, e com a sabedoria dos grandes mestres conduziu-me neste estudo e também na visão de trabalho e vida que tenho hoje.

Agradezco también a la Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mercedes Salaices que me abrió las puertas de su laboratorio y no escatimó esfuerzos para proporcionarme las condiciones perfectas para llevar a cabo este trabajo. Además, agradezco poder participar y convivir la manera como conduce su laboratorio y recibe los estudiantes extranjeros y yo que pensaba que una *Lady* era inglesa!

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Briones Alonso que como co-orientadora de esta tesis, desde el principio con su generosidad, amistad, inteligencia y paciencia me enseñó todo lo que se en arterias de resistencia y muchas otras técnicas. Además de eso pude disfrutar de su compañía, en las horas fáciles y difíciles de ese trabajo siempre tenía palabras de conforto y estímulo. Gracias Anitcha!

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Jesús Alonso por sus numerosas contribuciones en todas las reuniones de viernes, por su amistad, paciencia y por los momentos especiales de enseñarme a hacer tortilla. Muchas gracias!

En ese tiempo que pude vivir en el L4 hice más que compañeras de trabajo, hice amistades para toda la vida. De cada uno traigo conmigo un recuerdo especial, cada cual con su característica peculiar. A mis amigas del laboratorio: Ana Bri, Marta, Amada, Yoli, Annuski y Mayte que me enseñaran todo con presteza, atención y paciencia mis agradecimientos. A Marta por enseñarme las medidas de experimentos de ECA y toda su energía en siempre enseñar y mostrar el lado bueno de las cosas, a Yoli por su alegría, por saber enseñar como nadie, una profesora estupenda de Western Blot; a Amadita por la amistad y siempre contribuir en mis WB, Annuski mi compañera de Mulvany siempre dispuesta a enseñarme; Mayte con sus discusiones políticas y culturales con Franck nos pudo enseñar un poco más de los españoles y claro a mi jefita Ana Bri, que se hizo imprescindible en ese proyecto siempre dandome estímulos en el trabajo y en la vida, una amiga muy especial. A los amigos de la URJC Angela, mi amiga divertida con quién compartí habitación en Milán (*hipertension is...*), a Raquel por sus contribuciones en las cerebrales y a Vicente nuestro mentor en las PCR.

Me gustaría también agradecer a la Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maricarmem Gonzalez del laboratorio por siempre permitir nuestra entrada y utilización de su laboratorio sin restricciones y a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gloria Bolfagón por las charlas cuando venia al nuestro laboratorio.

A la Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> M<sup>a</sup> del Carmen Fernández Criado por los servicios prestados en el *animalario* de la Facultad de Medicina de la UAM, y a todos los amigos de allí Manolo, Santi, David, Marta y Eli por el cuidado con las ratas y por las experiencias pasadas.

Aos meus companheiros de *pisó* nos tempos de Madrid: Alessandra, Tiago, Fabiano, Juliana, Daniel e o itinerante Dalton que foram companheiros do dia a dia e

que proporcionaram momentos muito engraçados e divertidos *en la calle Infanta Mercedes, 77-piso2B*.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dila, que sempre participou de certa forma das conquistas com o mercúrio.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon por sempre se dispor a ajudar, discutir os resultados e abrir as portas de seu laboratório.

Às grandes amigas que desde que cheguei a Vitória e entrei no LEMC foram e são parte de minha família: Karina, Patrícia – valeu pelo companheirismo.

Aos amigos e companheiros do LEMC, novos e antigos, com os quais tenho convivido e convivo e quero nutrir amizade: Flávia, minha grande amiga, Fabiana, Eduardo, Altemar, Liliana, Rogério (gracias chico!), Juliana, Luciana, Edna, Aurélia, Fernanda, Miriam, Lorena, Thaís, Gabriel, Kelly, Guilherme, Priscila, Núbia, Nelson. Aos amigos que não estão mais no LEMC, mas que guardo grandes recordações e nutro amizade: Evandro, Adriana, Ana Paula, Leonardo, Cleci, Carlos, Matheus, Diego, e a Luciana que assim como Cleci contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos funcionários Fonseca, pela presteza com que sempre me atendeu e Cláudia, pelo apoio técnico.

Agradeço também a Wanda por permitir que ficasse tranqüila em casa para trabalhar. E ao meu companheirinho Tommy pela presença física ininterrupta aos meus pés durante as horas que passei ao computador.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPES/ FUNCITEC (Fundação de Apoio a Pesquisa do ES) pelo apoio financeiro.



# SUMÁRIO

Páginas

## **LISTA DE TABELAS**

## **LISTA DE FIGURAS**

## **RESUMO**

## **ABSTRACT**

## **I INTRODUÇÃO**

<b>1.1 MERCÚRIO: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, VIAS DE EXPOSIÇÃO E INTOXICAÇÃO.</b>	<b>19</b>
<b>1.2 AÇÃO DO MERCÚRIO NOS DIVERSOS ÓRGÃOS E SISTEMAS</b>	<b>28</b>
1.2.1 Sistema Nervoso Central	28
1.2.2 Rins	30
1.2.3 Sistema Cardiovascular	32
1.2.4 Outros Sistemas	36
<b>1.3 ESTRUTURA DOS VASOS DE RESISTÊNCIA E SEU PAPEL NA MANUTENÇÃO DA RESISTÊNCIA VASCULAR.</b>	<b>36</b>
1.3.1 Fatores reguladores do tônus vascular	38
1.3.1.1 Óxido Nítrico	38
1.3.1.2 Prostaglandinas	40
1.3.1.3 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio - EDHF	41
1.3.1.4 Endotelina	42
1.3.1.5 Sistema Renina Angiotensina	43
1.3.1.6 Espécies Reativas de Oxigênio	44

## **II OBJETIVOS**

<b>2.1 Objetivo geral</b>	<b>47</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>47</b>

## **III MATERIAIS E MÉTODOS**

<b>3.1 Animais experimentais</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Tratamento Crônico com HgCl<sub>2</sub> – modelo experimental</b>	<b>48</b>
3.2.1 Determinação da concentração de mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) no sangue	50

<b>3.3 Medida da pressão arterial e peso corporal</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Estudo das propriedades mecânicas e estruturais de artérias mesentéricas de resistência</b>	<b>51</b>
<b>3.4.1 Miógrafo de pressão</b>	<b>51</b>
<b>3.4.2 Cálculos das propriedades mecânicas e estruturais das artérias mesentéricas de resistência</b>	<b>52</b>
<b>3.5 Estudo da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência</b>	<b>54</b>
<b>3.5.1 Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência</b>	<b>56</b>
<b>3.5.2 Influência do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina</b>	<b>57</b>
<b>3.5.3 Influência do óxido nítrico, dos prostanóides, dos canais para o potássio, do sistema renina angiotensina e das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina e sua possível alteração com o tratamento com HgCl<sub>2</sub></b>	<b>57</b>
<b>3.5.4 Avaliação da resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio</b>	<b>58</b>
<b>3.5.5 Efeito das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta do relaxamento dependente do endotélio</b>	<b>59</b>
<b>3.6 Estudo da reatividade vascular em artérias basilares</b>	<b>59</b>
<b>3.7 Estudo da expressão de proteínas mediante Western Blot</b>	<b>60</b>
<b>3.7.1 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e isoformas CuZn (cobre-zinco), Mn (manganês) e EC (extracelular) da superóxido dismutase (SOD)</b>	<b>60</b>
<b>3.7.1.1 Eletroforese e transferência das amostras</b>	<b>60</b>
<b>3.7.1.2 Incubação com os anticorpos e detecção das subunidades</b>	<b>61</b>
<b>3.8 Expressão de RNAm por PCR em tempo real (RT-PCR)</b>	<b>61</b>
<b>3.9 Detecção vascular in situ da produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	<b>62</b>

*em microscopia confocal.*

<b>3.10 Medida de produção plasmática de malondialdeído (MDA)</b>	<b>63</b>
<b>3.11 Medida do estado total antioxidante em plasma (TAS)</b>	<b>63</b>
<b>3.12 Expressão dos resultados e análise estatística</b>	<b>64</b>
<b>3.13 Fármacos e reagentes a utilizados</b>	<b>65</b>

## **IV RESULTADOS**

**67**

### **4.1 Dados gerais**

**67**

**4.1.1 Concentração plasmática de mercúrio alcançada com o tratamento crônico com HgCl<sub>2</sub>**

**67**

**4.1.2 Valores de pressão arterial sistólica e massa corporal**

**67**

### **4.2 Estudo das propriedades estruturais de artérias mesentéricas de resistência de rato**

**68**

**4.2.1 Propriedades mecânicas de artérias mesentéricas de resistência de rato avaliadas através de miógrafo de pressão**

**70**

### **4.3 Experimentos com Artérias Mesentéricas de resistência**

**71**

**4.3.1 Efeito do tratamento com mercúrio sobre a resposta vascular ao Cloreto de Potássio (KCl)**

**71**

**4.3.2 Efeito do tratamento com HgCl<sub>2</sub> sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.**

**71**

**4.3.3 Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

**72**

**4.3.4 Influência do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina**

**73**

**4.3.5 Influência do e das espécies reativas de oxigênio sobre o papel do NO em a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina.**

**74**

**4.3.6 Influência dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina**

**77**

**4.3.7 Influência do bloqueio canais de potássio dependentes de cálcio sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina**

**79**

**4.3.8 Efeito do sistema renina angiotensina sobre a resposta contrátil a fenilefrina**

**81**

**4.3.9 Efeito dos derivados vasoativos liberados pelo tecido perivascular sobre a**

**84**

<i>resposta contrátil a fenilefrina</i>	
<b>4.3.10 Efeito do tratamento com HgCl<sub>2</sub> sobre a resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio</b>	<b>85</b>
<b>4.3.11 Efeito das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta do relaxamento dependente do endotélio</b>	<b>86</b>
<b>4.3.12 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e isoformas CuZn (cobre-zinco), Mn (manganês) e EC (extracelular) da superóxido dismutase (SOD) e expressão gênica da NOX-1</b>	<b>89</b>
<b>4.3.13 Detecção vascular “in situ” da produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	<b>91</b>
<b>4.3.14 Medida da produção de malondialdeído (MDA) e do estado total antioxidante plasmático (TAS)</b>	<b>93</b>
<b>4.4 Experimentos com Artérias Basilares</b>	<b>93</b>
<b>4.4.1 Efeito do tratamento com mercúrio sobre o diâmetro das artérias basilares e resposta vascular ao Cloreto de Potássio (KCl)</b>	<b>93</b>
<b>4.4.2 Efeito do tratamento com HgCl<sub>2</sub> sobre a resposta vasoconstritora à serotonina (5-HT)</b>	<b>94</b>
<b>4.4.3 Influência do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora induzida por 5-HT</b>	<b>94</b>
<b>4.4.4 Influência das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta vasoconstritora induzida por 5-HT</b>	<b>95</b>
<b>4.4.5 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e isoformas CuZn (cobre-zinco), Mn (manganês) e EC (extracelular) da superóxido dismutase (SOD) em artérias basilares</b>	<b>96</b>
<b>V DISCUSSÃO</b>	<b>98</b>
<b>5.1 Efeitos do tratamento com HgCl<sub>2</sub> na estrutura dos vasos de resistência</b>	<b>100</b>
<b>5.2 Efeito do tratamento com mercúrio sobre a função vascular</b>	<b>103</b>
<b>5.3 Efeito do tratamento com mercúrio no estresse oxidativo plasmático e vascular</b>	<b>109</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>116</b>
<b>VI CONCLUSÕES</b>	<b>117</b>
<b>VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>118</b>

## **ANEXOS**

**1 – Informe de Análise Sanguínea**

**2 – Artigo Publicado:** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008

Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries.

## **LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b> Valores de contração (mN/mm) induzida por 120 mM de KCl em artérias mesentéricas de resistência com (E+) e sem (E-) endotélio de ratos Controle e tratados com HgCl <sub>2</sub> .	<b>72</b>
<b>Tabela 2:</b> Valores de pD <sub>2</sub> e resposta máxima (R <sub>máx</sub> , % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle e HgCl <sub>2</sub> na condição controle e após incubação com L-NAME, SOD, LNAME+SOD, Tiron, Tempol, Catalase, Indometacina, TCP, TEA, TEA+SOD, Captopril, Losartan.	<b>83</b>
<b>Tabela 3:</b> Valores de pD <sub>2</sub> e resposta máxima (R <sub>máx</sub> , % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à DEA-NO e acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle e HgCl <sub>2</sub> na condição controle e após incubação com Apocinina, SOD e Catalase.	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura I:</b> Foto representativa de uma artéria mesentérica de resistência (Terceiro ramo da artéria mesentérica superior) pressurizada a 70 mm Hg. Aumento 40x.	52
<b>Figura II:</b> Desenho esquemático da preparação de vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany & Halpern (1977). Foto da câmara do miógrafo.	55
<b>Figura III:</b> Registro ilustrativo de uma curva concentração-resposta a fenilefrina.	56
<b>Figura IV:</b> Registro ilustrativo de uma curva concentração-resposta a acetilcolina.	59
<b>Figura 1:</b> Evolução temporal dos valores (em $\eta\text{M}$ ) de mercúrio no sangue de ratos expostos ao $\text{HgCl}_2$ nos momentos: 7, 15 e 30 dias de tratamento.	67
<b>Figura 2:</b> Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) medidos através de pletismografia de cauda em ratos Controle e tratados com $\text{HgCl}_2$ durante quatro semanas.	68
<b>Figura 3.</b> Relação pressão-diâmetro luminal, área de secção transversa, espessura de parede e relação média / lúmem em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle e $\text{HgCl}_2$ em condições passivas ( $0 \text{ Ca}^{2+}$ ). Foto representativa de artéria mesentérica Controle e $\text{HgCl}_2$ .	69
<b>Figura 4:</b> Distensibilidade arterial-pressão intraluminal e relação <i>stress-strain</i> em artérias mesentéricas de resistência pressurizadas de ratos Controle e $\text{HgCl}_2$ .	70
<b>Figura 5:</b> Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em artérias mesentéricas de resistência de ratos dos grupos Controle e $\text{HgCl}_2$ .	71
<b>Figura 6:</b> Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina, em artérias mesentéricas de resistência de ratos	73

Controle e HgCl<sub>2</sub>. Em C diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em artérias mesentéricas com e sem endotélio dos grupos experimentais.

- Figura 7:** Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Em C diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em artérias mesentéricas dos grupos experimentais. 74
- Figura 8:** Efeito da SOD e do L-NAME + SOD sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl<sub>2</sub> (B). 75
- Figura 9:** Efeito do Tiron, Tempol ou Catalase sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. 77
- Figura 10:** Efeito do bloqueio da via ácido araquidônico-ciclooxigenase com indometacina (INDO) e tranilcipromina (TCP) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. 78
- Figura 11:** Expressão do RNAm da COX-2 por RT-PCR quantitativa em artérias mesentéricas de ratos do grupo Controle e HgCl<sub>2</sub>. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. 79
- Figura 12:** Efeito do bloqueador dos canais de potássio ativados por cálcio, TEA sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. 80
- Figura 13:** Efeito da associação do bloqueador dos canais de potássio ativados por cálcio, TEA associado a SOD sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. 81
- Figura 14:** Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) pela 82

incubação com Captopril sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Efeito do bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> pela incubação com o antagonista Losartan sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle

- Figura 15:** Efeito da gordura perivascular (GPV) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub> 84
- Figura 16:** Curva concentração-resposta à acetilcolina e curva concentração-resposta ao DEA-NO em artérias mesentéricas de resistência dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. 85
- Figura 17:** Efeito da SOD, Apocinina e Catalase sobre o relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. 87
- Figura 18:** Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. As fotos mostram as bandas representativas da expressão da eNOS e da  $\alpha$ -actina em artérias mesentéricas de ratos de ambos grupos. O controle positivo utilizado foram células endoteliais humanas (não demonstrado). 89
- Figura 19:** A. Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica das três isoformas da superóxido dismutase (SOD) de artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub> CuZn-SOD, Mn-SOD, e EC-SOD. As fotos acima mostram as bandas representativas da expressão de CuZn-SOD, Mn-SOD e EC-SOD e da  $\alpha$ -actina em artérias mesentéricas de ratos de ambos grupos. O controle positivo utilizado foram para CuZn-SOD e Mn-SOD de extrato de tecido cerebral de rato e para EC-SOD extrato de tecido pulmonar de rato (não demonstrado). 90
- Figura 20:** Expressão do RNAm da NOX-1 por RT-PCR quantitativa em artérias mesentéricas de ratos do grupo Controle e HgCl<sub>2</sub>. 91



- Figura 21:** Painéis com microfotografias representativas da fluorescência emitida por dihidroetídeo (DHE) em cortes transversais de anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle (painel à esquerda) e HgCl<sub>2</sub> (painel à direita). Tamanho da imagem 375 x 375  $\mu$ m. O gráfico representa a Intensidade de Fluorescência em unidade arbitrária (UA) emitida por DHE nos dois grupos experimentais. 92
- Figura 22:** Gráfico representativo da concentração de Malondialdeído Plasmático e do Estado Total Antioxidante Plasmático em ratos dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. 93
- Figura 23:** Resposta contrátil induzida por 5-HT, em artérias basilares de ratos dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. 94
- Figura 24:** Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME sobre a resposta contrátil induzida por 5-HT em artérias basilares de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Em C diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em artérias basilares dos grupos experimentais. 95
- Figura 25:** Efeito da SOD sobre a contração induzida por 5-HT em artérias basilares de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Dados comparativos das curvas Controle do grupo Controle com a do grupo HgCl<sub>2</sub> sem e com a presença de SOD. 96
- Figura 26:** Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da eNOS e das isoformas superóxido dismutase CuZn-SOD, da MnSOD e da EC-SOD de artérias basilares de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. O controle positivo utilizado foram para CuZn-SOD e Mn-SOD de extrato de tecido cerebral de rato e para EC-SOD extrato de tecido pulmonar de rato (não demonstrado). 97

## RESUMO

O mercúrio produz efeitos tóxicos no sistema nervoso central e rins, mas seus efeitos cardiovasculares ainda são pouco estudados. O estresse oxidativo tem sido um dos principais mecanismos de toxicidade propostos. Este estudo analisa os efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre a reatividade vascular e as propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência. Foram utilizadas artérias mesentéricas (MRA) e basilares de resistência de ratos Wistar de 3 meses de idade que foram diariamente tratados com injeções de  $\text{HgCl}_2$  (1ª dose - 1.3  $\mu\text{g}$ , doses subsequentes 0.02  $\mu\text{g}$ , *i.m*) ou veículo por 30 dias. Níveis plasmáticos de mercúrio foram determinados por espectrometria de absorção atômica e pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia caudal. A reatividade vascular foi estudada em preparação de vasos de resistência isolados para ambas as artérias estudadas e a estrutura vascular em miógrafo de pressão para MRA. A expressão protéica foi realizada por *Western Blot* e a gênica por PCR em tempo real. Níveis de ânion superóxido foram determinados pela fluorescência por dihidroitídeo detectada em microscopia confocal, medida dos níveis de malondialdeído (MDA) pela reação de ácido tiobarbitúrico e o estado antioxidante total (TAS) com um kit comercial. O nível plasmático de mercúrio após 30 dias de tratamento foi de  $29.2 \pm 2.15$  nM. A PAS não foi afetada pelo tratamento, entretanto houve aumento da resposta contrátil à fenilefrina e serotonina (5-HT) em MRA e basilar, respectivamente. A vasodilatação induzida por acetilcolina (ACh) foi prejudicada e não houve alteração ao relaxamento independente do endotélio promovido pelo DEA-NO. A remoção do endotélio e a incubação com inibidor da NO sintase (L-NAME) aumentaram a resposta à fenilefrina somente em ratos controle. A co-incubação com L-NAME associado à superóxido dismutase (SOD) no grupo tratado com  $\text{HgCl}_2$  foi capaz de restaurar o efeito do L-NAME sobre a resposta contrátil à fenilefrina e a SOD reverteu o efeito do  $\text{HgCl}_2$  em artérias basilares. Incubação com SOD, catalase e apocinina restaurou o prejuízo da vasodilatação promovida pelo mercúrio. A incubação com TEA, um bloqueador dos canais para potássio ativados por cálcio, aumentou a sensibilidade da resposta à fenilefrina em ratos controle, mas não modificou a resposta nos ratos  $\text{HgCl}_2$ . A incubação com indometacina e tranilcipromina não alterou de forma significativa a sensibilidade ou a resposta máxima à fenilefrina. A produção de ânion superóxido, expressão de eNOS, MDA plasmático e TAS aumentaram em ratos tratados com  $\text{HgCl}_2$ . No entanto, a expressão protéica das isoformas da SOD e a expressão gênica da NOX-1 e COX-2 permaneceram inalteradas. O tratamento com  $\text{HgCl}_2$  reduziu a espessura das artérias e aumentou o seu diâmetro interno. Em conclusão, os resultados sugerem que a administração crônica de baixas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  aumenta a reatividade vascular à fenilefrina, promove disfunção endotelial e altera a estrutura de MRA. Este prejuízo na função vascular parece ser mediado pela redução da biodisponibilidade do NO resultado do aumento da produção de ânion superóxido derivado da NADPH oxidase.

## **ABSTRACT**

Mercury produces toxic effects in both central nervous system and kidneys but its cardiovascular effects are not well explored yet. Among the toxicity mechanisms suggested an increase of oxidative stress has been proposed. This study analyzed the effects of chronic exposition to low concentrations of HgCl<sub>2</sub> in endothelium-dependent responses of resistance arteries. Mesenteric resistance (MRA) and basilar arteries from 3-month old Wistar rats daily treated with HgCl<sub>2</sub> (1<sup>st</sup> dose 1.3 µg, subsequent doses 0.02 µg, *i.m*) or vehicle by 30 days were used. Plasma mercury levels were determined by Atomic Absorption Spectrometry and systolic blood pressure (SBP) by tail cuff. Vascular reactivity and structure of arteries were studied by wire myography and pressure myography respectively. Protein expression was evaluated by Western Blot and gene expression by RT-PCR. Superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) levels were determined by dihydroethidium fluorescence, plasmatic malondialdehyde (MDA) levels by thiobarbituric acid assay and total antioxidant status by a commercial kit. Mercury plasmatic levels after 30 days of treatment were 29.2 ± 2.15 nM. Mercury treatment did not affect SBP, but increased phenylephrine contractile response, reduced acetylcholine (ACh)-induced vasodilatation and did not change the vasodilatation to the nitric oxide donor DEA-NO (10 nM-10 µM) in MRA. Mercury treatment also increased serotonin (5-HT) contractile response in basilar arteries. Endothelium removal and the NO synthase inhibitor (L-NAME, 100 µM) increased phenylephrine response only in control rats. Co-incubation with L-NAME plus superoxide dismutase (SOD, 150 U/ml) on the HgCl<sub>2</sub> group restored the effect of L-NAME in contractile response to phenylephrine and the SOD reversed the HgCl<sub>2</sub> effect in basilar arteries. SOD, the hydrogen peroxide scavenger, catalase (1000 U/ml) or the NADPH oxidase inhibitor, apocynin (0.3 mM) restored the impaired ACh-induced vasodilatation in treated rats. The incubation with TEA, an inhibitor of K<sup>+</sup> channels, increased the sensitivity to phenylephrine in control but did not modify the response in HgCl<sub>2</sub> group. Indomethacin and tranilcipromine incubation did not alter the sensitivity or maximum response to phenylephrine. Vascular superoxide anion production, eNOS expression, plasmatic MDA levels and total antioxidant status increased by HgCl<sub>2</sub> treatment. However, SOD isoforms expression, COX and NOX gene expression remained unchanged. The HgCl<sub>2</sub> treatment reduced the MRA wall thickness but increased its lumen diameter. These results suggest the chronic administration of low concentrations of HgCl<sub>2</sub> increases the vascular reactivity to phenylephrine/serotonin, promotes endothelial dysfunction and alters the structure of MRA. This impairment of vascular function seems to be due to NO decreased bioavailability by increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> production from NADPH oxidase.

# ***INTRODUÇÃO***

# **I INTRODUÇÃO**

## **1.1 MERCÚRIO: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, VIAS DE EXPOSIÇÃO E INTOXICAÇÃO**

O mercúrio existe em uma variedade de formas físicas e químicas e é dividido em espécies orgânicas e inorgânicas. O termo inorgânico inclui o mercúrio elementar metálico ( $\text{Hg}^0$ ), que tem forma líquida à temperatura ambiente, é pouco absorvido e representa pequeno risco a saúde. No entanto, sob a forma de vapor de mercúrio, encontrado em restaurações de amálgama, termômetros, lâmpadas, é prontamente absorvido pelos pulmões sendo responsável por inúmeros casos de exposição ocupacional (Clarkson *et al.*, 2007; Houston, 2007). O cloreto de mercúrio,  $\text{HgCl}_2$ , também inorgânico, é utilizado em desinfetantes e pesticidas (ATSDR, 1999).

Ainda apresenta-se em dois estados de oxidação, mercurioso ( $\text{Hg-Hg}^{++}$ ) e mercúrico ( $\text{Hg}^{++}$ ). As formas orgânicas são derivadas do mercúrio mercúrico ligados a dois átomos de carbono e tem como principal fonte de intoxicação para o homem o metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) através do consumo de peixes contaminados. A rota de exposição e a eficiência de absorção assim como seus efeitos no organismo são dependentes da forma química e do tempo de exposição (Clarkson *et al.*, 2007).

O uso do mercúrio em atividades humanas é descrito desde 2000 anos a.C por chineses e egípcios que utilizavam cinábrio (sulfeto de mercúrio) na produção de corante vermelho e amálgamação. Também foi utilizado por alquimistas no refino de ouro, como anti-séptico e no tratamento da sífilis que levou a intoxicação de personalidades famosas como Mozart, Beethoven e Shubert (Scheidt, 1967; Hylander & Meili, 2003; Clarkson *et al.*, 1972 e 2007).

Por possuir propriedades físico-químicas tecnologicamente importantes como alta tensão superficial e gravidade específica, baixa resistência elétrica e, no estado líquido, um volume de expansão constante independente da temperatura, é amplamente utilizado ainda nos dias atuais e pode afetar a saúde humana mais comumente em três formas: vapor de mercúrio, liberado pelas amálgamas dentárias, metilmercúrio adquirido pelo consumo de peixes e etilmercúrio utilizado na preservação de vacinas - timerosal (Schroeder & Munthe, 1998; Clarkson, 2002; Magos & Clarkson, 2006; McKelvey *et al.*, 2007).

O mercúrio também é liberado e distribuído no meio ambiente por meio de fontes naturais como atividades vulcânicas, desgaste da crosta terrestre e processo de erosão, e possui grande dispersão devido sua propriedade de tornar-se vapor a temperatura ambiente (Saha & Lee, 1972; Swain *et al.*, 2007; Magos & Clarkson, 2006). As áreas geológicas, chamadas de cinturões de mercúrio localizadas nas Américas, estão entre as maiores formas de ocorrência natural (Saha & Lee, 1972; Swain *et al.*, 2007). Após aproximadamente dois anos o vapor de mercúrio emitido na atmosfera é convertido na forma solúvel ( $Hg^{++}$ ) e retorna ao solo pelas chuvas e pode ser novamente transformado em vapor no solo ou pela ação de microorganismos existentes nas águas retornando então para a atmosfera. Assim o mercúrio pode recircular por longos períodos, isto é conhecido como o ciclo global do mercúrio (Clarkson *et al.*, 2003). No entanto, devido industrialização as fontes naturais de emissão não são a maior preocupação atual e sim àquelas emitidas pela ação humana.

Dois terços da emissão total de mercúrio na atmosfera são de origem antropogênica e 90% desta provém de atividades como mineração, indústrias de cloro-álcali, queima de lixo (60% da emissão antropogênica) e de combustíveis fósseis (Davidson *et al.*, 2006; Lindberg *et al.*, 2007). Embora o petróleo e o carvão possuam baixos níveis de emissão de mercúrio, o uso em larga escala libera grandes quantidades na biosfera a cada ano e são responsáveis por significativa contaminação ambiental especialmente do ar o que posteriormente leva à contaminação de outros meios como solo e água (WHO, 1990).

A emissão global antropogênica, especialmente as derivadas de combustíveis fósseis, produção de ferro, aço e cimento, foi estimada no ano de 2000 em mais de vinte mil toneladas e a emissão de fontes naturais em torno de duas mil toneladas por ano (Pacyna *et al.*, 2006).

**Na Europa 42% do total de mercúrio emitido na atmosfera provém da eletricidade pública e da produção de calor. De acordo com dados oficiais em 2005 a emissão de mercúrio via antropogênica neste continente foi de 172 toneladas. Os países europeus que mais se destacam pela contaminação/emissão de mercúrio são Polônia e Hungria (Ryaboshapko *et al.*, 2007). Porém, países como Japão, Índia e China estão entre os maiores consumidores de mercúrio para fins industriais na atualidade (Hylander & Meili, 2003; Mukherjee & Zevenhoven, 2006; Asari *et al.*, 2008). Outro fator que**

**pode interferir no ciclo de emissão, deposição e meia-vida do mercúrio na atmosfera são as mudanças climáticas (Lindberg *et al.*, 2007; The Madison Declaration on Mercury Pollution, 2007).**

Além da emissão através da atividade industrial, existe o perigo latente de contaminação em diversos lares, pois se estima que toneladas de mercúrio estejam armazenados em termômetros e esfigmomanômetros em todo o mundo e em caso de acidentes domésticos para cada grama de mercúrio, derivada da quebra de um termômetro, são liberados cerca de  $14 \text{ mg/m}^3$  de vapor de mercúrio que são imediatamente absorvidos pelo trato respiratório, estes valores são superiores aos níveis mínimos preconizados para ambientes fechados ( $50 \text{ } \mu\text{gHg/m}^3$ ) (Nielsen, 1965; Risher *et al.*, 2003; Magos & Clarkson, 2006).

A solubilidade do mercúrio em água aumenta nesta ordem: cloreto mercurioso, mercúrio elementar, metilmercúrio, cloreto mercúrico. Do ponto de vista bioquímico, a mais importante propriedade do mercúrio mercúrico e alquilmercúrio é sua afinidade por grupos sulfidríla que pode promover grandes alterações tóxicas celulares (WHO, 1991; Clarkson, 1993). Vários exemplos de tióis endógenos, de baixo peso molecular, facilitam a entrada do mercúrio assim como de outros metais pesados na célula via mimetismo molecular, ou seja, pela formação de complexos organo-metálicos estrutural e/ou funcionalmente homólogos à outras biomoléculas endógenas (Bridges *et al.* 2007). Parece que o papel do mimetismo molecular, no transporte de metais pesados, pode ajudar a elucidar os mecanismos pelos quais os metais pesados tóxicos são transportados para diferentes tipos de células do organismo (Rooney, 2007).

Uma vez absorvido pelo organismo o mercúrio é distribuído primariamente para o sistema nervoso central e rins. A eliminação do metal geralmente se dá pela urina e fezes (Brodkin *et al.*, 2007). Assim, os níveis máximos recomendados diariamente e seu valor tóxico correspondente também variam de acordo com forma de apresentação deste metal. O fato é que as doses de referência não servem para estimativa de risco, mas somente como guia para a população (Magos & Clarkson, 2006).

O acidente em Minamata no Japão em 1953, onde dejetos industriais com grande quantidade de mercúrio foram despejados na Baía de Minamata, e por meio de oxidação e metilação incorporou-se na cadeia alimentar afetando diretamente a comunidade consumidora de peixes, desencadeou terríveis alterações neurológicas

em adultos e crianças. Os filhos de mães contaminadas desenvolveram paralisia cerebral, neuropatia periférica, cegueira e retardo mental e estas alterações ficaram mundialmente conhecidas como Doença de Minamata ou Síndrome de Hunter-Russell (Gochfeld, 2003). Este fato alertou a comunidade científica sobre os danos causados por este metal e despertou o interesse para investigação nesta área da toxicologia (Gilman & Hardman, 2007; Clarkson *et al.*, 1993 e 2007).

Outro marcante incidente se deu no Iraque em 1971, com o envenenamento de grãos de trigo por fungicidas contendo mercúrio orgânico. Mais de 500 mortos foram contabilizados após a ingestão de pão feito com o trigo contaminado. Outros relatos de intoxicação ocorreram no Paquistão (1963), Guatemala (1966), Argentina (1980) e Novo México (Bakir *et al.*, 1973; Clarkson *et al.*, 1993; Saint-Phard & Dorsten, 2004).

Na Indonésia, Filipinas (Appleton *et al.*, 1999), Eslovênia (Zadnik & Pompe-Kirn, 2007) e no Brasil (Passos & Mergler, 2008), especialmente na região Amazônica e em Minas Gerais a extração do ouro com métodos arcaicos e perigosos predispõem os garimpeiros à intoxicação por mercúrio. A queima direta de mercúrio metálico ligado ao cascalho promove a separação do ouro, processo este, designado amalgamação, provoca emissão de grande quantidade de vapor de mercúrio que é imediatamente inalada pelo garimpeiro uma vez que estes não utilizam equipamentos de proteção individual adequados (Nriagu *et al.*, 1992; Pestana & Formoso, 2003). Vale ressaltar que as queimadas, o desmatamento das florestas e o assoreamento dos rios Amazônicos contribuem de forma expressiva para a emissão de mercúrio (Gochfeld, 2003). Além disso, o alto consumo de peixe contaminado com mercúrio pela população ribeirinha reflete em um consumo médio de aproximadamente 4 µg/Kg/dia, nível este superior ao valor recomendado pela Organização Mundial de Saúde (0,23 µg/Kg/dia), o que os expõe a maior risco de intoxicação com efeitos na função motora, visual e cognitiva (Yokoo *et al.*, 2003; Hacon *et al.*, 2008; Passos & Mergler, 2008).

**Atualmente a exposição da população mundial ao metilmercúrio é menor do que a dos grandes acidentes ocorridos no Japão e no Iraque, no entanto, em muitas populações há crescentes evidências de exposição em quantidades suficientes para alterar a função fisiológica de vários sistemas, indicando que este tipo de exposição ainda constitui um importante problema de saúde**



**pública (Lindberg *et al.*, 2007; The Madison Declaration on Mercury Pollution, 2007).**

Uma das vias de exposição nos dias atuais e que atinge uma grande parte da população, se dá pela inalação do vapor de mercúrio liberado em baixas concentrações pela amálgama dentária (Clarkson *et al.*, 1993, 2003; Davison *et al.*, 2004). Estima-se uso para este fim de 270 toneladas/ano, que pode resultar em exposição direta (usuário), ocupacional (dentistas) e ambiental (dejetos e emissão em cremações). Schuurs *et al.* (1999) relataram que a maioria dos dentistas e seus assistentes estão expostos diariamente ao mercúrio, em particular ao vapor de mercúrio elementar, pela manipulação da amálgama dental que é composta por 50% de mercúrio. Do vapor inalado, cerca de 80% é transportado pelo sangue (Berlin *et al.*, 1969; Cherian *et al.*, 1978) e os rins são os órgãos que, assim como o cérebro, apresentam maior concentração deste metal (Eide & Wesenberg, 1993). Estudos demonstram que profissionais dentistas e seus assistentes possuem maior excreção urinária de mercúrio, cerca de 6,8 µgHg /L, apesar disso há associação de efeitos como alterações psicomotoras e dificuldade de concentração com estas concentrações ainda não foi comprovada (Ritchie *et al.*, 2002).

O vapor de mercúrio produzido é lipossolúvel e altamente difusível passando pelas membranas celulares, barreira hemato-encefálica e placentária chegando aos órgãos alvo, no entanto, sofre rápida oxidação nas hemácias e nos tecidos por meio da catalase e peroxidase transformando-se em mercúrio inorgânico divalente (mercúrico - Hg<sup>++</sup>) e mercurioso (Hg<sup>+</sup>) o que limita sua absorção (Halbach & Clarkson, 1978; Hursh *et al.*, 1988; Asano *et al.*, 2000; Clarkson *et al.*, 2007). O mercúrio inorgânico tem pouca capacidade de ultrapassar as membranas celulares, devido à baixa lipofilidade sua oxidação no cérebro e em outros tecidos resultam na retenção do metal neste órgão, uma vez que é impedido seu retorno à circulação. Isto ocorre desde que o mercúrio elementar não tenha sido oxidado antes de entrar nos tecidos (Clarkson *et al.*, 2007).

Além destes profissionais, indivíduos que possuem amálgama dentário, pela ação da mastigação e alteração de temperatura na boca, absorvem pequenas quantidades de mercúrio diariamente. O número de superfícies de amálgamas tem relação direta com o nível de mercúrio sanguíneo e seus níveis aumentam em até quatro vezes em indivíduos com restauração de amálgama quando comparados àqueles sem este tipo de restauração (Leistevuo *et al.*, 2001). No entanto, a

associação com riscos à saúde ainda não está bem definida (Swain *et al.*, 2007; Clarkson *et al.*, 2007).

Estima-se que pessoas com mais de 12 restaurações de amálgama tenham concentração de mercúrio em torno de 25 nmolHg/L na saliva e 10 nmolHg/L no sangue em detrimento de indivíduos sem este tipo de restauração que possuem concentrações em saliva e plasma menores que 2,5 e 0,5 nmolHg/L, respectivamente (Reichl *et al.*, 2001). Calcula-se que a cada dez restaurações com amálgama de mercúrio se tenha um aumento de 1,8 µg/L deste metal na urina (Dye *et al.*, 2005). Nos indivíduos que possuem restauração de amálgama, a concentração sanguínea após período de mastigação pode exceder a encontrada na atmosfera, atingindo cerca de 10µg/dia (Lorscheider & Vimy, 1990; Clarkson *et al.*, 1993). Estima-se que a aproximadamente 3000 a 17000 ng de vapor de mercúrio entrem na circulação diariamente por meio da absorção pulmonar neste tipo de exposição.

Além de ser absorvido, nestes casos, o mercúrio pode migrar para os rins, trato gastrointestinal e mandíbula (Hahn *et al.*, 1990). Em um estudo clínico foi observado em indivíduos com amálgama dental, declínio do mercúrio inorgânico celular e incremento do mercúrio orgânico em eritrócitos após remoção destas restaurações o que indica uma ligação do mercúrio orgânico nos sítios previamente ocupados pelo mercúrio inorgânico (Halbach *et al.*, 2008). A dosagem sanguínea é útil para a detecção da exposição ao metilmercúrio, já que pelo menos 80% deste se encontra ligado ao grupo sulfidril (-SH) da hemoglobina nos glóbulos vermelhos.

Alguns investigadores observaram exalação de vapor de mercúrio elementar após administração oral de mercúrio mercúrico em ratos, indicando que o mercúrio inorgânico pode ser reduzido no organismo em mercúrio elementar (Sugata & Clarkson, 1979). Esta redução pode ocorrer via NADPH e NADH ou pela produção de ânion superóxido pelo sistema xantina-oxidase (Ogata *et al.*, 1987).

O mercúrio liberado da amálgama, oxidado e ligado aos tecidos une-se fortemente ao grupamento -SH resultando na inativação de enzimas por sua toxicidade, podendo levar a lesão tecidual e ainda interferir em vários processos metabólicos (Malmstrem *et al.*, 1992; Asano *et al.*, 2000; Gilman & Hardman, 2007). Estudos *in vitro* indicam que o vapor de mercúrio pode afetar os processos biológicos envolvidos na doença de Alzheimer (Leong *et al.*, 2001).

Está bem estabelecido que o vapor de mercúrio elementar proveniente das restaurações dentárias com amálgama são inalados, absorvidos, retidos e em parte eliminados pelo organismo. A consequência toxicológica deste tipo de exposição ainda não é conclusiva em relação ao nível de segurança do uso da amalgama de mercúrio nas restaurações. Alguns órgãos americanos afirmam que é seguro o uso deste tipo de material (*American Dental Association*, 2003). Já no Reino Unido recomenda-se evitar a colocação, assim como, a retirada para evitar o processo de abrasão da restauração de amalgama de mercúrio em mulheres grávidas (*British Dental Health Foundation*, 2003). Na Suécia recomenda-se que indivíduos com doenças renais e mulheres em período gestacional e durante a amamentação devem evitar tratamento dentário com liga de amálgama, especialmente por sua ação genotóxica (Skerfving *et al.*, 1974; Vimy & Lorscheider, 1985; Oskarsson *et al.*, 1996; Vimy *et al.*, 1990; Bjorkman *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2006) e também existem dados que demonstram que alguns indivíduos, especialmente aqueles com bruxismo e também os consumidores de goma de mascar que possuem restauração de amálgama, podem “consumir” uma dose de até 100 µgHg o que corresponde a excreção de 50 µgHg/g de creatinina (Berlin, 2003). Estudo de Hylander *et al.* (2006) recomenda banir da prática a restauração com amalgama de mercúrio a fim de acabar com este tipo de emissão e risco.

A concentração estimada, nesta via de intoxicação, é controversa. O nível máximo de exposição ocupacional permitido nos Estados Unidos é de 50 mg/m<sup>3</sup>. Em indivíduos com restauração de amálgama a concentração de mercúrio inorgânico no sangue é de cerca de 4,3 µg/L (~16 nM) (Vamnes *et al.*, 2000) e de 2,55 µg/L de mercúrio total em indivíduos com cerca de 19,9 superfícies de amálgama (Kingman *et al.*, 1998). A EPA (Environmental Protection Agency, 1997) estima que cada amálgama libere de 3 a 17 µg de vapor de mercúrio por dia. Em indivíduos que não possuem restauração de amálgama, estima-se que a concentração de mercúrio sanguíneo seja menor que 0,5 nM (de Assis *et al.*, 2003). A concentração no sangue, relatada em populações não expostas é de aproximadamente 3 µg/L (~11 nM) (WHO, 1990).

Clarkson *et al.* (1993) relatam que 1 a 15 nmolHg / dia são ingeridos por indivíduos com um moderado número de restaurações de amálgama. Fredèn *et al.* (1974) encontraram na mucosa oral, em contato com a amálgama, 380 µg Hg/g e Hahn *et al.* (1990) em média 10 µgHg / g. Levando-se em conta que este metal

possui uma meia-vida biológica longa, o acúmulo durante anos pode provocar danos reais em vários órgãos e sistemas, mesmo que em baixas concentrações.

O mercúrio proveniente de diversas fontes tanto naturais quanto antropogênicas quando em contato com sedimentos aquáticos é objeto de conversão microbiana em metilmercúrio que é o mais tóxico composto que se biomagnifica na cadeia alimentar aquática tornando-se um risco para os humanos que pertencem ao topo desta cadeia (Clarkson et al., 2003; Brodtkin et al., 2007).

Outra via comum de exposição ao mercúrio (MeHg) em humanos é o consumo de peixes contaminados que além de exercer efeito direto no organismo, pode reduzir o efeito protetor do omega-3 contra riscos cardiovasculares (Virtanen et al., 2005). Estudo de Myers et al. (2000) observa efeito neurotóxico do metilmercúrio, mas não faz relação com o consumo de peixe embora recomende cautela no consumo por crianças. Salonen et al. (1995) demonstraram que alto consumo de peixe causa acúmulo de mercúrio e há associação com infarto agudo do miocárdio, doença arterial coronariana e promoção de peroxidação lipídica em homens.

Este tipo de intoxicação gera um risco potencial no desenvolvimento neurológico normal, além de aumentar o risco de infarto do miocárdio (Virtanen et al., 2007; Mergler, 2007). Embora estudos evidenciem os benefícios do consumo de peixe em detrimento de seu risco potencial (Oomen et al., 2000; Mozaffarian & Rimm, 2006; Virtanen et al., 2008; Montgomery et al., 2008), a ingestão de algumas espécies de peixes como Peixe-espada (*swordfish*), tubarão (*shark*), cavala (*king mackerel*), peixe-paleta (*tilefish*) e filé de atum (*tuna steak*) não é recomendada principalmente para mulheres grávidas, em processo de amamentação ou que pretendem engravidar e também crianças. (EPA, 2001; Levenson & Axelrad, 2006; Lindberg et al., 2007; *The Madison Declaration on Mercury Pollution*, 2007). Existem inúmeras espécies fora da lista convencional do topo da cadeia alimentar que pelo seu habitat apresentam alto teor de mercúrio, como em algumas regiões ribeirinhas no Brasil (Boldrini et al., 1983; Pinheiro et al., 2006 e 2007; Passos & Mergler, 2008), e em outros países como Canadá e Estados Unidos (Taylor, 2000; Srogi, 2007) e seu consumo também é desencorajado. O recomendável seria uma investigação da qualidade do peixe consumido em cada região para determinar uma recomendação segura para os consumidores, que até o momento é de três peças de peixe por semana (*American Heart Association*) desde que considerada sua procedência (WHO, 1990; Azevedo, 2003; Levenson & Axelrad, 2006; Mahaffey et al., 2008).

O metilmercúrio da dieta é quase que completamente absorvido e transportado pela corrente sanguínea (WHO, 1990). E é através dela que ele chega aos tecidos em aproximadamente quatro dias (Kershaw *et al.*, 1980), entretanto leva cerca de seis dias para alcançar concentrações tóxicas no cérebro (Berlin, 1986). A via de entrada do metilmercúrio na célula se dá em grande parte pela formação do complexo L-cisteína e possivelmente homocisteína e a sua eliminação pela formação do complexo com a glutatona (Ballatori & Clarkson, 1985).

A FDA (2004) recomenda um limite máximo diário na dieta de consumo de metilmercúrio de 30 µg/dia, o que equivale a 0,43 µg /kg/dia para um adulto de 70 kg, enquanto a organização mundial de saúde (WHO, 1990) recomenda um valor de 0,47 µg/kg/dia. Mais recentemente, a *National Research Council* preconizou dose de 0,1 µg / Kg / dia (NRC, 2000). Porém, há esforços para que esta dose de segurança seja diminuída à metade (Grandjean *et al.*, 1997).

A terceira via de intoxicação por mercúrio, amplamente comentada e controversa na literatura é o uso do timerosal (etilmercúrio). Este ainda faz parte da prática médica, principalmente na conservação de vacinas, a despeito de evidências, desde a década de 30, que indica sua toxicidade em humanos e inefetividade como agente antimicrobiano (Engley, 1956; Seal *et al.* 1991; Geier *et al.*, 2007). Vários estudos em animais desenvolvidos desde a década de 50, com grande variedade de concentrações expostas (0,19-0,76 mg/Kg; 0,6mg/mL; 12,5 ppm; 4,2 ppm), demonstraram os efeitos agudos e crônicos do etilmercúrio no sistema nervoso, respiratório, renal, hepático, vascular e reprodutor. (Trakhtenberg, 1950 *in* Geier *et al.*, 2007). Spann *et al.* (1972) observaram alterações genéticas significantes em células expostas a níveis menores que 1 ppb de mercúrio, e risco associado a exposição ao timerosal e presença de malformações em ratos, respectivamente. Estudo recente, aponta que sintomas de autismo podem estar relacionados à intoxicação por mercúrio atribuída a redução da capacidade de excreção deste metal e ao aumento do estresse oxidativo provocado pelo mesmo (Geier *et al.*, 2008). Em contrapartida, em estudo de revisão desenvolvido por Parker *et al.* (2004) não se observa relação entre timerosal e autismo.

Assim, a U.S. FDA (*Food and Drug Administration*, 2004) ainda não considera incontestável essas evidências para recomendar a suspensão deste tipo de vacina para crianças e mulheres grávidas baseada nos níveis permitidos de metilmercúrio estipulados pela organização mundial de saúde (WHO, 1996) assim

como o estudo inglês de *cohort* de Heron & Golding (2004) que não correlaciona alterações neurológicas a exposição ao timerosal. No entanto, salienta-se a necessidade de acabar com este tipo conservante em vacinas o mais breve possível.

Todas as formas de mercúrio possuem efeitos adversos na saúde humana quando em altas doses. No entanto, a evidência que exposição a baixas doses de mercúrio semelhantes àsquelas encontradas em indivíduos pelo consumo de peixe, uso de amalgama dental e vacina com timerosal, causa efeitos adversos, necessita ser melhor investigado (Clarkson *et al.* 2003).

Schober *et al.* (2003) estimam que mães com concentrações sanguíneas de mercúrio acima de 5,8 µg Hg/L possuem risco de seus filhos desenvolverem dano cerebral o que é contestado pela ASTDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999) e pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1991). Na verdade, a luz do conhecimento até o momento ainda não se pode definir os possíveis efeitos da exposição ao mercúrio em baixas concentrações, o que não anula a hipótese de que existam riscos (Clarkson *et al.*, 2003).

Órgãos federais brasileiros, pensando neste problema, criaram mecanismos de proteção por meio de uma portaria (Portaria Nº 744-A / 99, de 25 de Agosto de 1999) que aprova os programas de ação específicos para evitar ou eliminar a poluição proveniente das fontes múltiplas de mercúrio.

Conhecendo as fontes de mercúrio e seus mecanismos de ação, vale à pena ressaltar suas ações específicas nos diversos órgãos afetados.

## **1.2 AÇÃO DO MERCÚRIO NOS DIVERSOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

Todas as formas de mercúrio causam efeitos tóxicos em vários órgãos e tecidos, dependendo da forma química, nível, duração e rota de exposição (Zalups, 2000). Segue descrição dos principais efeitos do mercúrio nos principais órgãos e sistemas afetados.

### **1.2.1 Sistema Nervoso Central**

Day *et al.* (2005) observaram que ratos expostos cronicamente à dieta com 10 a 70 ppm de mercúrio além de apresentar déficit neuromotor não eram beneficiados pela ação protetora dos ácidos graxos derivados de peixes

administrados concomitantemente na dieta. Estudo de Echeverria *et al.* (1998) demonstraram alterações comportamentais em indivíduos com concentração urinária de mercúrio semelhante às encontradas na população em geral, o que não foi verificado por Weil *et al.* (2005) com concentrações sanguíneas média de 2,1 µg/L.

A ação do mercúrio neste sistema também se dá pela sua união ao grupamento –SH, que leva à inibição de enzimas que contêm este grupamento, ao rompimento de membranas celulares (Yee & Choi, 1994) causando danos estruturais em proteínas além de afetar o DNA por ação direta sobre os microtúbulos (Clarkson, 1987). A capacidade de unir-se a –SH faz também com que o mercúrio iniba vários receptores (muscarínicos, dopaminérgicos e nicotínicos) e promova o bloqueio do canal de Ca<sup>+</sup> em neurônios ganglionares (Weinsberg *et al.*, 1995).

Geralmente, o metilmercúrio é transportado por meio do complexo de cisteína (Simmons-Willis *et al.*, 2002) que tem grande semelhança com o aminoácido metionina o que pode favorecer o seu transporte para dentro das células endoteliais dos vasos cerebrais e, por conseguinte exercer importante dano cerebral e vascular (Kerper *et al.*, 1992). O metabolismo do metilmercúrio possui um período latente, onde após a exposição não há efeitos imediatos, no entanto, durante certo período ocorrem mudanças bioquímicas, como a ligação com carbono e posterior liberação de radicais livres que estão envolvidos na peroxidação lipídica e provocam lesões irreversíveis especialmente nas células neuronais.

Estudo em córtex cerebral de animais sugere que o mercúrio pode influenciar a atividade da colinesterase e monoamino oxidase, que são enzimas importantes na síntese e degradação de neurotransmissores (Basu *et al.*, 2007). Em cultura de astrócitos, mostrou-se o papel do estresse oxidativo promovido pela intoxicação com mercúrio (Skanker *et al.*, 2004) e elevadas concentrações extracelulares de glutamato, disfunção mitocondrial e prejuízo no estado antioxidante como contribuinte da ação deste metal no dano cerebral (Skanker *et al.*, 2005). Resultado semelhante foi encontrado em cultura de neurônios onde o MeHg induziu dano e morte celular que foi revertido com o uso de antioxidantes como a glutathione, catalase e cisteína (Park *et al.*, 1993). A metalotionina também é apontada como um bom protetor cerebral contra as ações tóxicas do mercúrio (Yasutake *et al.*, 2004; Aschner *et al.*, 2006).

Gassó *et al.* (2001) observaram em neurônios cerebelares de ratos que a intoxicação por mercúrio afeta o equilíbrio redox de forma diferente, na intoxicação

por  $\text{HgCl}_2$  a citotoxicidade é mediada pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) enquanto o MeHg, além disso, promove a peroxidação lipídica e ambos mecanismos parecem estar envolvidos com a homeostase de cálcio nestas células. Estudo recente que explora os efeitos tóxicos do mercúrio em ratos expostos a baixas concentrações de MeHg (0.05 mg/kg/dia), semelhantes as encontradas em indivíduos de áreas contaminadas, observou alterações neuromotoras relacionadas a maior peroxidação lipídica e níveis reduzidos de  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase e óxido nítrico, corroborando dados anteriores que correlacionam os efeitos do mercúrio com estresse oxidativo (Chanez *et al.*, 1989; Rajanna *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 2008).

A neurotoxicidade do mercúrio inorgânico no sistema nervoso central é pouco conhecida em humanos. Kang-Yum & Oransky (1992) relataram alterações neurológicas em um adulto e uma criança de dois meses. Embora esta forma de mercúrio não seja tão tóxica quando comparada às outras formas, Clarkson *et al.* (1993) categorizam os compostos mercuriais de “supertóxicos”.

### 1.2.2 Rins

Outro sistema muito afetado pela ação tóxica do mercúrio, em especial do mercúrio inorgânico é o sistema renal. Vários estudos têm associado à exposição ao mercúrio a dano renal e alto risco de mortalidade pelo desenvolvimento de doença renal (Hodgson *et al.*, 2007).

Como citado anteriormente, o alvo primário da intoxicação por metilmercúrio é o sistema nervoso. Porém o sistema renal também pode ser afetado por esta forma de mercúrio e são relatadas alterações histológicas e piora da função renal após exposição aguda e crônica (Yasutake *et al.*, 1989). Tratamento crônico por dois anos com metilmercúrio em concentração de 5ppm evidenciou alterações histológicas importantes nos rins e cérebro (Eto *et al.*, 1997).

A perda da função glomerular é considerada uma das principais alterações promovidas pelo mercúrio no sistema renal. Devido a sua grande sensibilidade e capacidade de extrair substâncias do organismo os rins são o melhor indicador da toxicidade deste metal (Carmignani *et al.*, 1992). A toxicidade renal auto-imune é o maior indicador dos efeitos tóxicos da exposição de mercúrio inorgânico e uma das principais ações desta forma de mercúrio é a formação de glomerulonefrite auto-imune, causando proteinúria, oligúria e hematúria em indivíduos que ingeriram de 3.5 a 37 mgHg/Kg (Pesce *et al.*, 1977). Em animais, vários estudos relatam dano



renal após ingestão de mercúrio inorgânico e as principais alterações observadas foram necrose tubular e degeneração de células glomerulares com conseqüente perda da função renal (Carmignani *et al.*, 1989).

Os rins, especialmente o córtex renal, são alvos de acúmulo de mercúrio após exposição à forma elementar e inorgânica deste metal (Hahn *et al.*, 1990). No entanto, foi observado em macacos expostos a amálgama dental (mercúrio elementar) depósitos de mercúrio nos túbulos proximais (Danscher *et al.*, 1990).

O mecanismo de transporte e absorção do mercúrio nos rins provavelmente se dá pela sua união a glutathione, cisteína e também a outros mecanismos (Zalups & Lash, 2006). Estudos com inibição da atividade da enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase localizadas nas células epiteliais do túbulo proximal, que tem o papel de ser clivada em moléculas de glutathione, mostram acúmulo de mercúrio (Cannon *et al.*, 2000; Zalups *et al.*, 2000).

Um dos mecanismos de ação atribuídos aos efeitos biológicos do mercúrio nos sistema renal, a luz do que se conhece em outros sistemas reside na sua capacidade de ligar-se aos grupos tiol na membrana plasmática ou no meio intracelular levando a uma redução intracelular deste grupamento, redução esta que pode predispor a alterações no metabolismo celular e aumento do estresse oxidativo assim como lipoperoxidação (Girardi & Elias, 1995), disfunção mitocondrial, mudanças no metabolismo *heme*, apoptose e necrose celular provavelmente por um mecanismo facilitador para TNF (fator de necrose tumoral) (Zalups, 2000; Dieguez-Acuña *et al.*, 2004; Carranza-Rosales *et al.*, 2005; Stacchiotti *et al.*, 2006).

Uma das principais interações intracelulares do mercúrio nas células epiteliais renais consiste na indução da metalotionina em unir-se a este metal (Zalups & Cherian, 1992) e a depleção da glutathione (Zalups & Lash, 1990; Girardi & Elias, 1995). A administração de  $\text{HgCl}_2$  em ratos causou redução significativa da atividade de vários antioxidantes como: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e redutase (Gstraunthaler *et al.*, 1983).

Estudos com diversos tipos de antioxidantes, demonstram que estes podem prevenir danos causados pela intoxicação renal por  $\text{HgCl}_2$  (Augusti *et al.*, 2007 e 2008; Sharma *et al.*, 2007). No entanto, são dependentes da dose de mercúrio utilizada, pois estudo com uso de agentes quelantes como DMPS (ácido 2,3-Dimercapto-1-propanesulfônico) e NAC (N-acetilcisteína) aumentaram a toxicidade

renal do mercúrio por se tornarem agentes transportadores do mercúrio para o interior dos túbulos renais (Brandão *et al.*, 2006).

A intoxicação em doses de 7,5 mg/Kg de HgCl<sub>2</sub> pode causar falência renal mediada pela redução da NOS cerebral presentes em células renais com conseqüente redução do NO (Yanagisawa *et al.*, 2002).

### **1.2.3 Sistema Cardiovascular**

Os efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular e sua associação com a hipertensão arterial, aterosclerose, infarto agudo do miocárdio e doença arterial coronariana passaram a ser melhor investigados nas duas últimas décadas (Salonen *et al.*, 2000; Guallar *et al.*, 2002; Virtanen *et al.*, 2005 e 2007; Houston, 2007).

Estudos clínicos têm reportado associação entre doença cardiovascular e exposição ao mercúrio. Através da relação da concentração de mercúrio com episódios de infarto do miocárdio e ainda alguns reportam a relação deste efeito com a diminuição do efeito protetor dos ácidos graxos – omega 3 (Rissanen *et al.*, 2000; Salonen *et al.*, 1995 e 2000; Guallar *et al.*, 2002; Virtanen *et al.*, 2005 e 2007). Em estudo de Virtanen *et al.* (2005) foi observado que cada miligrama de mercúrio encontrada no cabelo corresponde a 11% de aumento de risco de evento cardiovascular agudo e 13% de risco de morte por doença coronariana. Salonen *et al.* (1995) afirmam que para cada 30g de peixe contaminado consumido por dia aumenta em 2,1 vezes o risco de infarto agudo do miocárdio. Apesar disso, esta questão é muito discutida, pois autores como Yoshizawa *et al.*, (2002), Ahlqwist *et al.*, (1999) não encontraram relação entre mercúrio, doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico e Hallgren *et al.* (2001) sugerem que os efeitos protetores de omega 3 são superiores ao possível efeito tóxico do mercúrio sobre o sistema cardiovascular.

O mercúrio orgânico e o inorgânico acumulam-se no coração e tem sido associado à elevação da pressão arterial e anormalidades no ritmo cardíaco (McCrea & Meek, 1928; Sorensen *et al.*, 1999; EPA, 1997; NRC, 2000). Existem relatos de crianças expostas ao mercúrio proveniente de termômetros, pasta de dente contendo calomel (mercúrio orgânico) que desenvolvem hipertensão e taquicardia (Wossmann *et al.*, 1999).

Ashe *et al.* (1953) demonstraram que em coelhos a exposição ao vapor de mercúrio promove degeneração e necrose no sistema cardiovascular, sendo este efeito dependente da concentração de mercúrio (baixas concentrações). Ainda, no sistema cardiovascular a exposição aguda ao mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) além de favorecer o aparecimento de arritmias, reduz a atividade eletromecânica, a condução átrio-ventricular, o desenvolvimento de força e da pressão sistólica em corações isolados expostos a concentrações micromolares (0.5, 1, 2 e 10  $\mu\text{M}$ ) (Massaroni *et al.*, 1992 e 1995; Vassallo *et al.*, 1999). Em trabalhos desenvolvidos por este mesmo grupo utilizando exposição aguda a baixas concentrações de cloreto de mercúrio observou-se a redução da força desenvolvida pelos músculos papilares de ratos (Oliveira & Vassallo, 1992) e também por tiras de ventrículos de sapo (Oliveira *et al.*, 1994), bem como, aumento da pressão de perfusão coronariana em ratos (da Cunha *et al.*, 2001).

Em concentrações menores, de 5nM – 50nM, administradas agudamente, foi notada inibição da atividade da ATPase miosínica em tiras de ventrículo de ratos, sendo este efeito dependente da presença do grupamento -SH na molécula de miosina o que a torna susceptível a união com o mercúrio. No entanto, este efeito foi revertido pela ação de glutathione e DTT (ditiotreitól) (Moreira *et al.*, 2003; Assis *et al.*, 2003), e em músculo cardíaco isolado este mesmo efeito foi revertido pela cisteína (Vassallo *et al.*, 1999). Resultados similares foram encontrados em músculo papilar de cobaias na presença de mercúrio orgânico com redução da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase (Halbach *et al.*, 1989).

Os efeitos cardiovasculares do mercúrio podem ser diretos ou indiretos onde a toxicidade do mercúrio interfere no controle neural da função cardíaca (EPA, 1997). Possivelmente as vias pelas quais o mercúrio promove disfunção cardíaca sejam o desequilíbrio da homeostase de cálcio, além da união ao grupo tiol promover a destruição de componentes celulares como a glutathione, resultando em diminuição tanto da glutathione como de coenzima A e cisteína, que são importantes mecanismos celulares antioxidantes. O mercúrio precipita complexos insolúveis de selênio-mercúrio, e sua forte ligação ao selênio prejudica a função antioxidante deste, além de promover a geração de radicais livres aumenta o processo oxidativo e o dano oxidativo celular de constituintes do DNA podendo promover dano cardiovascular (Raymond & Ralston, 2000; Seppänen *et al.*, 2000; Levenson & Axelrad, 2006). Outra via de formação de radicais é por meio da reação de Fenton

( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$ ), o mercúrio provavelmente ocupa o sítio do ferro desencadeando a reação que culmina com a produção de radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ) que é altamente lesivo (de Campos & Yoshida, 2004; Virtanen *et al.*, 2007). Outros efeitos deste metal podem ser atribuídos a alterações na agregação plaquetária pela união com grupo tiol presentes na  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase (Kumar *et al.*, 2001).

Já foi demonstrado que a exposição crônica ao mercúrio promove aumento da resistência vascular e induz a hipertensão arterial (Wakita, 1987; Carmignani *et al.*, 1992; Houston, 2007). Ratos tratados cronicamente com  $50\mu\text{g/ml}$  de  $\text{HgCl}_2$  por 350 dias, apresentaram aumento do inotropismo e da pressão arterial provavelmente por alteração da responsividade dos adrenocetores alfa ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) e beta ( $\beta_2$ ) e por redução do baroreflexo (Carmignani *et al.*, 1983 e 1989). Estes mesmos autores utilizaram tratamento por 180 dias em água de beber com  $\text{HgCl}_2$  em concentração de  $200\ \mu\text{g/ml}$  e observaram aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina e redução da renina plasmática associado ao aumento da pressão arterial e do inotropismo cardíaco (Carmignani *et al.*, 1992). Em 1993, estes mesmos autores investigando a exposição a menores concentrações de cloreto de mercúrio ( $0.28\ \text{mg/kg/dia}$ ) observaram aumento da pressão arterial e uma pequena tendência à resposta inotrópica negativa.

Estudos com injeções agudas de altas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  ( $5\ \text{mg/kg}$ ) mostraram aumento a resistência vascular pulmonar e redução a pressão arterial sistólica e diastólica em ratos anestesiados (Rossoni *et al.*, 1999). Curiosamente a exposição aguda a concentrações mais baixas ( $680\ \text{ng/Kg}$ ) de  $\text{HgCl}_2$  revelou efeito antagônico aumentando a pressão arterial sistólica e diastólica e também a frequência cardíaca de ratos sendo este mecanismo aparentemente dependente da geração de espécies reativas de oxigênio (Machado *et al.*, 2007).

Os efeitos agudos do mercúrio ainda que em baixas doses ( $0.5, 1, 2, 5, 10\ \mu\text{M}$  e  $20\ \text{nM}$ , respectivamente) incluem a vasoconstrição em artérias caudais de ratos mediada por formação radicais livres que provavelmente reduzem a biodisponibilidade do NO (da Cunha *et al.* 2000; Wiggers *et al.*, 2008). Partes destes efeitos são mediados pelo aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e podem ser revertidos com o uso de antioxidantes (Vassallo *et al.*, 1999; Wiggers *et al.*, 2008).

O mercúrio também pode causar dano ao endotélio vascular, no retículo sarcoplasmático, sarcolema, proteínas contráteis, diminuição dos níveis de hemoglobina e diminuição da síntese do citocromo P450 (Veltman & Maines, 1986; Salonen, 1998). Ao unir-se a hemoglobina nos sítios de oxigênio reduz também a capacidade desta de transportar este gás (Trepka et al., 1997). Todos estes mecanismos podem levar o aumento da peroxidação lipídica, como por exemplo, a oxidação de LDL, reconhecido fator de risco aterogênico. Salonen *et al.*, (2000) demonstraram que existe correlação entre conteúdo de mercúrio em fios de cabelo e a oxidação desta lipoproteína.

O efeito do mercúrio sobre o sistema cardiovascular é controverso, existem relatos tanto de vasodilatação em artérias aorta e pulmonar (<sup>a</sup>Golpon *et al.*, 2003) quanto de vasoconstrição no leito vascular caudal (da Cunha *et al.*, 2000) o que sugere que a ação deste metal no sistema vascular é variável e dose-dependente. Ambos os estudos relacionam seus efeitos a alterações na via do óxido nítrico, geração de espécies reativas de oxigênio e também demonstram alterações morfológicas de anéis de aorta quando expostos a concentração milimolares de mercúrio (<sup>b</sup>Golpon et al., 2003). Em perfusão de leito vascular mesentérico de resistência o cloreto de mercúrio (concentrações micromolares) promoveu aumento na pressão de perfusão basal indicando que os distúrbios circulatórios podem ter papel importante na toxicidade do mercúrio e este efeito está relacionado aumento de cálcio (Oka et al., 1979).

Numerosos estudos revelam que o mercúrio gera espécies reativas de oxigênio (ROS), embora o mecanismo exato da geração de radicais livres não esteja completamente elucidado. Há hipóteses que a depleção de GSH pela ação do mercúrio possa favorecer a produção de ROS que induz a oxidação de lipídios, proteínas e até do DNA (Houston, 2007). A integridade funcional do endotélio é crucial para a manutenção do fluxo sanguíneo e da capacidade antitrombótica, pois o endotélio libera fatores humorais que controlam o relaxamento e contração, trombogênese e fibrinogênese e ativação e inibição plaquetária. O endotélio vascular é altamente sensível ao estresse oxidativo e que pode causar disfunção endotelial, disfunção esta frequentemente observada em doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial e a aterosclerose (Touyz 2004; Félétou & Vanhoutte 2006). É sabido que, pela interação com o óxido nítrico (NO), o anion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) forma

peróxido de nitrito, e deste modo reduz a disponibilidade do NO para o relaxamento do músculo liso vascular.

O tratamento com metilmercúrio induz citotoxicidade concentração-dependente (1 a 5  $\mu\text{M}$ ) em células endoteliais humanas (HUVEC) assim como reduz a atividade da NO sintase (NOS), afeta o crescimento celular, formação de microtúbulo e migração causando dano celular que pode ser associado a patogênese da aterosclerose (Kishimoto et al., 1995<sup>a,b</sup>). O acúmulo de ROS induzido por altas concentrações de cloreto de mercúrio também resulta em citotoxicidade em células endoteliais bovinas (Wolf & Baynes, 2007). Similarmente, Park & Park (2007) demonstraram recentemente que o cloreto de mercúrio aumenta ROS e promove apoptose em células epiteliais de bronquíolos. Apesar de inúmeros estudos demonstrarem que o mercúrio induz estresse oxidativo com subsequente dano em vários órgãos e sistemas, (Wakita 1987; Carmignani et al., 1992; Miller & Woods, 1993; Kishimoto et al., 1995; Huang *et al.*, 1996; Mahboob et al., 2001; Touyz 2004; Félétou & Vanhoutte 2006; Wolf & Baynes 2007; Park & Park 2007; Houston 2007) o efeito *in vivo* da exposição crônica, a baixas concentrações de mercúrio, na modulação endotelial das respostas vasculares ainda é pouco explorado.

#### **1.2.4 Outros Sistemas**

Outros sistemas, como o respiratório, também podem ser afetados pelo vapor de mercúrio elementar e causar edema pulmonar, congestão, tosse e pneumonia intersticial (Bluhm *et al.*, 1992; Taueg *et al.*, 1992). Ratos expostos a 27mgHg/m<sup>3</sup> durante uma hora apresentaram sinais de dispnéia, enquanto a exposição por duas horas resultou em morte por asfixia (Livardjani *et al.*, 1991). Em outros estudos a exposição aguda provocou degeneração e necrose pulmonar (Ashe *et al.*, 1953).

Há ainda relatos de danos pela inalação de vapor de mercúrio nos sistemas gastrointestinal, hepático, hematológico, imunológico, reprodutor e dérmico onde o mercúrio causa inúmeros efeitos carcinogênicos e genotóxicos. Alterações gastrointestinais como irritação da mucosa associada à diarreia, náuseas e vômitos também são relatados como efeito tóxico do HgCl<sub>2</sub>. Estudos com administração de mercúrio em baixas doses por *gavagem* (0,1mg/Kg) evidenciam dano e aumento do estresse oxidativo no fígado (Bando *et al.*, 2005).

### 1.3 ESTRUTURA DOS VASOS DE RESISTÊNCIA E SEU PAPEL NA MANUTENÇÃO DA RESISTÊNCIA VASCULAR.

O equilíbrio do tono vascular é fundamental para a manutenção das funções do vaso e na fisiopatologia de várias doenças. As artérias de resistência possuem um diâmetro de 100 a 300  $\mu\text{m}$  (Christensen & Mulvany, 2001) são formados por camadas denominadas: *íntima*, constituída de células endoteliais pavimentosas simples que revestem a luz do vaso e repousa sobre uma lâmina elástica interna; *média*, composta por células musculares lisas de disposição circular e de tecido conjuntivo fibroelástico; e *adventícia* que é a camada mais externa, formada por tecido conjuntivo, contendo basicamente fibras de colágeno, elastina e componentes celulares como fibroblastos e macrófagos (Pugsley & Tabrizchi, 2000). A lâmina elástica interna é formada por fenestrações que permitem a passagem substâncias do sangue para a parede vascular, e vice-versa. Já a lâmina elástica externa, é fragmentada ou em alguns casos ausente em pequenas artérias de resistência (Walker-Caprioglio, 1992).

A matriz extracelular é um dos principais constituintes da parede dos vasos sanguíneos. Composta de fibras colágenas e elásticas determina as características mecânicas e estruturais da parede vascular de artérias de resistência (Briones *et al.* 2003). Além disso, juntamente com os componentes celulares de cada camada participam da regulação de processos celulares como: adesão, migração e proliferação celular, influenciando dessa maneira na estrutura da parede vascular.

O colágeno possui cerca de 13 tipos no sistema vascular, os quais contribuem para a manutenção da estrutura e integridade da parede vascular com importante papel em vários eventos celulares incluindo adesão, migração e proliferação celular (Plenz *et al.* 2003).

A elastina é um componente importante da matriz extracelular de artérias de resistência, embora nestes vasos sua proporção em relação ao colágeno seja bastante menor comparada a vasos de condutância. As fibras elásticas são estruturas complexas formadas por elastina associada à glicoprotéínas hidrofílicas e enzimas responsáveis pelo entrecruzamento dos peptídeos de elastina. Estas fibras estão organizadas como “lâminas” concêntricas fenestradas ou lamelas que separam as diferentes camadas da parede vascular. Uma fina lâmina de tecido elástico separa a camada íntima da camada média (lâmina elástica interna) e outra a camada média da camada adventícia (lâmina elástica externa). Juntamente com o

colágeno, a elastina constitui um fator importante para a determinação das propriedades mecânicas e estruturais da parede vascular de artérias de resistência (Briones *et al.*, 2003).

A resistência vascular periférica, determinante na manutenção da pressão arterial, varia inversamente ao raio do vaso a quarta potência (Lei de Poiseuille –  $R = 8\eta L/\pi r^4$ , nos quais  $\eta$  = viscosidade; L = comprimento; r = raio). Dessa maneira, pequenas alterações do diâmetro luminal podem influenciar grandemente na resistência vascular periférica. O diâmetro luminal, por sua vez, é determinado pelas propriedades passivas e ativas da parede arterial. As propriedades passivas podem ser descritas pela relação pressão:diâmetro sob condições onde as células musculares lisas estão completamente relaxadas. Já as propriedades ativas dos vasos sanguíneos são determinadas pelo estado contrátil das células musculares lisas, pelo seu número e organização. Assumindo um determinado grau de ativação de uma célula muscular lisa, e que este produz um dado nível de força por área de secção transversal, a pressão contra a qual um vaso pode contrair será (de acordo com a Lei de Laplace) proporcional à relação parede: lúmen (ou mais corretamente à relação média: lúmen) (Mulvany, 1984). A característica estrutural primária dos vasos é dessa maneira determinada pelo diâmetro interno e pela espessura da parede (ou da camada média), medidas sob condições de completo relaxamento das células musculares lisas e sob uma dada pressão intravascular. De acordo com o diâmetro e a espessura da parede, um outro parâmetro que pode ser medido é a área de secção transversal; a medida deste parâmetro é importante uma vez que indica a quantidade de material que compõe a parede vascular e dessa maneira fornece informação sobre processos biológicos os quais determinam a estrutura vascular, como crescimento ou regressão celular.

### **1.3.1 Fatores reguladores do tônus vascular**

Além da estrutura propriamente dita, em especial a integridade estrutural e funcional as células endoteliais que formam uma monocamada que reveste todo o sistema vascular são fundamentais para a manutenção da homeostasia da parede do vaso e da função circulatória. O endotélio vascular é um tecido multifuncional com propriedades sintéticas e metabólicas, como a manutenção da barreira de permeabilidade do vaso; elaboração de moléculas anticoagulantes e antitrombóticas; elaboração de moléculas pró-trombóticas; produção de matriz extracelular;



modulação do fluxo sanguíneo e da reativação celular; regulação da inflamação, imunidade e crescimento celular (Poher & Cotran, 1990). Sua participação na regulação do tônus do músculo liso vascular se dá através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras que serão descritas a seguir.

### 1.3.1.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é a principal substância vasodilatadora derivada do endotélio. É um gás que se difunde facilmente pelas membranas celulares e ainda possui ação inibitória sobre a agregação e adesão de plaquetas a superfície vascular e proliferação celular (Moncada *et al.*, 1991; Heller *et al.*, 1999). Este radical livre provém do aminoácido L-arginina que é transformado em óxido nítrico (NO) e L-citrulina. Para que ocorra esta reação se consome oxigênio e NADPH (adenina dinucleotídeo fosfato) e requerem cofatores como FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina adenina mononucleotídeo), BH<sub>4</sub> (tetrahydrobiopterina) e calmodulina (Stuehr *et al.*, 1991; Hevel *et al.*, 1991). Três diferentes isoformas que podem sintetizar o NO: NO sintase endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) que são constitutivas nas células endoteliais e neuronais respectivamente e são dependentes do complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina para sua ativação e a iNOS que é a forma induzida por estímulos imunológicos que pode ser expressa em macrófagos, células endoteliais e são ativadas pela concentração de cálcio intracelular (Forstmann *et al.*, 1994).

A produção de NO, sob condições fisiológicas, é realizada pelas células endoteliais estimulada por vários fatores e pelas forças de cisalhamento produzidas pelo fluxo sanguíneo no vaso (*shear stress*). O NO liberado se difunde rapidamente para o músculo liso vascular e ativa a guanilato ciclase solúvel que converte GTP (guanidil trifosfato) em GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) (Carvajal *et al.*, 2000) que por meio da PKG (proteína quinase dependente de GMPc) dispara diversas fosforilações que reduzem o conteúdo e sensibilidade ao Ca<sup>+2</sup> intracelular e promovem relaxamento. Assim, a PKG ativa canais de K<sup>+</sup> dependentes de Ca<sup>+2</sup> que inibem a entrada de cálcio do conteúdo extracelular pelos canais de Ca<sup>+2</sup> dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana e promovendo relaxamento. Estes últimos canais podem sofrer ação direta da PKG, e ainda esta pode atuar nas Ca<sup>+2</sup>ATPases da membrana plasmática ativando a saída de cálcio e no retículo sarcoplasmático (SERCA) estimulando sua recaptação. A PKG ainda age

nos receptores  $IP_3$  (1,4,5-trifosfato de inositol) no retículo sarcoplasmático, promovendo a saída de  $Ca^{+2}$  ao citoplasma. Por outro lado, a PKG fosforila a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) inibindo sua atividade e reduzindo a contração muscular lisa vascular (Marín & Rodriguez-Martinez, 1997; Lincoln *et al.*, 2001).

O NO pode ainda ter efeito direto sobre os canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{+2}$  e também inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) entre outros (Stoclet *et al.*, 1999). Outra reação do NO é a formação de S-nitrosotiois (SNO) que tem propriedade de unir-se de forma covalente aos tióis ou aos metais de transição podendo modificar a função destas proteínas. O NO também pode reagir com radicais livres derivados do oxigênio especialmente os ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e perder sua atividade vasodilatadora e ainda produzir substâncias citotóxicas como o peróxido de nitrito ( $ONOO^-$ ) e radicais hidroxila ( $OH^-$ ) (Padmaja & Huie, 1993; Stoclet *et al.*, 1999). A perda da atividade biológica do NO resultante da interação com radicais livres derivados de oxigênio pode contribuir para os mecanismos fisiopatológicos associados à hipertensão e outras doenças (Kerr *et al.*, 1999; Chatterjee & Catravas, 2008).

### 1.3.1.2 Prostaglandinas

Outras substâncias liberadas pelo endotélio com poder vasomotor e antiplaquetário são os prostanóides (Wright *et al.*, 2001). Os prostanóides melhor caracterizados são as prostaglandinas (PG)  $E_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGD_2$ ,  $PGI_2$  e  $TXA_2$  (tromboxano  $A_2$ ). Todos são derivados do ácido araquidônico (AA) que libera os fosfolipídeos de membrana pela ativação da  $PLA_2$  (fosfolipase  $A_2$ ). A enzima chave na síntese de prostanóides é a prostaglandina II sintase, ou também conhecida como COX. Esta transforma o AA em  $PGH_2$  que é o precursor dos prostanóides que dependem das isomerases de cada tipo celular. Cada prostanóide exerce sua função vasoconstritora ou vasodilatadora quando acoplado a um receptor específico ligado à proteína G, que quando ativados estimulam a adenilato ciclase (AC) aumentando o AMPc (receptores  $IP$ ,  $EP_2$ ,  $DP$  e  $EP_4$ ) e promovendo o relaxamento do músculo liso vascular ou reduzindo AMPc ( $EP_3$ ,  $FP$  e  $TP$ ) produzindo então vasoconstrição.

No endotélio a principal é a prostaciclina ( $PGI_2$ ), que uma vez liberada induz o relaxamento da musculatura lisa vascular e agregação plaquetária mediados pela

ativação da enzima adenilato ciclase e conseqüentemente aumento de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) formado a partir da quebra de ATP (adenosina tri fosfato) (Davidge, 2001). Esta ação depende de receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular, que por sua vez ativa a adenilato ciclase que transdorma ATP em AMPc (monofosfato cíclico de adenosina). Este estimula a saída para o citosol e reduz a sensibilidade da maquinaria contrátil ao  $Ca^{+2}$  e ainda estimula canais de  $K^+$  sensíveis a ATP hiperpolarizando a membrana e causando relaxamento (Parkington *et al.*, 1995).

Se tem descrito dois tipos diferentes de COX, a tipo 1 (COX-1) e tipo 2 (COX-2), sendo que a primeira é constitutiva nas maioria das células e a segunda expressa-se em vários tipos celulares mediante estímulos como o inflamatório. Em artérias mesentéricas a COX-2 está presente em células endoteliais e adventícias (Briones *et al.*, 2005). A regulação da expressão de COX-2 pode ser dada principalmente pelo  $NF\kappa B$  assim como pelo estresse mecânico produzido pelo fluxo sanguíneo nos vasos (*shear stress*). Em condições fisiológicas há um equilíbrio da formação de prostanóides vasodilatadores e vasoconstritores gerados pela COX participando, deste modo, da manutenção do tono vascular. No entanto em algumas doenças vasculares os prostanóides vasoconstritores podem estar aumentados (Vanhoutte *et al.*, 2005).

### **1.3.1.3 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio - EDHF**

Embora ainda não se saiba sua gênese, existe outro fator vasodilatador sintetizado pelas células endoteliais chamado fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) com grande importância nas artérias de resistência e arteríolas (Tomioka *et al.*, 1999). Este fator promove o relaxamento pela hiperpolarização das células musculares lisas através da ativação de canais de potássio dependentes de  $Ca^{+2}$ , que é como ele age, por exemplo, em leito vascular mesentérico (Adeagbo & Triggle, 1993). Sabe-se que o NO pode modular a liberação do EDHF via inibição do citocromo P450, o que contribuiria para homeostase vascular quando da depleção do NO (de Wit *et al.*, 2000). Ainda a geração de radicais livres como o  $H_2O_2$  são fortes candidatos a EDHF (Shimokawa & Matoba, 2004), onde ativam canais de  $K^+$  dependentes de cálcio de larga condutância no músculo liso vascular através da modificação direta da molécula do canal, ativação da GC ou do metabolismo do

ácido araquidônico causando relaxamento no músculo liso vascular (Barlow et al., 1998; Hayabuchi et al., 1998).

Na síntese de EDHF a hiperpolarização das células endoteliais pode seguir a três respostas: a) Hiperpolarização endotelial facilitando aumento de cálcio intracelular resultando na síntese de EDHF; b) Hiperpolarização endotelial conduzida para o músculo liso vascular através das *gap junctions* e c) liberação de íons  $K^+$  pelo endotélio ativando canais de  $K^+$  de larga condutância resultando na hiperpolarização do músculo liso vascular (Shimokawa & Matoba, 2004).

Vários canais de  $K^+$  estão expressos no músculo liso vascular de artérias de pequeno diâmetro e contribuem para a manutenção do potencial de membrana, por meio do efluxo de  $K^+$  resultando na hiperpolarização da membrana. Este efeito seguido do fechamento de canais de  $Ca^{+2}$  voltagem dependentes levam a redução de entrada de  $Ca^{+2}$  e vasodilatação (Nelson & Quayle, 1995), assim como a inibição destes canais de  $K^+$  levam a despolarização da membrana e vasoconstrição. Quatro tipos de canais foram detectados em células do músculo liso vascular: 1) Canais de  $K^+$  voltagem dependente ( $K_v$ ), abertos sob a despolarização da membrana plasmática no músculo liso vascular; 2) Canais de  $K^+$  de larga condutância ativados por alterações de cálcio intracelular ( $BK_{Ca}$ ) que tem papel importante na manutenção do potencial de membrana e podem ser bloqueados com uso de TEA; 3) Canal de  $K^+$  sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) que servem de ligação entre o metabolismo celular e a excitabilidade da membrana e 4) Canal de  $K^+$  retificador ( $K_{ir}$ ), abundante em vasos de resistência, contribuem para a manutenção do potencial de repouso da membrana (Nelson & Quayle, 1995; Ko *et al.*, 2008).

Vários vasoconstritores inibem a atividade dos canais de  $K^+$ , contribuindo para a despolarização da membrana celular. Geralmente, vasoconstrição é iniciada em um receptor de membrana acoplado através de uma proteína G a fosfolipase que gera segundos mensageiros diacilglicerol (DAC) e trifostato de inositol ( $IP_3$ ) que ativam a proteína quinase C (PKC) que inibe estes canais. Nas células musculares lisas, vários vasoconstritores como a angiotensina, endotelina, vasopressina, noradrenalina, histamina, serotonina inibem canais de  $K_{ATP}$  via ativação de PKC (Wakatsuki *et al.*, 1992).

Os vasodilatadores aumentam a concentração intracelular de AMPc a qual ativa PKA dependentes de AMPc ativando diversos canais e hiperpolarizando a membrana celular. Alguns vasodilatadores agem via guanilato ciclase,

primeiramente aumentam níveis intracelulares de GMPc e conseqüentemente ativam PKG dependente de GMPc (Standen & Quayle, 1998). A ativação de PKG pelo NO ou outros nitrovasodilatadores resulta na ativação de canais BKCa em células musculares lisas de artérias cerebrais e coronárias (Williams *et al.*, 1988).

Alterações no funcionamento dos canais de K<sup>+</sup> tem sido detectado em várias condições incluindo hipertensão, diabetes e dano cerebral, geralmente estes canais nas situações patológicas reduzem sua ação (Ko *et al.*, 2008)

#### **1.3.1.4 Endotelina**

Ainda existem outros fatores endoteliais ligados à constrição vascular. A endotelina (ET), sintetizada pelas células endoteliais e musculares lisa, tem seus efeitos no músculo liso vascular mediados pelos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> que induzem aumento do Ca<sup>+2</sup> intracelular proveniente de estoques intracelulares e extracelulares promovendo vasoconstrição. Nas células endoteliais, no entanto, os receptores ET<sub>B</sub> induzem vasodilatação pela produção de NO e PGI<sub>2</sub> (Schiffrin, 2005).

#### **1.3.1.5 Sistema Renina Angiotensina**

Outra substância vasoconstritora liberada pelos vasos é a angiotensina II. Derivada do sistema renina-angiotensina, que anteriormente acreditava-se ser somente um mecanismo sistêmico, no entanto sabe-se que é produzida localmente em órgãos como rins, coração, cérebro, córtex adrenal e vasos sanguíneos (Bader *et al.*, 2001; Lavoie & Sigmund, 2003). A angiotensina é sintetizada a partir de um ciclo que se inicia com a pré-pró-renina que é um peptídeo não ativo que se transforma em pró-renina que sob a ação de proteólise celular transforma-se em renina. Esta, uma vez liberada, age sobre o angiotensinogênio, precursor desta cadeia, que transforma-se em angiotensina I, que sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) dá lugar a angiotensina II, um potente vasoconstritor. Pela ação de aminopeptidases A e B podem degradar-se em angiotensina II e IV respectivamente. A angio II também pode ainda pela ação da ECA 2 formar angiotensina 1-7 (Ferreira & Santos, 2005; Lavoie & Sigmund, 2003). A ação da angiotensina II se dá via receptores específicos denominados AT<sub>1</sub> presente nas células musculares lisas e adventícia dos vasos, AT<sub>2</sub> detectado especialmente durante o desenvolvimento fetal, AT<sub>4</sub> que liga-se a angio IV e outro ainda não

identificado que liga-se a angio 1-7 todos este acoplados a proteína G (Ferreira & Santos, 2005; Touyz & Schiffrin, 2000). Os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, principais locais de ação da angiotensina II desenvolvem diversas funções como regulação do tônus vasomotor (vasoconstrição – AT<sub>1</sub> e vasodilatação – AT<sub>2</sub>), síntese de substâncias, inibição do crescimento celular, proliferação de células musculares lisas (Touyz & Schiffrin, 2000). A angiotensina II quando ligada ao receptor AT<sub>1</sub> localizado nas cavéolas, tem como mecanismo principal estimular a hidrólise de PIP<sub>2</sub> (fosfatidil inositol 4,5-bifosfato) pela fosfolipase C (PLC) formando IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-trifosfato) e DAG (diacilglicerol). O IP<sub>3</sub> estimula a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e aumentando o cálcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) e promove contração do músculo liso vascular. Já o DAG estimula a PKC que na membrana plasmática fosforila e ativa proteínas que interferem na função vascular promovendo contração e crescimento celular. Ainda a PKC pode ativar o trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> e a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase promovendo aumento de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> intracelular culminando com constrição vascular (Touyz & Schiffrin, 2000).

Os receptores AT<sub>2</sub>, ainda não tem todos seus mecanismo elucidados e realizam vasodilatação via liberação de NO (Horiuchi *et al.*, 1999) e podem estar envolvidos na resposta inflamatória renal pela ativação de NFκB (Esteban *et al.*, 2004).

As células endoteliais também formam e metabolizam a Angiotensina (1-7) que tem seus efeitos opostos ao da Angio II, pois promove vasorelaxamento, melhora a função endotelial e tem benefício a nível cardíaco. Seus efeitos parecem estar mediados pela produção de prostanóides vasodilatadores, de NO e EDHF (Ferreira & Santos, 2005). Ainda a Angiotensina II pode estimular a liberação de radicais livres especialmente o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).

### **1.3.1.6 Espécies Reativas de Oxigênio**

Em várias doenças cardiovasculares, há aumento do estresse oxidativo, caracterizado por um aumento de espécies reativas de oxigênio como os ânions superóxido (·O<sub>2</sub><sup>-</sup>), os radicais hidroxil (OH·), o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), dentre outros, associado com redução das defesas antioxidantes (Suzuki *et al.*, 1995; Hamilton *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). O ânion superóxido reage com o óxido nítrico formando o peroxinitrito que tem alta capacidade oxidativa (Beckman *et al.*, 1990; Goldstein & Czapski, 1995).

Dentre as substâncias que podem atuar e promover alterações vasculares importantes, e que estão de certa forma atreladas aos mecanismos supracitados, estão as espécies reativas de oxigênio (ROS). Produzem-se em todas as células aeróbias e caracterizam-se por ter elétrons desemparelhados. Algumas são altamente reativas como os radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e outras menos reativas como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).

Todos os tipos de células vasculares podem produzir  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e seus níveis são dependentes do balanço entre o sistema oxidante e antioxidante por vários mecanismos (Soccio *et al.*, 2005). O ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) se forma pela adição de um elétron a molécula de oxigênio e é produzido pela cadeia respiratória mitocondrial, pelas xantinas-oxidases, ciclooxigenase, lipoxigenase, pela NOS na falta de substrato ou cofatores, mas principalmente na parede dos vasos pela NADPH oxidase (NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Esta é uma enzima associada à membrana e componente citosólico. O citocromo  $b_{558}$  é o mais importante componente deste complexo e que confere estabilidade e atividade a esta enzima. Este heterodímero é composto por p22-phox, que desempenha importante papel na formação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  nas células vasculares e gp91-phox, mais conhecida como NOX. Possui diversas subunidades, NOX (1-7), phox (22, 47, 40, 67) e rac) (Zalba *et al.*, 2001) que catalizam a redução do oxigênio utilizando a NADH ou a NADPH como doadoras de elétrons. A NADPH quando ativada pela fosforilação da p47phox mediada por estímulos como força mecânica, fatores de crescimento, angiotensina II e citocinas vai atuar na formação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Soccio *et al.*, 2005). Esta molécula desempenha grande papel na indução de apoptose, angiogênese endotelial e expressão de fatores implicados na inflamação de células musculares lisas vasculares (Brandes & Kreuzer, 2005). Por outro lado, o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pode induzir contração vascular (Tosaka *et al.*, 2002), vasodilatação (Marín & Rodriguez-Martinez, 1995) e modular contração de diferentes agonistas (Srivastava *et al.*, 2002). O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  além de reduzir os efeitos benéficos do NO, pode agir como vasoconstritor e pode causar também dano direto pelo  $\text{ONNO}^-$  (McIntyre *et al.*, 1999; Dhalla *et al.*, 2000).

A superóxido dismutase (SOD) cataliza a dismutação de duas moléculas de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é hidrolizado pela catalase ou glutatona peroxidase e pode também ser precursor de outros radicais como  $\text{OH}^\cdot$ .

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atuar tanto como vasoconstritor como vasodilatador, como observado em artérias mesentéricas (Gil-Longo & Gonzáles-Vazquez, 2005).

O íon  $\text{OH}^-$  é a espécie mais reativa e é formado a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela presença de  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{+2}$  e tem tanto poder vasodilatador quanto vasoconstritor mediado pela PKC e guanilato ciclase solúvel respectivamente (Marín & Rodríguez-Martínez, 1995).

E por fim, quando os níveis de NO aumentam a níveis nanomolares, há uma competição com a SOD pelo  $\text{O}_2^{\bullet-}$  favorecendo a formação de  $\text{ONOO}^-$ , que promove peroxidação lipídica (Stoclet *et al.*, 1999).

Todos estes fatores descritos podem de alguma maneira, se fora da situação de equilíbrio, promover dano/disfunção endotelial. Este se caracteriza pela redução do relaxamento dependente do endotélio decorrente de menor liberação e/ou biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras como NO ou por um aumento de substâncias vasoconstritoras como angiotensina e ânion superóxido. Este desequilíbrio, presente nas diversas doenças vasculares, pode ter como fator desencadeante agressões vasculares advindas da intoxicação por metais como o mercúrio, por exemplo. Além disso, a agressão continuada ao longo do tempo favorece o desenvolvimento das agressões vasculares. Cabe aqui ressaltar que o mercúrio tem sido descrito como um desses agentes, agindo tanto em condições de exposição aguda como de exposição crônica. Entretanto, estudos com exposição crônica a pequenas quantidades do mercúrio, com doses controladas, ainda são muito poucos, razão pela qual desenvolvemos este estudo para investigar a ação deste metal na reatividade vascular de artérias de resistência.



## ***OBJETIVOS***

## II OBJETIVOS

### *2.1 Objetivo geral*

Avaliar os possíveis efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre a reatividade vascular e as propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos. Para tal, foi desenvolvido um modelo experimental de exposição crônica a  $\text{HgCl}_2$  com o propósito de manter baixas concentrações sanguíneas de mercúrio, semelhantes àquelas encontradas em humanos expostos cronicamente a este metal.

### *2.2 Objetivos específicos*

- Avaliar o efeito do tratamento crônico, por 30 dias, com  $\text{HgCl}_2$  sobre a pressão arterial sistólica e massa corporal;
- Investigar possíveis alterações nas propriedades estruturais e mecânicas de artérias mesentéricas de resistência de rato após o tratamento crônico com  $\text{HgCl}_2$ ;
- Verificar se o tratamento com  $\text{HgCl}_2$  modifica as respostas vasoconstritoras de artérias mesentéricas de resistência e de artérias cerebrais;
- Averiguar se a exposição crônica ao  $\text{HgCl}_2$  altera a participação do endotélio na resposta vascular à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência, bem como estudar possíveis fatores endoteliais envolvidos. Especificamente, avaliaremos a participação do óxido nítrico, de prostanoídes, de canais de potássio, do sistema renina-angiotensina e do estresse oxidativo nas respostas vasoconstritoras induzidas por fenilefrina;
- Avaliar se a exposição crônica ao  $\text{HgCl}_2$  altera o papel do NO e do estresse oxidativo na resposta a serotonina em artérias cerebrais;
- Analisar se a exposição crônica ao  $\text{HgCl}_2$  afeta o relaxamento dependente e independente do endotélio assim como a participação do estresse oxidativo neste relaxamento em artérias mesentéricas de resistência.
- Avaliar se o tratamento crônico com  $\text{HgCl}_2$  altera a expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e das isoformas CuZn, Mn e EC da SOD nas artérias cerebrais e mesentéricas de resistência.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### **III MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais experimentais**

Neste estudo, foram utilizados ratos normotensos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos com idade aproximada de 90 dias ao final do tratamento, pesando entre 300 e 400g. Esses foram fornecidos pelo biotério da *Facultad de Medicina da Universidad Autónoma de Madrid*, Espanha. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. A investigação foi feita em conformidade com a “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicada pela “*US National Institutes of Health*” (NIH Publications No. 85-23, revisada em 1996) e pelas leis espanholas e europeias de experimentação animal (RD 233/88 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación e 609/86).

#### **3.2 Tratamento Crônico com HgCl<sub>2</sub> – modelo experimental**

Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais: Controle e Mercúrio (HgCl<sub>2</sub>). Os ratos do grupo Controle receberam injeções intramusculares (*i.m*) de solução salina, NaCl - 0,9% por 30 dias. No grupo HgCl<sub>2</sub>, os ratos receberam, pelo mesmo período, injeções *i.m* de cloreto de mercúrio com a finalidade de obter uma concentração plasmática final de cerca de 20nM sendo a primeira dose de 4.4 µg/kg e as doses subsequentes de 0.07 µg/kg/dia.

Estas doses foram determinadas baseadas em cálculo teórico, onde: dose = volume de distribuição x concentração plasmática ( $d = Vd \times Cp$ ). Consideramos que o mercúrio distribuiria-se igualmente no organismo, e, o volume de distribuição equivaleu à quantidade total de água corporal, ou seja, 80% do volume de sanguíneo total. Assim foi calculada a primeira dose, suficiente para, teoricamente, atingir 20nM de mercúrio no sangue. Para a manutenção desta concentração, as doses subsequentes foram calculadas baseando-se na meia-vida de 37 dias do HgCl<sub>2</sub> (Azevedo, 2003). Para tal, calculou-se a eliminação diária e ajustaram-se as doses correspondentes a esta eliminação a fim de manter 20nM de concentração sanguínea. As doses foram ajustadas ao peso do rato semanalmente. Segue cálculos utilizados:

$$d = Vd \times Cp$$

Peso aproximado do rato = 300 g (80% de água)

Vd = 240 ml considerando que o mercúrio distribui-se igualmente pelo organismo a concentração plasmática desejada em ng/ml foi calculada conhecendo-se o PM do HgCl<sub>2</sub>:

$$PM = 271,5g - 1L - 1M$$

$$271,5mg - 1ml - 1M$$

$$0,000000271mg - 1 ml - 1nM$$

$$x \quad \quad \quad - \quad \quad - 20nM$$

$$x = 5,43ng/ml$$

Logo:

$$5,43ng - 1ml$$

$$\text{dose a administrar} = 240ml \times 5,43ng/ml$$

dose = 1303,2 ng (massa para injetar para obter 20nM em 240 ml de volume) - 1ª DOSE

$$\text{dose/kg} = 4,4 \text{ mg/Kg}$$

Supondo que na primeira injeção temos 20nM no rato e a meia-vida do HgCl<sub>2</sub> é de 37 dias. Em 37 dias se elimina a metade da dose (1303,2 ng), ou seja, 651,6ng

$$37 \text{ dias} - 651,6 \text{ ng}$$

$$1 \text{ dia} \quad - \quad x$$

$$x = 17,61 \text{ ng massa das doses subsequentes}$$

Todos os dias subsequentes foi injetado somente o que se eliminaria. As doses foram ajustadas ao peso do animal.

Ex: 0,1 ml para 300 g

$$X \text{ ----- } 400 \text{ g}$$

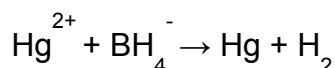
$$X = 0,13 \text{ ml (quantidade a ser injetada em um rato de 400 g)}$$

### 3.2.1 Determinação da concentração de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) no sangue

Com o intuito de verificar a eficácia do tratamento com HgCl<sub>2</sub> por 30 dias foi quantificada a concentração sanguínea deste metal por espectrofotometria de fluorescência atômica a frio. Os ratos foram anestesiados com isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil éter – Medical Supplies & Service Int Ltd – MSS - Baxter) por via inalatória. Uma incisão cirúrgica abdominal foi realizada e a artéria aorta abdominal exposta para punção direta de cerca de 10ml de sangue. As amostras coletadas foram colocadas em tubo de ensaio pré-tratados com EDTA e mantidas a 4°C.

As análises foram realizadas pelo *Centro de Espectrometria Atômica da Facultad de Ciencias Geológicas da Universidad Complutense de Madrid* pela técnica de Espectrometria de Fluorescência Atômica (PSA Analytical, Model 1025 Millenium System).

A técnica de vapor frio é a técnica de escolha para quantificar o mercúrio, pois é o único elemento que a temperatura ambiente tem suficiente tensão de vapor para formar vapor atômico. As amostras foram tratadas previamente com diluição ácida até que o mercúrio atingisse a forma iônica, posteriormente adicionou-se um agente redutor para reduzir os ions Hg<sup>2+</sup> a Hg metálico.



O vapor de mercúrio formado foi arrastado por um gás inerte até uma célula de medida e com a ajuda de uma corrente de ar se determinou o conteúdo de mercúrio a 253,7 nm. Esta técnica é muito sensível e elimina muitas interferências, podendo detectar até 1 ppb de mercúrio. A determinação quantitativa realizou-se por comparação com uma amostra com concentrações conhecidas mediante a uma reta de calibração (Clin Cal<sup>®</sup> Calibrator - Whole Blood Calibrator, Labortechnik, Munich, Germany) em que se representam as absorvâncias em relação às concentrações (Ximénez Herraiz, 1980).

A acurácia da análise foi comprovada por um material de referência externo (Clin Check<sup>®</sup> Control - Whole Blood Control Lyophilized Level I, Labortechnik, Munich, Germany) que considerou aceitável o valor teórico de 3,8 ng/ml e valor experimental de 3.85 ng/ml. Todas as amostras foram analisadas por duplicata.

### **3.3 Medida da pressão arterial e peso corporal**

Com o intuito de avaliar a evolução dos níveis pressóricos nos diferentes grupos experimentais, os valores de pressão arterial foram verificados, semanalmente, durante o decorrer do tratamento. A pressão arterial sistólica foi determinada, de maneira indireta, por pletismografia de cauda (Letica, Digital Pressure Meter, LE 5000, Barcelona, Espanha) (Buñag, 1973). Para evitar erros de medida e análise os ratos foram submetidos a um período de uma semana de ambientação a técnica, respeitando-se o período de aquecimento em estufa e número de medidas.

Ainda foi investigado se o tratamento com  $\text{HgCl}_2$  afetava o ganho ponderal normal durante o tratamento, para tal o peso dos ratos foi medido semanalmente.

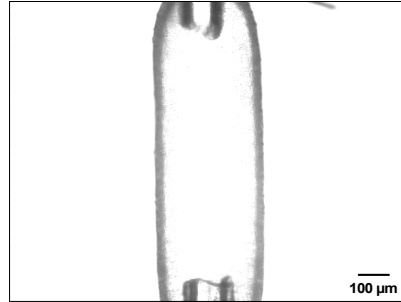
### **3.4 Estudo das propriedades mecânicas e estruturais de artérias mesentéricas de resistência**

Para realizar a análise das propriedades mecânicas e estruturais o leito mesentérico foi removido, acondicionado em solução de Krebs Henseleit a 4° C e o terceiro ramo da artéria mesentérica foi dissecado e limpo de tecido de adiposo para posterior montagem em miógrafo de pressão.

#### **3.4.1 Miógrafo de pressão**

A técnica de artérias pressurizadas, de acordo com o método descrito inicialmente por Halpern *et al.*, (1978) foi utilizada e para isso, segmentos de aproximadamente 2 mm do terceiro ramo da artéria mesentérica superior foram montados em um miógrafo de pressão (Danish Myo Tech, Modelo P100, J.P. Trading I/S, Aarhus, Dinamarca). As extremidades das artérias foram canuladas com micropipetas de vidro e fixadas com fio de sutura de nylon. Em seguida o comprimento da artéria foi ajustado aumentando a pressão intraluminal até aproximadamente 140 mmHg, até que as paredes arteriais estivessem paralelas e sem estiramento (Figura IV). Com esse procedimento foi possível verificar se a artéria estava adequadamente pressurizada. A pressão foi ajustada a 70 mm Hg e seguiu um período de estabilização de 60 minutos, em solução de Krebs-

Henseleit na ausência de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) gaseificada com mistura carbogênica e mantida a temperatura de  $37^\circ \text{C}$ . A solução de Krebs-Henseleit sem  $\text{Ca}^{2+}$  foi preparada omitindo o  $\text{CaCl}_2$  e adicionando EGTA 10 mM.



**Figura I:** Foto representativa de uma artéria mesentérica de resistência (Terceiro ramo da artéria mesentérica superior) pressurizada a 70 mmHg. Aumento 40x. (Xavier *et al.*, 2006).

Após o período de estabilização, a pressão intraluminal foi reduzida a 3 mmHg; uma curva de pressão foi realizada aumentando a pressão intraluminal de 3 a 140 mmHg, em aumentos de 20 mmHg e intervalos de 3 minutos. Para cada valor de pressão intraluminal, ao final dos 3 minutos, o diâmetro interno ( $D_i$ ) e externo ( $D_e$ ) foram medidos.

### **3.4.2 Cálculos das propriedades mecânicas e estruturais das artérias mesentéricas de resistência**

As medidas de diâmetro interno e externo ( $D_i$  e  $D_e$ ) utilizadas para o cálculo dos parâmetros estruturais e mecânicos arteriais foram realizadas em condições passivas (em solução de Krebs sem cálcio,  $0_{\text{Ca}}$ ). Os seguintes parâmetros estruturais e mecânicos foram calculados a partir destas medidas:

1. Espessura da Parede (EP)

$$EP = \frac{(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})}{2}$$



## 2. Área de Secção Transversal (AST)

$$AST = \frac{\pi}{4} \times (D_{e0Ca}^2 - D_{i0Ca}^2)$$

## 3. Relação Parede/ Lúmen (P/ L)

$$P/L = \frac{(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})}{(2 \times D_{i0Ca})}$$

As propriedades mecânicas das artérias foram calculadas de acordo o método inicialmente descrito por Baumbach & Heistad (1989).

## 4. Distensibilidade arterial

$$\frac{(\Delta D_{i0Ca})}{(\Delta D_{i0Ca} \times \Delta P)} \times 100$$

A distensibilidade representa a porcentagem de mudança do diâmetro arterial interno para cada valor de pressão intraluminar.

5. *Strain* ( $\varepsilon$ ). Representa a variação nas dimensões de um corpo (deformação,  $\varepsilon$ ) em consequência de uma dada tensão aplicada.

$$\varepsilon = \frac{(D_{i0Ca} - D_{00Ca})}{D_{00Ca}}$$

Onde:  $D_{00Ca}$  é o diâmetro a 3 mm Hg e  $D_{i0Ca}$  é o diâmetro interno observado para um dado valor de pressão intraluminar sob condições de completo relaxamento. O valor de  $D_{00Ca}$  foi medido a 3 mm Hg porque é difícil determinar o diâmetro interno a valores inferiores de pressão intraluminar.

6. *Stress* de parede ( $\sigma$ ) – Tensão (medida por unidade de área) produzida na parede arterial frente a alterações da pressão intraluminal, do diâmetro interno e da espessura da parede.

$$\sigma = \frac{(P \times D_{i0Ca})}{(2EP)}$$

Onde: P é a pressão intraluminal (1 mm Hg = 133,4 N/ m<sup>2</sup>) e EP é a espessura da parede arterial para cada valor de pressão intraluminal em solução de Krebs sem Ca<sup>2+</sup>.

A rigidez arterial independente da geometria é determinada pelo módulo elástico de Young o qual pode ser expresso pela relação entre tensão e deformação ( $E = \text{Stress} / \text{Strain}$ ). No caso de vasos sanguíneos esta relação *stress-strain* exibe um comportamento curvilíneo. Assim, torna-se mais apropriado o cálculo da relação tangencial ou módulo elástico incremental ( $E_{Inc}$ ), o qual pode ser determinado pela inclinação ( $\beta$ ) da curva *stress-strain* (Dobrin, 1978).

$$E_{Inc} = \frac{\delta\sigma}{\delta\varepsilon}$$

O  $E_{Inc}$  foi calculado plotando os dados obtidos de *stress* e de *strain* para cada experimento utilizando a equação exponencial abaixo (SigmaPlot, SPSS Inc):

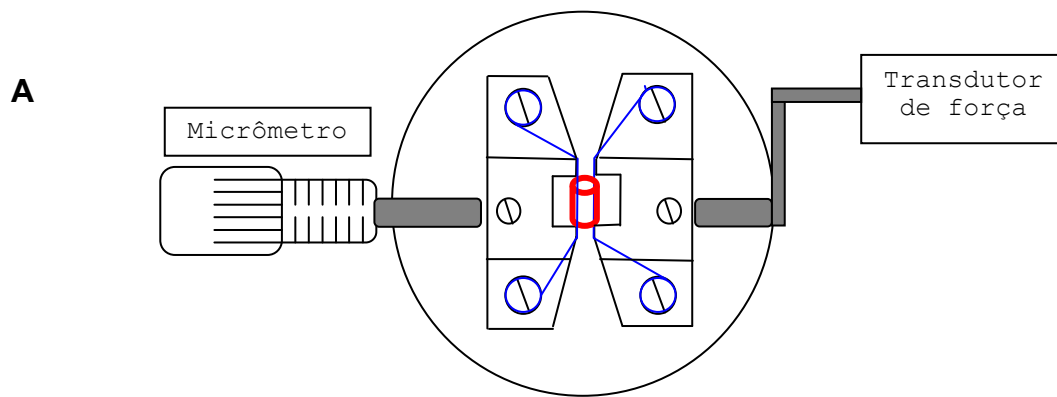
$$\sigma = \sigma_{orig} e^{\beta\varepsilon}$$

Onde:  $\sigma_{orig}$  representa o *stress* de parede para o valor inicial de diâmetro (diâmetro a 3 mmHg). De acordo com a derivação das equações acima é possível obter-se que  $E_{Inc} = \beta\sigma$ . Para um dado valor de  $\sigma$ ,  $E_{Inc}$  é diretamente proporcional a  $\beta$ . Um aumento de  $\beta$  implica um aumento de  $E_{Inc}$ , o qual representa um aumento da rigidez.

### **3.5 Estudo da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência**

Para estudar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência, foi utilizado o método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Para isso, o leito

mesentérico foi removido, posto em uma placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4° C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11). A partir da localização da artéria mesentérica superior foram identificados os terceiros ramos que foram limpos de seu tecido adiposo e cortados em segmentos de 1,5 - 2,0 mm de comprimento com o auxílio de um microscópio de dissecação e mantidos em Krebs a 4° C. Após preencher as câmaras do miógrafo para vasos resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) com Krebs aerado as artérias eram montadas entre dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) inseridos em seu lúmen para estudos de tensão isométrica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permitia o estiramento das artérias (Figura I). Esse miógrafo estava conectado um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e este a um computador (Macintosh).



**B**



**Figura II:** (A) Desenho esquemático da preparação de vasos de resistência isolados, desenvolvido por Mulvany & Halpern (1977). A figura mostra duas placas de aço, entre as quais um segmento de até 2 mm de comprimento pode ser montado. Uma das placas está conectada a um transdutor de força de alta sensibilidade e a segunda está conectada a um micrômetro. Os fios de tungstênio, representados em azul, possuem 40 $\mu$ m cada (Adaptado de Mulvany M.J. 1993). (B) Foto da câmara do miógrafo (Danish Myo Tech, Modelo 410A, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca).

As artérias após serem montadas nas câmaras, permaneciam por 30 minutos em período de estabilização, submersas em solução de Krebs-Henseleit gaseificada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, pH 7,4) e mantidas à temperatura de 37° C.

A partir de então as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão: diâmetro interno foi calculado e a

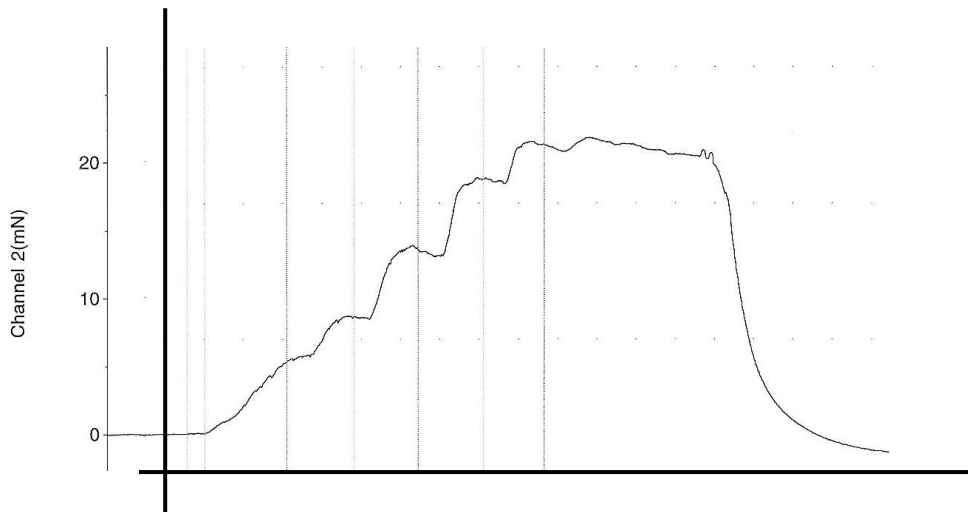
circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mm Hg para um vaso relaxado *in situ* ( $L_{100}$ ) foi determinada (Mulvany & Halpern, 1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna  $L_1$ , calculado como  $L_1 = 0,90 \times L_{100}$ , circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo (Mulvany & Halpern, 1977).

### ***Protocolos experimentais***

Depois do processo de normalização, as artérias foram submetidas a um período de estabilização de 30 minutos e em seguida, contraídas com cloreto de potássio (KCl, 120 mM) para avaliar sua integridade funcional. Após o retorno a tensão basal os protocolos foram realizados. Em seguida, as artérias foram pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu$ M), até aproximadamente 50 % da contração máxima produzida por 120 mM de KCl, e uma única dose de Ach (10  $\mu$ M) foi administrada a fim de comprovar a integridade do endotélio, que foi considerada aceitável quando o relaxamento à Ach foi maior que 70%.

#### ***3.5.1 Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência***

Após novo período de estabilização de uma hora, a curva concentração-resposta à fenilefrina (10 nM - 30  $\mu$ M) foi realizada. Com objetivo de investigar os prováveis mecanismos envolvidos nas alterações da contração a fenilefrina induzidas pelo tratamento com mercúrio, as artérias foram pré-incubadas com fármacos durante 30 minutos (Figura II).



**Figura II:** Registro ilustrativo de uma curva concentração-resposta a fenilefrina.

### **3.5.2 Influência do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta vasoconstritora à fenilefrina, em alguns experimentos, o endotélio foi removido de acordo com a metodologia descrita por Osol *et al.* (1989). Para isso, um fio de cabelo humano era lavado com etanol e em solução de Krebs. Antes do processo de normalização da tensão de repouso de cada segmento arterial, o fio de cabelo era inserido no lúmen das artérias e movimentos de fricção contra a parede arterial eram realizados. Após período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, 120 mM de KCl eram administrados às preparações com a finalidade de avaliar a viabilidade arterial e analisar uma possível lesão muscular após a remoção mecânica do endotélio.

Após 30 min da contração ao KCl, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (em uma concentração capaz de induzir aproximadamente 50 % da contração máxima ao KCl 120 mM) e a ausência do endotélio foi comprovada pela incapacidade da acetilcolina (10  $\mu$ M) induzir relaxamento. Após a confirmação da ausência do endotélio, as preparações eram lavadas e 60 minutos após o retorno à tensão basal, curvas concentração-resposta à fenilefrina (10 nM - 30  $\mu$ M) foram realizadas.

### ***3.5.3 Influência do óxido nítrico, dos prostanóides, dos canais para o potássio, do sistema renina angiotensina e das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina e sua possível alteração com o tratamento com HgCl<sub>2</sub>***

O efeito do óxido nítrico sobre a contração induzida por fenilefrina foi avaliado através da utilização de L-NAME (100 µM), inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico.

Para avaliar o efeito do tratamento com HgCl<sub>2</sub> sobre a participação da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina, artérias mesentéricas de resistência foram incubadas com o inibidor inespecífico da COX, indometacina (10 µM), assim como um bloqueador da sintase da prostacilina a tranilcipromina (TCP – 10 mM).

Ainda, para avaliar a influência dos canais para o potássio sensíveis ao cálcio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina as artérias foram incubadas com tetraetilamônio (TEA, 2 mM), um bloqueador de canais para o potássio ativados por cálcio.

Para avaliar a influência da angiotensina II sobre a resposta contrátil a fenilefrina em ratos tratados com HgCl<sub>2</sub>, foi realizada curva concentração-resposta a fenilefrina antes e após incubação por 30 minutos com captopril (0,1 mM), um inibidor da enzima conversora de angiotensina ou com losartan (10 mM), um antagonista do receptor AT<sub>1</sub>.

Para avaliar se a exposição ao HgCl<sub>2</sub> interfere na participação das espécies reativas do oxigênio sobre a resposta contrátil a fenilefrina, artérias mesentéricas de resistência foram incubadas com SOD (superóxido dismutase - 150 U/ml, um “varredor” de ânion superóxido), catalase (1000 U/ml, um “varredor” de peróxido de hidrogênio), tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-terametilpiperidina-1-oxil - 10 µM, um mimético da superóxido dismutase), tiron (ácido disulfônico 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno - 1mM, um “varredor” de ânion superóxido) ou a associação de L-NAME+SOD e TEA+SOD. Curvas concentração-resposta à fenilefrina foram realizadas após 30 minutos de incubação.

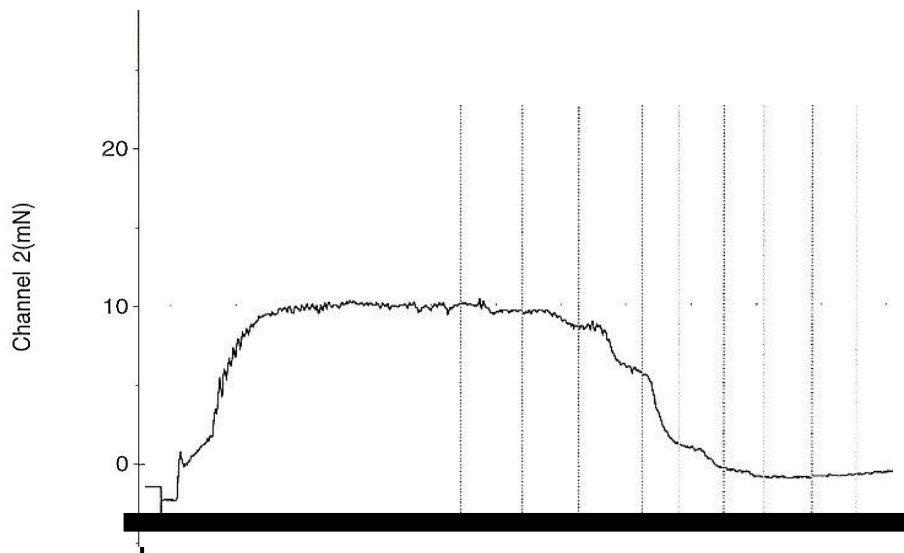
Ainda, para verificar se o tratamento com HgCl<sub>2</sub> afetava a participação dos derivados vasoativos liberados pelo tecido (gordura) perivascular sobre a

contração a fenilefrina, artérias mesentéricas de resistência foram submetidas à curva concentração-resposta a na presença do tecido perivascular em ratos do grupo Controle e HgCl<sub>2</sub>.

#### **3.5.4 Avaliação da resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio**

Em um grupo adicional de experimentos, as artérias foram pré-contraídas com fenilefrina (1 µM), até aproximadamente 50 % da contração máxima produzida por 120 mM de KCl em seguida a curva concentração-resposta à acetilcolina (0,01 nM - 30 µM) foi realizada precedida ou não pela incubação por 30 minutos com os fármacos (Figura III).

Para avaliar a resposta do relaxamento independente do endotélio as artérias foram pré-contraídas com fenilefrina (1 µM), e submetidas à curva de relaxamento ao DEA-NO (10 nM – 0.1 mM), um doador de oxido nítrico.



**Figura III:** Registro ilustrativo de uma curva concentração-resposta a acetilcolina.

#### **3.5.5 Efeito das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta do relaxamento dependente do endotélio**

Para investigar se o tratamento com mercurio alterava o relaxamento induzido por acetilcolina através da produção de espécies reativas de oxigênio as artérias



foram submetidas à curva concentração resposta a acetilcolina antes e após incubação por 30 minutos com apocinina (0,3 mM, um inibidor da NADPH oxidase), SOD (150 U/ml) ou catalase (1000 U/ml).

### **3.6 Estudo da reatividade vascular em artérias basilares**

Estudo similar foi realizado com artérias basilares. Após o sacrifício, o cérebro dos animais eram cuidadosamente retirado e colocado em solução de Krebs a 4°C. A artéria basilar era dissecada, dividida em segmentos de 2 mm de comprimento e montada em miógrafo de acordo com a técnica e protocolo inicial descrito anteriormente para artérias mesentéricas (Mulvany & Halpern, 1977). Inicialmente a viabilidade as artérias foi avaliada com KCl (120mM). Após lavadas e período de estabilização foram pré-contraídas com 5-HT (1µM) a presença do endotélio foi comprovada mediante sua capacidade de relaxar a bradicinina (BK 10<sup>-5</sup>M). Em seguida, após nova estabilização, foram realizadas curvas concentração-resposta a doses crescentes de serotonina (5-HT) (10nM a 30µM) em artérias de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>, na presença ou não do inibidor da NO-sintase – L-NAME (100 µM) e SOD (150 U/ml) incubados por 30 minutos.

### **3.7 Estudo da expressão de proteínas pelo método de Western Blot**

#### **3.7.1 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e isoformas CuZn (cobre-zinco), Mn (manganês) e EC (extracelular) da superóxido dismutase (SOD)**

A expressão da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e das três isoformas da superóxido dusmutase, CuZn-SOD, Mn-SOD e EC-SOD foram determinadas através da técnica de *Western Blot*. Para isso, as artérias mesentéricas e cerebrais foram homogeneizadas em solução tampão composta de: Tris (10 mM, pH=7,4), Lauril sulfato de sódio (SDS, 1%) e Metavanadato de sódio (1 mM). Os homogeneizados foram centrifugados a 500g por 10 minutos e a concentração de proteína foi medida no sobrenadante pelo método de Bradford (1976).

### **3.7.1.1 Eletroforese e transferência das amostras**

Alíquotas do homogeneizado, 20 µg de proteína para eNOS em mesentéricas e basilares, 5 µg para CuZn-SOD para mesentéricas e 20 µg para basilares, 5 µg para Mn-SOD e 50 µg para EC-SOD para ambas artérias, foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 µM; Tris-HCl pH=8 0,01 M e Azul de bromofenol 0,5 %), mantidas à temperatura de 99° C durante 5 minutos e, em seguida, aplicada no gel com SDS a 3% (Lauril Sulfato Sódico-poliacrilamida - SDS-PAGE). As amostras foram submetidas a uma eletroforese com 7,5 % SDS-PAGE em um sistema Mini-Protean II (BioRad) durante 2 horas, aplicando uma corrente constante de 80 V (Power Pac 200, BioRad). Em um mesmo gel foram aplicadas amostras de células endoteliais como controle positivo para a eNOS (Transduction Laboratories, KY) e homogeneizado de tecido cerebral para controle positivo da CuZn-SOD e Mn-SOD e homogeneizado de tecido pulmonar para EC-SOD.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF, Transfer Membrane, Hybond P, Amersham Life Science), previamente ativada com metanol. Para a transferência, o gel, a membrana e papel Whatman foram colocados em um sistema de sanduíche e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Módulo de Transferência, BioRad) contendo a solução de transferência (Tris 25 mM; Glicina 190 mM; SDS 0,05 % e Metanol 20 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA durante 18 horas.

### **3.7.1.2 Incubação com os anticorpos e detecção das subunidades**

As membranas foram incubadas durante 60 minutos, à temperatura ambiente, com uma solução bloqueante (leite desnatado 5 %, soroalbumina bovina 5 %, Tris- 25 mM, NaCl 137 mM e Tween 20 0,2 %) para evitar a união não específica com reativos não imunológicos. Em seguida estas mesmas membranas foram incubadas durante 90 min, sob agitação com solução bloqueante contendo o anticorpo primário monoclonal de camundongo para a eNOS (Transduction Laboratories, KY) com diluição de 1:1000; e policlonal de coelho para CuZn-SOD (0,1 µg/ml – StressGen); para Mn-SOD (0,05 µg/ml – StressGen); e para EC-SOD (10 µg/ml – StressGen). Após este procedimento, as membranas foram lavadas

com solução de TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 0,1 %) por 30 minutos, sob agitação. Posteriormente, foram incubadas por 90 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação, com anticorpo secundário (Transduction Laboratories, UK), Imunoglobulina IgG Anti-camundongo unida a peroxidase de coelho para a eNOS em solução bloqueante (1:5000; Transduction Laboratories) e IgG Anti-coelho para as isoformas da SOD (1:2000; Transduction Laboratories). Este mesmo processo foi utilizado para determinar a expressão da  $\alpha$ -actina (anticorpo monoclonal de rato anti- $\alpha$ -actina, 1:300000, Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA) que foi utilizado como fator de correção das expressões protéicas investigadas. A proteína correspondente a eNOS e as isoformas de SOD foram detectadas por uma reação de quimiluminescência, utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Life Science) incubando as membranas por 5 minutos. As membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham Life Science), e as bandas impregnadas posteriormente reveladas. As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica. Para tal, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram gravados por um scanner conectado a um computador. Para análise das bandas, foi utilizado o programa FotoLook 2.05 e a quantificação da área e da densidade das bandas foi feita através de um programa de análise de imagens (NIH Image 1.61).

### **3.8 Expressão de RNAm por PCR em tempo real (RT-PCR)**

A quantificação de RNAm de COX-2 e NOX-1 foi realizada em artérias de resistência do leito vascular mesentérico extraídos de ratos controle e tratados por 30 dias com HgCl<sub>2</sub>.

As artérias foram homogeneizadas com trizol (Invitrogen Life Technologies, Philadelphia, PA, USA), um “buffer” específico de isolamento de RNAm. As amostras foram centrifugadas a 12000 g durante 10 min a 4°C e se recolheu o sobrenadante ao qual se adicionou clorofórmio. A mistura foi novamente centrifugada a 12000 g durante 15 min a 4°C. Recolheu-se a fase aquosa e foi adicionado isopropanol para precipitar o RNAm. Depois de incubar a mistura em temperatura ambiente durante 20 minutos foi realizada nova centrifugação por 30 min a 4°C. O precipitado desta centrifugação foi lavado com etanol 75% e mantido

em água bidestilada-0,1% dietilpirocarbonato (água DEPC) que inativa ribonucleases. A quantificação do RNA total foi calculada medindo-se a absorvância a 260nm. Na seqüência, 1µg do RNA total tratado com DNAase I foi transcrito a cDNA utilizando-se um kit comercial (High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo foi realizado segundo as instruções comerciais em 20 µL de volume de reação. Esta mistura foi processada em um termociclador durante 10 minutos a 25°C e duas horas a 37°C. Os cDNA obtidos se mantiveram a -20°C. 10 ng de cDNA foram adicionados a mistura de reação de RT-PCR (Taqman Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Foram utilizados *primers* para amplificar o gen da COX-2 (Rn00568225\_m1, Applied Biosystems), NOX-1 (Rn00586652\_m1) e *primers* para amplificar o gene da β2 microglobulina (Rn00560865\_m1, Applied Biosystems) como controle interno de cada amostra. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um sistema de detecção de seqüência ABI prism 7700 (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 minutos durante 40 ciclos e 60°C por 1 minuto. As amostras foram feitas em duplicata.

### **3.9 Detecção vascular *in situ* da produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em microscopia confocal**

A produção *in situ* de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) foi avaliada pela fluorescência por dihidroetídio (DHE) como previamente descrito (Jiménez-Altayó *et al.*, 2006). A dihidroetídio na presença de  $O_2^{\cdot-}$  é oxidada em brometo de etídio que une-se ao DNA, emitindo fluorescência, indicando a presença de ânion superóxido. O brometo de etídio é excitado a 546 nm e possui um espectro de emissão de 610 nm. Artérias mesentéricas de terceiro ramo foram tratadas com sacarose 30% e congeladas em meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek - OCT (Bayer) a -70°C. Estas artérias congeladas foram cortadas em um criostato (CM 1900) com espessura de 14µm e os anéis formados colocados em lâmina de vidro gelatinada. As lâminas contendo os anéis foram incubados por 30 minutos a 37°C em solução Krebs-HEPES (em mM: NaCl 130, KCl 5.6, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 0.24, HEPES 8.3, glucose 11, pH 7.4) e após período de secagem, foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida, protegidos da luz, com DHE (2 µM) aplicado

diretamente sobre os anéis. Os anéis foram visualizados através de um microscópio confocal Leica TCS SP2 (objetiva de 40x) adaptado a um microscópio invertido e uma fonte de laser (Argon e Helio-Neon). As condições de análise foram às mesmas no grupo controle e tratado com HgCl<sub>2</sub>. A fluorescência foi detectada por um filtro de 568 nm. A média das densidades das fluorescências foi calculada a partir da quantificação da fluorescência emitida de quatro anéis de cada animal e situação experimental.

### **3.10 Medida de produção plasmática de malondialdeído (MDA)**

Os níveis plasmáticos de malondialdeído foram mensurados por ensaio modificado de ácido tiobarbitúrico (Rodríguez-Martínez & Ruiz-Torres, 1992). Após centrifugação do sangue a 1500xg por 15 minutos a temperatura de 4° C, o plasma foi retirado e misturado com ácido tricloroacético a 20% em 0.6 M HCl (1:1, v/v), os tubos contendo o plasma foram mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1500xg antes de adicionar o TBA (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após a mistura foi aquecida a 97° C por 30 minutos. Medida espectrofotométrica foi realizada a 535 nm e 20°C.

### **3.11 Medida do estado total antioxidante em plasma (TAS)**

O estado antioxidante total (*Total Antioxidant Status* - TAS) foi mensurado no plasma utilizando o Kit comercial - *Calbiochem total antioxidant status assay kit* (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Germany). Para isto, a absorvância inicial (A<sub>0</sub>) de 5µL de plasma foi lida a 600 nm e, em seguida foi adicionado 50µL substrato. Após três minutos, foi realizada nova leitura (A). Concomitantemente, amostra padrão (fornecidas pelo Kit) e branco (água bi-destilada) foram lidas da mesma forma. Determinou-se o  $\Delta A = A - A_0$  para as amostras, branco e padrão. Após estas leituras, o cálculo do estado total antioxidante foi realizado pela fórmula:

$$\text{Concentração Antioxidante (mM)} = \frac{[\text{padrão}] (\Delta A \text{ branco} - \Delta A \text{ amostra})}{(\Delta A \text{ branco} - \Delta A \text{ padrão})}$$

### **3.12 Expressão dos resultados e análise estatística**

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

A resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina foi normalizada em função da resposta máxima de contração induzida por 120 mM de KCl, que foi considerada como 100% da resposta contrátil do músculo. A partir deste valor, as respostas contráteis à fenilefrina foram normalizadas. Os resultados das respostas de relaxamento induzido pela acetilcolina estão expressos como porcentagem de relaxamento. Para cada curva concentração-resposta a acetilcolina e fenilefrina foram calculados os valores de  $pD_2$  ( $\log EC_{50}$ ) e resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ). Para isso, foi realizada uma análise de regressão não linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta a esses agonistas, utilizando o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A.).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos ou da remoção do endotélio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em artérias dos diferentes grupos estudados, alguns resultados estão expressos como diferença da área abaixo da curva (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina em situação controle (sem fármacos) e experimental (com inibidores ou em segmentos sem endotélio). A AUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC) da curva controle correspondente (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A.).

A expressão protéica de eNOS, CuZn-SOD, Mn-SOD e EC-SOD foram expressas pela relação entre a densidade óptica de cada proteína em relação a  $\alpha$ -actina.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t*, pareado e/ ou não pareado, e análise de variância (ANOVA), duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentava significância estatística o teste *post-hoc* de Bonferroni era realizado (GraphPad Prism

Software, San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $P < 0,05$ .

### **3.13 Fármacos e reagentes a utilizados**

- 2-Hidroxietilmercaptano ( $\beta$ -mercaptoetanol) (Sigma)
- 3', 3'', 5', 5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Azul de Bromofenol) (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido acético glacial (Probus)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo de camundongo anti-eNOS (Anti-eNOS) (Transduction Laboratories)
- Anti-imunoglobulina G de camundongo (Transduction Laboratories)
- Azul brilhante de Coomassie G (BioRad)
- Azul brilhante de Coomassie R (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Pancreac)
- Cloreto de cálcio (Pancreac)
- Cloreto de Mercúrio (Sigma)
- Cloreto de potássio (Pancreac)
- Cloreto de sódio (Pancreac)
- Controle positivo para eNOS (Células endoteliais) (Transduction Laboratories)
- DL-Ditiotreitol (DTT) (Sigma)
- Etanol absoluto (Probus)
- Éter sulfúrico (Pancreac)
- Fosfato de potássio (Pancreac)

- Fosfato de sódio (Merck)
- Gelatina
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Lauril sulfato sódico (SDS) (BioRad)
- Leite desnatado (Asturiana)
- l-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Metanol (Merck)
- Meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek OCT (Bayer)
- Meio de imersão *Fluoroguard, Glycerol: antifade* (Biorad)
- N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N, N'-Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (BioRad)
- N(W)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), dicloreto (Sigma)
- Paraformaldeído (Merck)
- Persulfato Amônico (APS) (Sigma)
- Picro Sirius F3B em solução saturada de ácido pícrico (Aldrich Chemical Company)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (BioRad)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL plus) (Amersham Life Science, Pharmacia biotech)
- Sacarose (Merck)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)
- Tempol - 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Sigma)
- Tetraetilamônio, cloridrato
- Tiron - ácido disulfônico 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno (Sigma)
- Tranilcipromina (TCP – Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (BioRad)



-Uréia (Sigma)

Todas as soluções concentradas ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  M) foram dissolvidas em água deionizada e mantidas no congelador a  $-20^{\circ}$  C. Somente a indometacina foi dissolvida em uma solução de bicarbonato de sódio 1,5 mM.

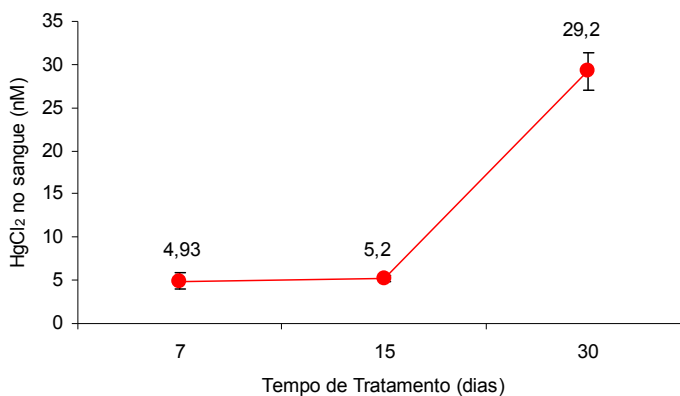
# ***RESULTADOS***

## IV RESULTADOS

### 4.1 Dados gerais

#### 4.1.1 Concentração plasmática de mercúrio alcançada com o tratamento crônico com $\text{HgCl}_2$

Inicialmente investigamos o modelo experimental de tratamento crônico, por 30 dias, com injeções intramusculares de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) foi capaz de atingir concentrações sanguíneas semelhantes às encontradas no sangue de indivíduos expostos a este metal. Por meio da análise espectrofotométrica foi detectada concentração sanguínea final de  $29,2 \pm 2,2$  nM ( $7,97 \pm 0,59$  ng/ml) de  $\text{HgCl}_2$  nos animais do grupo  $\text{HgCl}_2$ , concentração esta, próxima à encontrada em indivíduos expostos cronicamente ao mercúrio. Foram verificadas as concentrações de  $\text{HgCl}_2$  com 7, 15 e 30 dias do tratamento conforme apresentado em informe de análise sanguínea (nº. M-JL-07-58 – Centro de Espectrometria atômica - UCM) (Figura 1, Anexo 1).

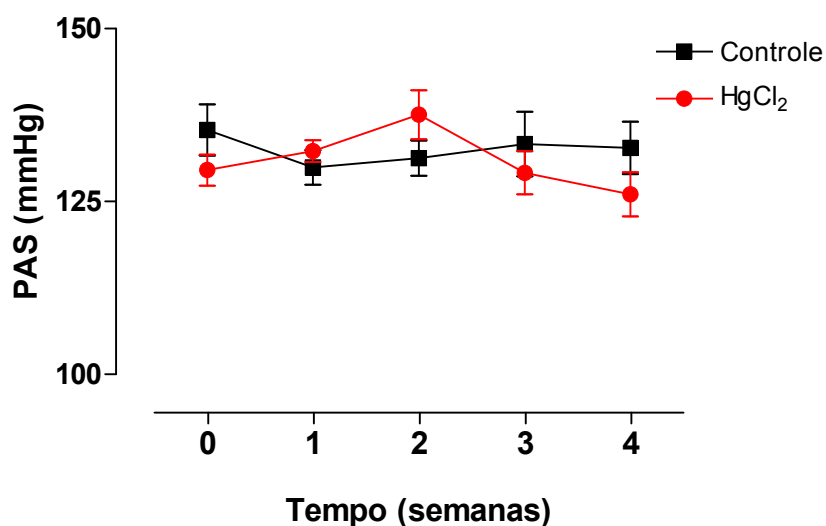


**Figura 1:** Evolução temporal dos valores (em nM) de mercúrio no sangue de ratos expostos ao  $\text{HgCl}_2$  nos momentos: 7, 15 e 30 dias de tratamento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.1.2 Valores de pressão arterial sistólica e massa corporal

O tratamento com  $\text{HgCl}_2$  não foi capaz de modificar a pressão arterial sistólica durante e ao final do tratamento (semana 0, 1, 2, 3 e 4) em relação aos animais do grupo controle (Figura 2).

Os valores de massa corporal inicial (Controle:  $353 \pm 7,7$  g vs  $\text{HgCl}_2$ :  $343 \pm 9$  g; teste  $t - P > 0,05$ ) e ao final (Controle:  $419 \pm 8$  g vs  $\text{HgCl}_2$ :  $395,6 \pm 11,7$  g; teste  $t - P > 0,05$ ) das quatro semanas de tratamento não diferiram entre os grupos experimentais estudados.

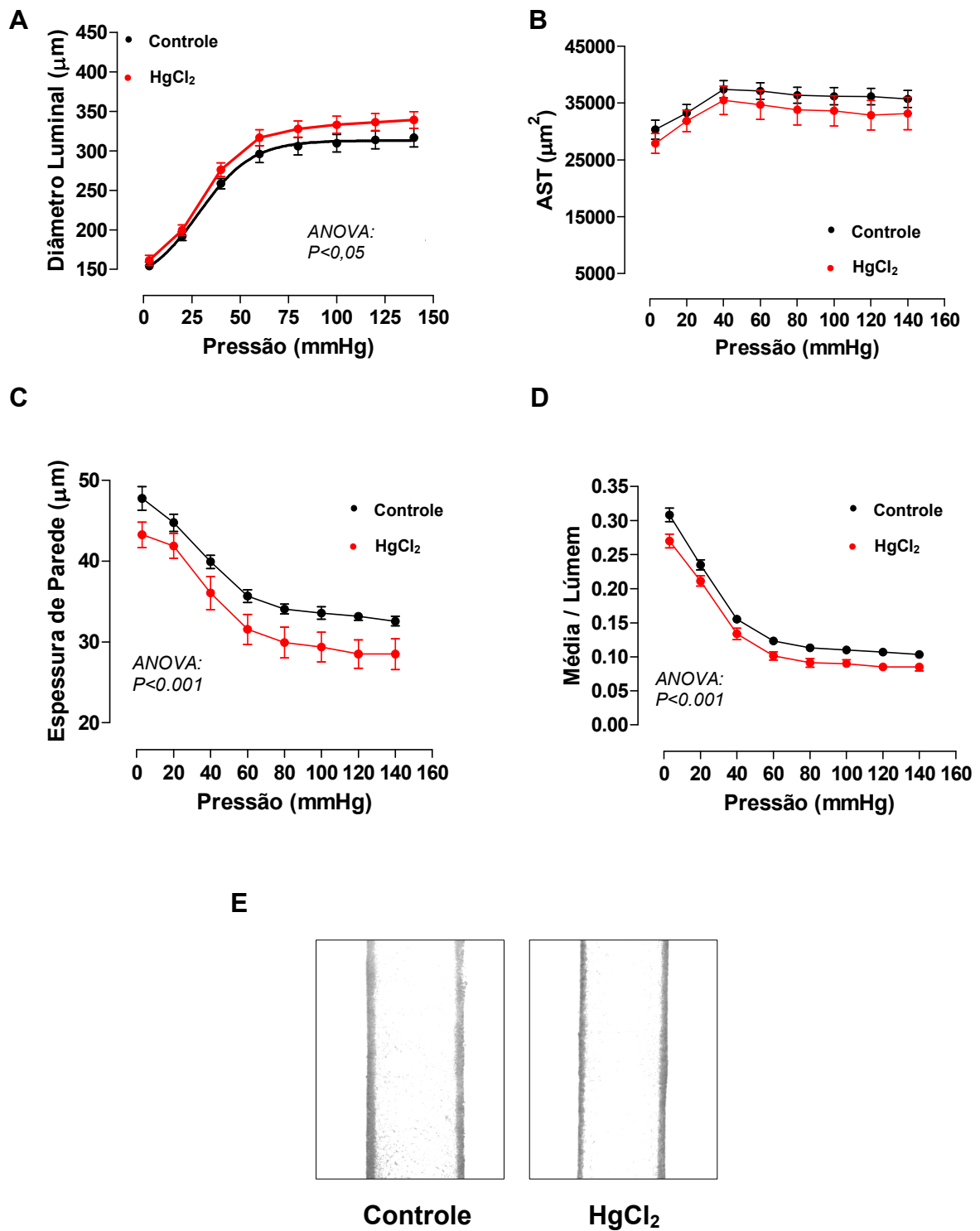


**Figura 2:** Evolução temporal dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) medidos através de pletismografia de cauda em ratos Controle ( $n = 9$ ) e tratados com  $\text{HgCl}_2$  ( $n = 9$ ) durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ANOVA:  $P > 0,05$ .

#### 4.2 Estudo das propriedades estruturais de artérias mesentéricas de resistência de rato

Para analisar os parâmetros morfológicos das artérias mesentéricas de resistência foram determinados vários parâmetros estruturais nas artérias de ratos Controle e  $\text{HgCl}_2$ . Como pode ser observado na Figura 3 o aumento da pressão intraluminal produziu um aumento no diâmetro externo (dados não mostrados) e interno e na área de secção transversa (AST) assim como uma diminuição da espessura da parede e da relação parede: lúmen das artérias mesentéricas de

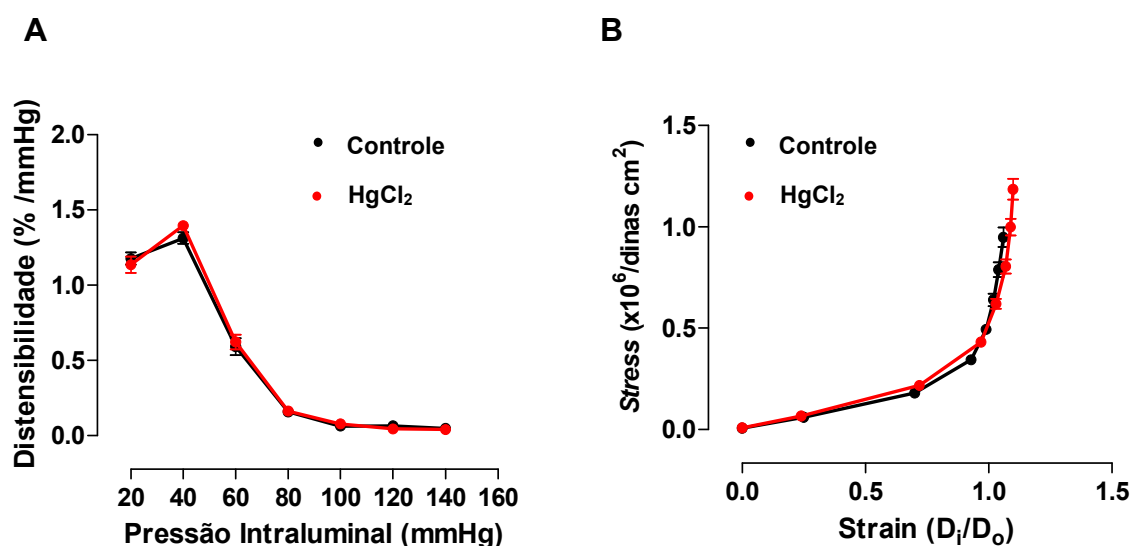
ambos grupos experimentais. O tratamento com mercúrio induziu um ligeiro aumento no diâmetro interno, não modificou a AST nem o diâmetro externo (dados não mostrados) e reduziu a espessura da parede das artérias mesentéricas. Consequentemente, o tratamento com mercúrio produziu uma redução significativa da relação média: lúmem (Figura 3).



**Figura 3.** Relação pressão-diâmetro luminal (A), área de secção transversa (B), espessura de parede (C) e relação média / lúmen (D) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle (n = 7) e HgCl<sub>2</sub> (n = 8) em condições passivas (0 Ca<sup>2+</sup>). Em E foto representativa de artéria mesentérica Controle e HgCl<sub>2</sub>. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos valores de diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) total e interno frente às alterações de pressão intravascular. ANOVA:  $P > 0,05$ .

#### 4.2.1 Propriedades mecânicas de artérias mesentéricas de resistência de rato avaliadas através de miógrafo de pressão

A Figura 4 mostra as propriedades mecânicas das artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub> em condições de máximo relaxamento (0 Ca<sup>2+</sup>). O tratamento com mercúrio não modificou as propriedades mecânicas das artérias de resistência posto que nem a distensibilidade nem a relação *stress-strain* ( $\beta$  – Controle: 4,47 ± 0,10 vs HgCl<sub>2</sub>: 4,43 ± 0,15) se modificaram com o tratamento (Figura 4 A e B). Estes resultados indicam que o tratamento com mercúrio induz alterações na estrutura das artérias de resistência, mas não modifica a rigidez vascular.



**Figura 4:** Distensibilidade arterial-pressão intraluminal (A) e relação *stress-strain* (B) em artérias mesentéricas de resistência pressurizadas de ratos Controle (n = 7) e HgCl<sub>2</sub> (n = 8). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.

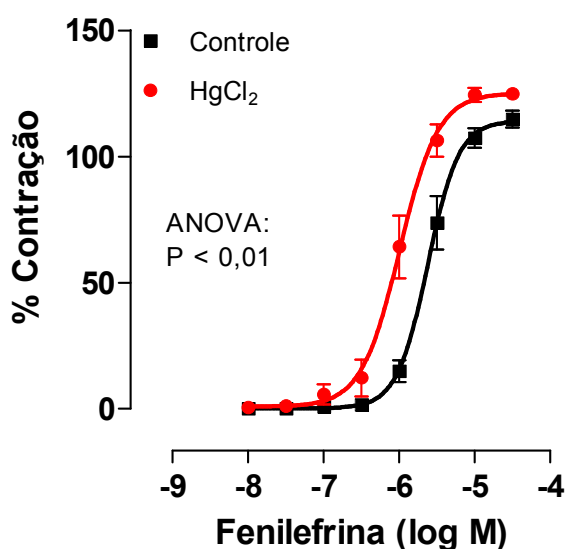
### 4.3 Experimentos com Artérias Mesentéricas de resistência

#### 4.3.1 Efeito do tratamento com mercúrio sobre a resposta vascular ao Cloreto de Potássio (KCl)

Os valores de contração induzida por 120 mM de KCl foram de similar magnitude nos segmentos arteriais nos grupos Controle ( $2,73 \pm 0,14$  mN/mm;  $n=51$ ) e  $HgCl_2$  ( $2,94 \pm 0,17$  mN/mm;  $n=33$ ) (teste  $t - P > 0,05$ ).

#### 4.3.2 Efeito do tratamento com $HgCl_2$ sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

A administração de fenilefrina aumentou, de maneira concentração-dependente o tônus basal dos anéis de artérias mesentéricas isoladas de animais Controle e tratados com  $HgCl_2$  (Figura 5). Entre estes grupos, não foi observada diferença quanto à resposta máxima à fenilefrina (Controle:  $115,8 \pm 3,5$  vs  $HgCl_2$ :  $124,3 \pm 2,4$ ; teste  $t - P > 0,05$ ), porém, houve um aumento significativo da sensibilidade a este agonista alfa-1 adrenérgico no grupo tratado com  $HgCl_2$  (Controle:  $5,6 \pm 0,08$  vs  $HgCl_2$ :  $6,01 \pm 0,1$ ; teste  $t - P < 0,01$ ).



**Figura 5:** Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em artérias mesentéricas de resistência de ratos dos grupos Controle ( $n = 9$ ) e  $HgCl_2$  ( $n = 8$ ). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA:  $P < 0,01$ .



#### 4.3.3 Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

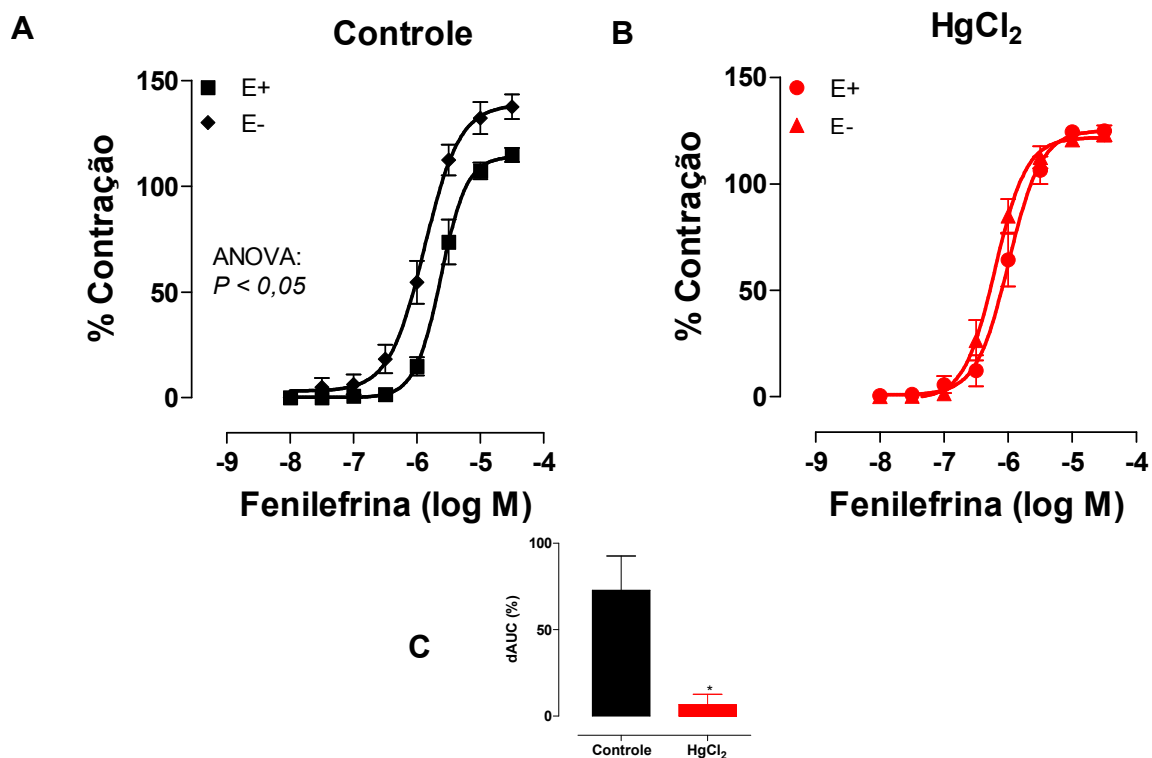
A remoção mecânica do endotélio não alterou de forma significativa a resposta contrátil ao KCl nos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Os segmentos de artéria mesentérica sem endotélio, de animais dos dois grupos experimentais, apresentaram semelhante resposta contrátil ao KCl (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores de contração (mN/mm) induzida por 120 mM de KCl em artérias mesentéricas de resistência com (E+) e sem (E-) endotélio de ratos Controle e tratados com HgCl<sub>2</sub>.

	Controle	HgCl <sub>2</sub>
E+	2,73 ± 0,14 (n=51)	2,94 ± 0,17 (n=33)
E-	2,02 ± 0,21 (n=8)	2,40 ± 0,59 (n=6)

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. teste *t* : P > 0,05.

A remoção mecânica do endotélio induziu um significativo aumento da sensibilidade (E+: 5,6 ± 0,08 (n=9) vs E-: 5,9 ± 0,07 (n=6); teste *t* – P < 0,05) e da resposta máxima (E+: 115,8 ± 3,5 (n=9) vs E-: 137,6 ± 5,8 (n=6); teste *t* – P < 0,05) à fenilefrina em artérias de ratos Controle (Figura 6A). No entanto, a retirada do endotélio não promoveu alteração da resposta contrátil a fenilefrina nas artérias dos animais do grupo HgCl<sub>2</sub> posto que nem a sensibilidade (pD<sub>2</sub>) (E+: 6,01 ± 0,10 (n=7) vs E-: 6,22 ± 0,09 (n=8) nem a resposta máxima (E+: 124,3 ± 2,4 (n=7) vs E-: 123,6 ± 3,87 (n=8)), foram afetados pelo tratamento com mercúrio (Figura 6). Estes resultados sugerem que a exposição crônica a baixas doses de HgCl<sub>2</sub> reduz a modulação endotelial na resposta vascular a fenilefrina como evidenciado pelos valores de dAUC em ambos grupos de animais.

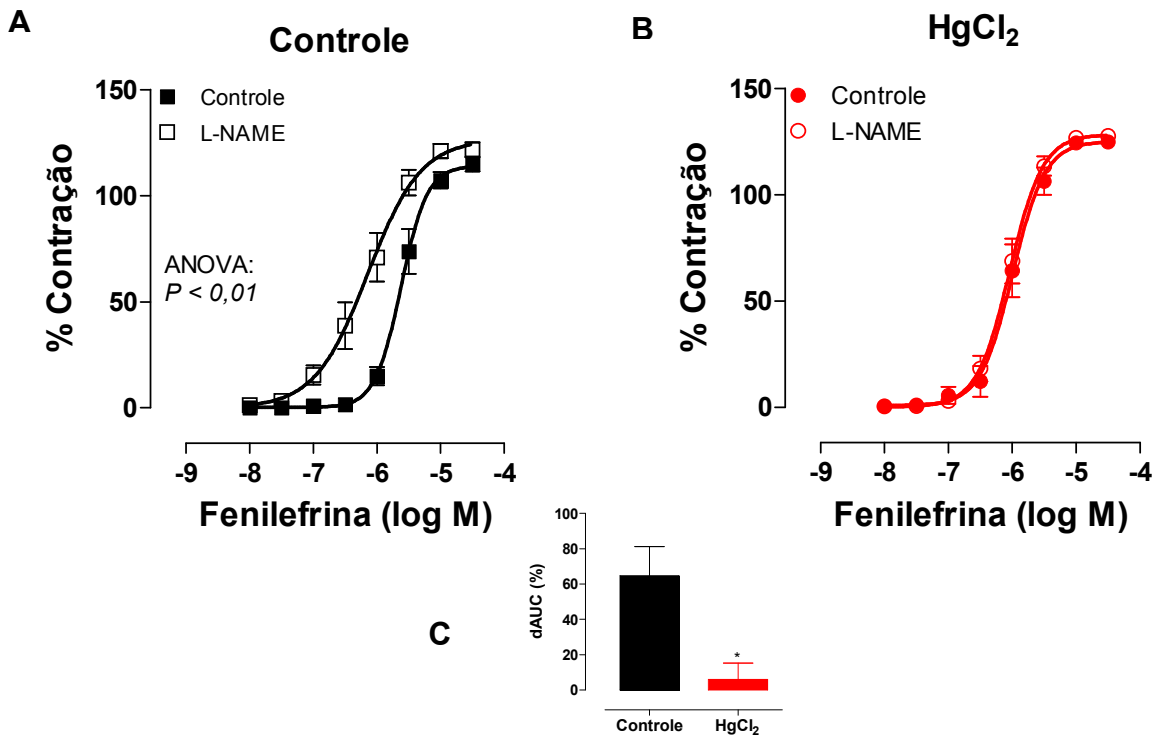


**Figura 6:** Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina, em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle (A, E+ n = 9; E- n = 6) e HgCl<sub>2</sub> (B, E+ n = 8; E- n = 8). Em C diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em artérias mesentéricas com e sem endotélio dos grupos experimentais. Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. \* P < 0,01 controle vs HgCl<sub>2</sub>.

#### 4.3.4 Influência do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina

Para analisar o papel do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência, segmentos arteriais com endotélio intacto foram pré-incubados com um inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico, o L-NAME (100 μM). O L-NAME induziu aumento da sensibilidade sem alterar a resposta máxima à fenilefrina nas artérias mesentéricas isoladas de animais Controle (Figura 7A, Tabela 2). No grupo HgCl<sub>2</sub> não houve alteração na sensibilidade e na resposta máxima (Figura 7B, Tabela 2). Como evidenciado pelos valores de dAUC (Figura 7C) o efeito da inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME foi menor no grupo HgCl<sub>2</sub> comparado ao Controle, sugerindo que o

tratamento com mercúrio promoveu prejuízo da via do óxido nítrico (NO) sobre a resposta contrátil a fenilefrina.

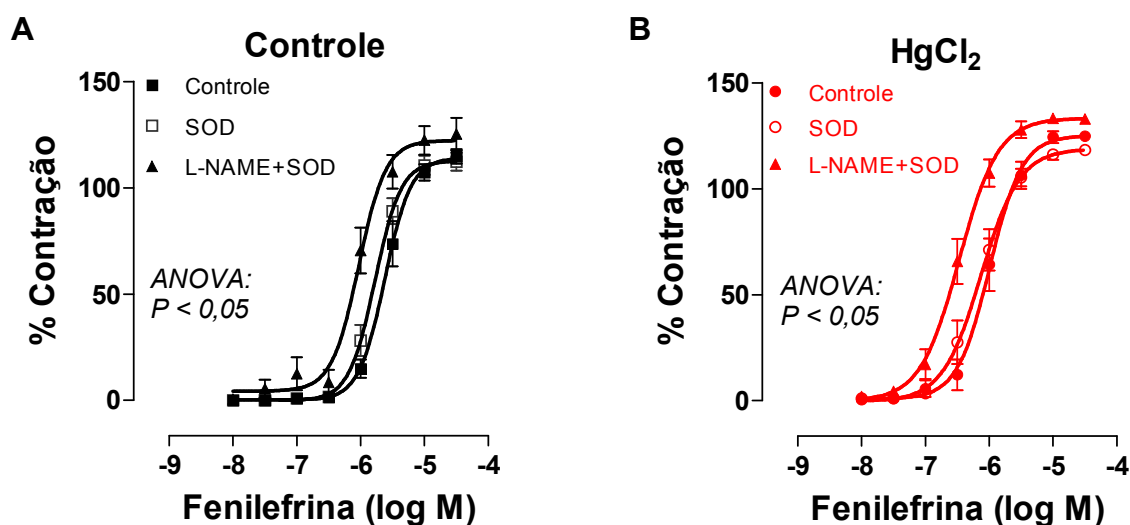


**Figura 7:** Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle (A, Controle, n = 9; L-NAME, n = 12) e HgCl<sub>2</sub> (B, Controle, n = 8; L-NAME, n = 10). Em C diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em artérias mesentéricas dos grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA:  $P < 0,01$  – Controle vs L-NAME; grupo Controle e teste *t*:  $P < 0,05$  na dAUC.

#### 4.3.5 Influência das espécies reativas de oxigênio sobre el papel do NO em a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina

Como os resultados demonstrados até o momento indicam que o tratamento crônico com HgCl<sub>2</sub> provocou prejuízo na participação do endotélio e do óxido nítrico na resposta contrátil a fenilefrina e, como dados da literatura evidenciam a participação das espécies reativas do oxigênio na disfunção endotelial (Wolf & Baynes, 2007), foi investigado se o prejuízo na via do NO promovida pela exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub> poderia estar associada a maior produção de radicais livres reduzindo a disponibilidade de NO. Para isso, segmentos de artérias mesentéricas foram incubados com SOD (150 U/ml), um “varredor” de ânions superóxido e com

L-NAME (100  $\mu$ M) mais SOD (150 U/ml). Como podemos observar a SOD não alterou a contração induzida pela fenilefrina no grupo Controle (Figura 8A). Ainda, a SOD não foi capaz de normalizar o aumento da contração induzida pela fenilefrina em artérias de ratos tratados com HgCl<sub>2</sub> (Figura 8B). No entanto, no grupo tratado com HgCl<sub>2</sub> a SOD foi capaz de restaurar o efeito do L-NAME sobre a resposta contrátil a fenilefrina. Assim, sugere-se que o tratamento com HgCl<sub>2</sub> reduziu a biodisponibilidade do NO via aumento de radicais livres.

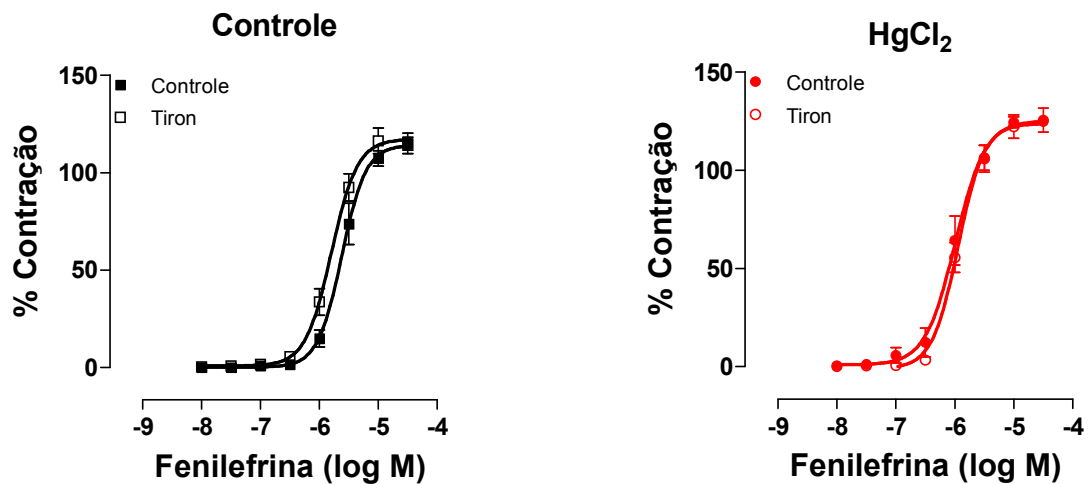


**Figura 8:** Efeito da SOD (150 U/ml) e do L-NAME (100  $\mu$ M) + SOD (100  $\mu$ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle (A) (Controle, n = 9; SOD, n = 10; L-NAME+SOD, n = 6) e HgCl<sub>2</sub> (B) (Controle, n = 8; SOD, n = 9; L-NAME+SOD, n = 6). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA (duas vias):  $P < 0,05$  (L-NAME+ SOD vs Controle ou SOD).

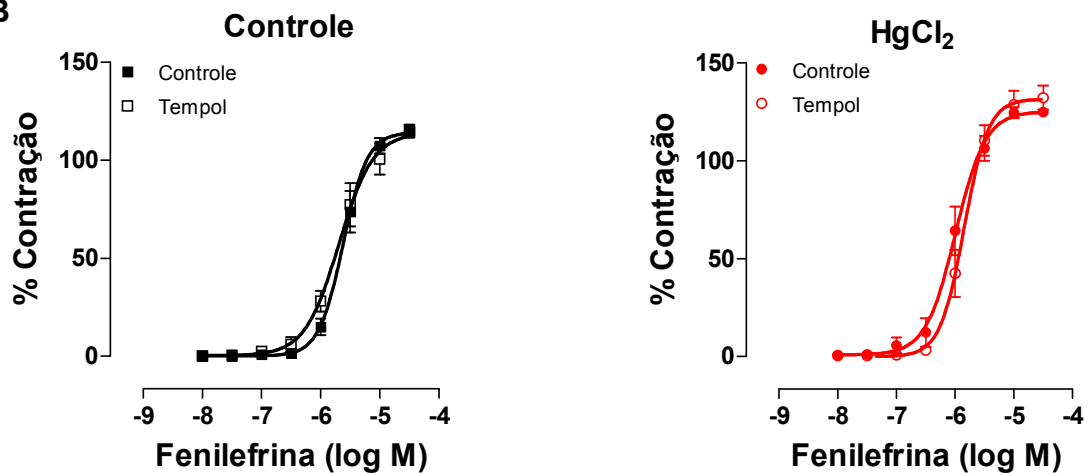
A partir da observação que a SOD restaurou o efeito do L-NAME, e embasado na literatura que associa a exposição ao mercúrio com maior produção de radicais livres (Miller & Woods, 1993; Huang *et al.*, 1996; Mahboob *et al.*, 2001; Reus *et al.*, 2003; Kim & Sharma, 2004; Wolf & Baynes, 2007; Park & Park, 2007), investigamos a participação das espécies reativas do oxigênio, com outros agentes anti-oxidantes, na resposta vasoconstritora a fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência dos ratos dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Para isso, foram desenvolvidos experimentos de reatividade vascular onde a curva concentração-resposta à fenilefrina era desenvolvida na presença do

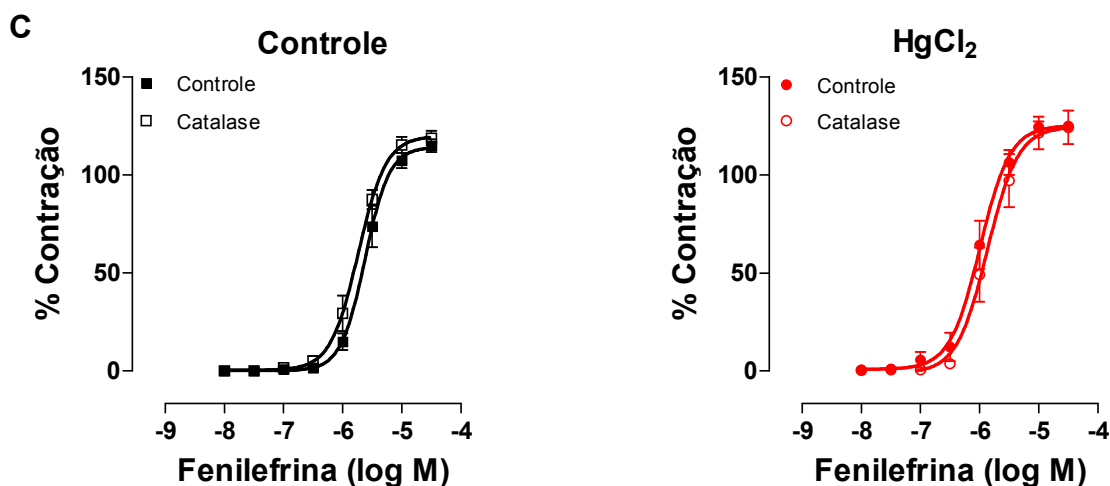
antioxidante - Tiron (1 mM), do análogo da SOD - Tempol (10  $\mu$ M) ou do varredor de  $H_2O_2$  - Catalase (1000 U/ml). Como se pode observar nos gráficos 9A, B e C a utilização destes fármacos antioxidantes não foram capazes de alterar a resposta máxima ou a sensibilidade à fenilefrina nos segmentos de artérias mesentéricas de resistência dos grupos Controle e  $HgCl_2$ . Estes resultados sugerem que as espécies reativas do oxigênio, apesar de restaurar o efeito do L-NAME como mostrado anteriormente, não parecem estar envolvidas, de forma direta, na alteração da resposta contrátil à fenilefrina promovida pela exposição crônica ao  $HgCl_2$  nas artérias mesentéricas de resistência.

**A**



**B**



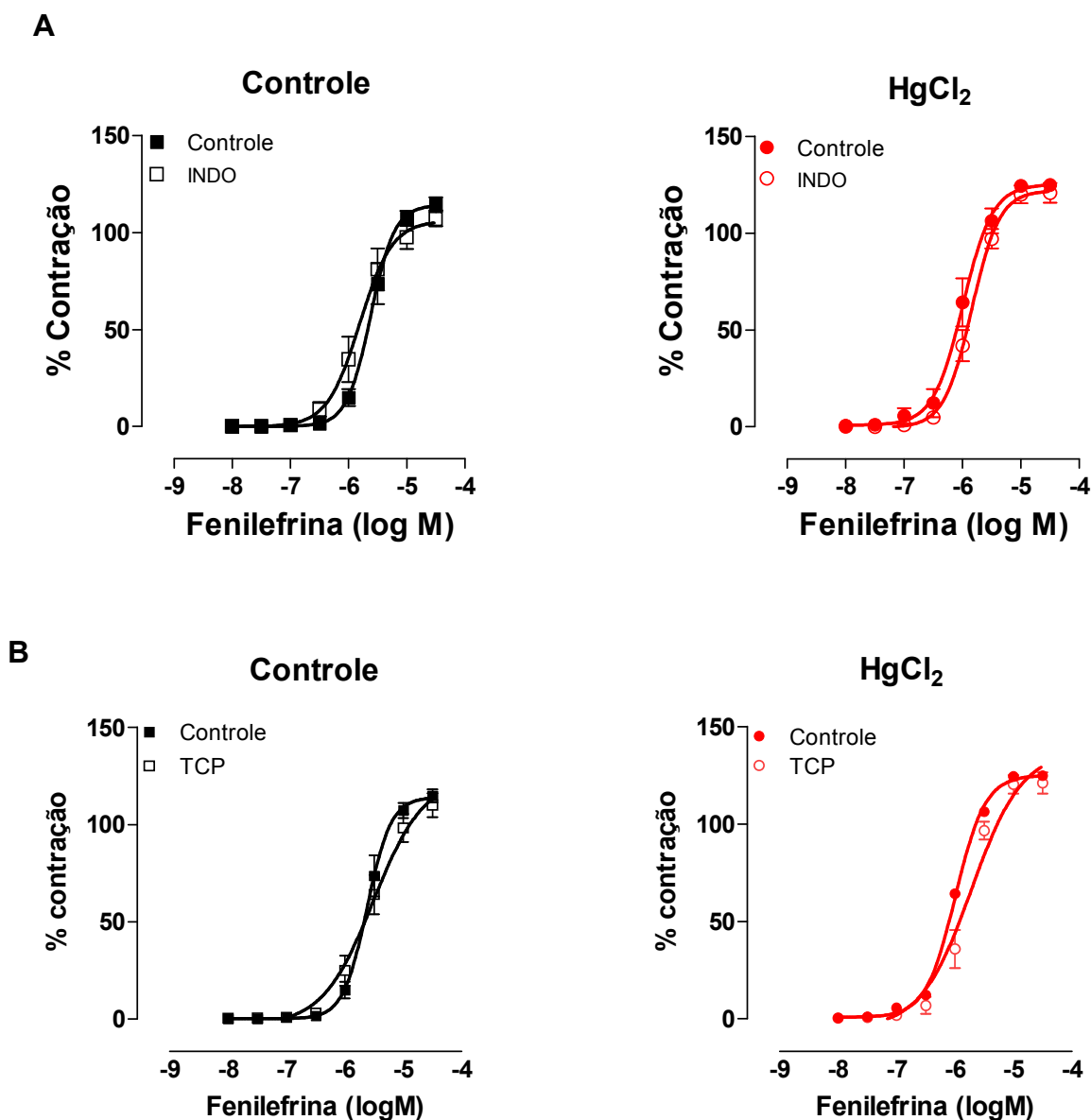


**Figura 9:** Efeito do Tiron (1 mM) (A), Tempol (10  $\mu$ M) (B) ou Catalase (1000 U/ml) (C) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle ( (A), Controle n = 9; Tiron, n = 10; (B) Controle n = 9; Tempol, n = 6; (C) Controle n = 9; Catalase, n = 5) e HgCl<sub>2</sub> ( (A), Controle n = 8; Tiron, n = 4; (B) Controle n = 8; Tempol, n = 5; (C) Controle n = 8; Catalase, n = 4). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA: P > 0,05.

#### 4.3.6 Influência dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina

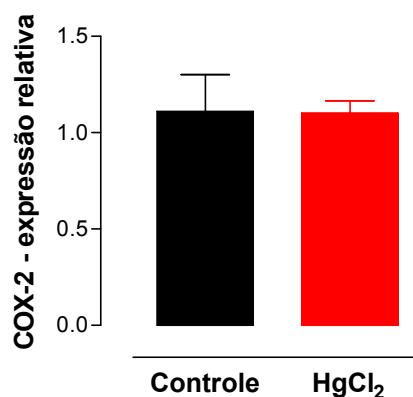
Para investigar se a exposição crônica ao cloreto de mercúrio altera a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência, artérias dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> foram incubadas com o inibidor não-específico da COX, a indometacina (1  $\mu$ M) e com um bloqueador da sintase da prostacilina, a tranilcipromina (TCP, 10 mM). Em ambos os grupos, tanto a indometacina quanto a TCP, não foi capaz de alterar de forma significativa a sensibilidade ou a resposta máxima à fenilefrina (Figura 10 A e B, Tabela 2).

Estes resultados indicam que a exposição crônica ao mercúrio não alteram a participação da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência.



**Figura 10:** (A) Efeito do bloqueio da via ácido araquidônico-ciclooxigenase com indometacina (INDO, 1  $\mu$ M) e (B) tranilcipromina (TCP, 10 mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle (A, Controle n = 9; INDO n = 7; B, TCP = 6) e HgCl<sub>2</sub> (A, Controle n = 8; INDO n = 9; B, TCP n = 6). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA: P > 0,05.

Para corroborar que o tratamento com HgCl<sub>2</sub> não altera a rota da ciclooxigenase (COX), foi analisada a expressão gênica da COX-2. Como mostra a figura 11, a expressão do RNAm da COX-2 foi similar nas MRA dos ratos do grupo Controle e HgCl<sub>2</sub>.

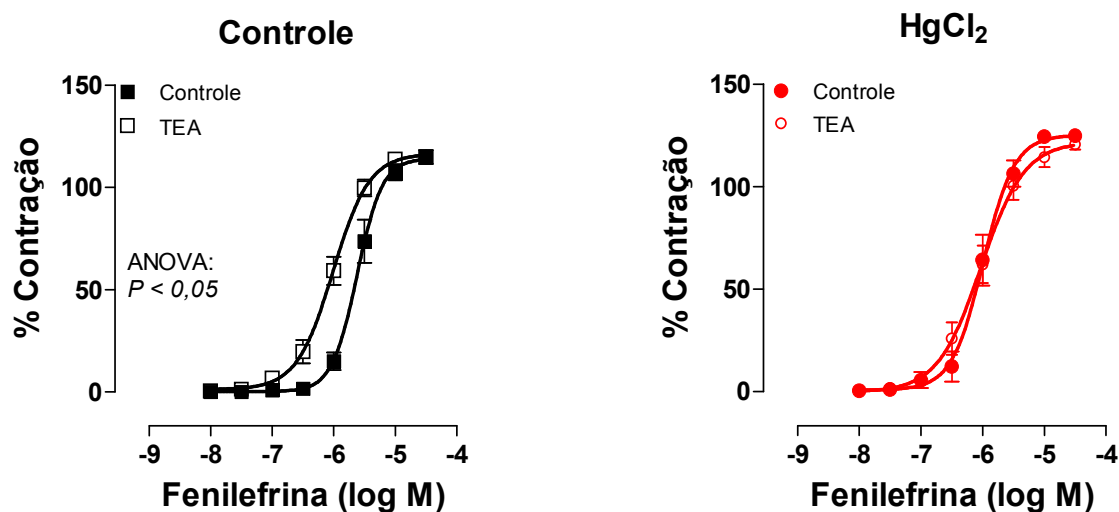


**Figura 11:** Expressão do RNAm da COX-2 por RT-PCR quantitativa em artérias mesentéricas de ratos do grupo Controle (n=8) e HgCl<sub>2</sub> (n=8). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.

#### ***4.3.7 Influência do bloqueio dos canais de potássio dependentes de cálcio sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina***

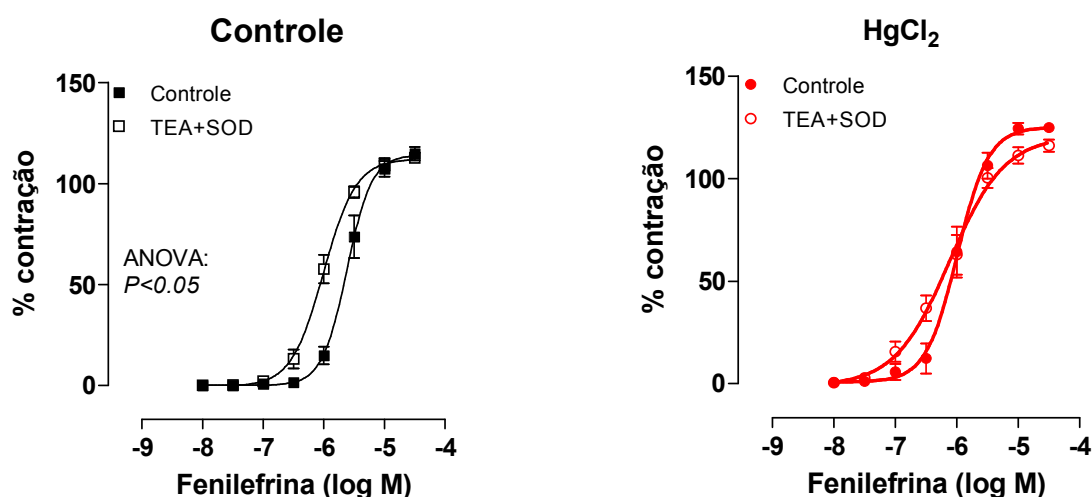
Com o intuito de melhor investigar o efeito da exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub> sobre as principais vias endoteliais que participam da resposta vascular à fenilefrina também avaliamos o papel modulatório do EDHF sobre a resposta contrátil mediada por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência. Para isso, curvas concentração-resposta à fenilefrina foram realizadas na presença do tetraetilamônio, TEA (2 mM), um bloqueador dos canais para potássio ativados por cálcio. Como observado na Figura 12 e Tabela 2 nas artérias mesentéricas dos animais do grupo Controle, o TEA promoveu aumento da sensibilidade sem alterar a resposta máxima ao agente  $\alpha$ 1-adrenérgico. Entretanto, nas artérias mesentéricas do grupo HgCl<sub>2</sub>, o TEA não modificou a resposta vascular à fenilefrina.





**Figura 12:** Efeito do bloqueador dos canais de potássio ativados por cálcio, TEA (2 mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos dos grupos Controle (Controle, n = 9; TEA, n = 15) e HgCl<sub>2</sub> (Controle, n = 8; TEA, n = 11) . Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA (duas vias): P < 0,05 (TEA vs Controle – grupo Controle).

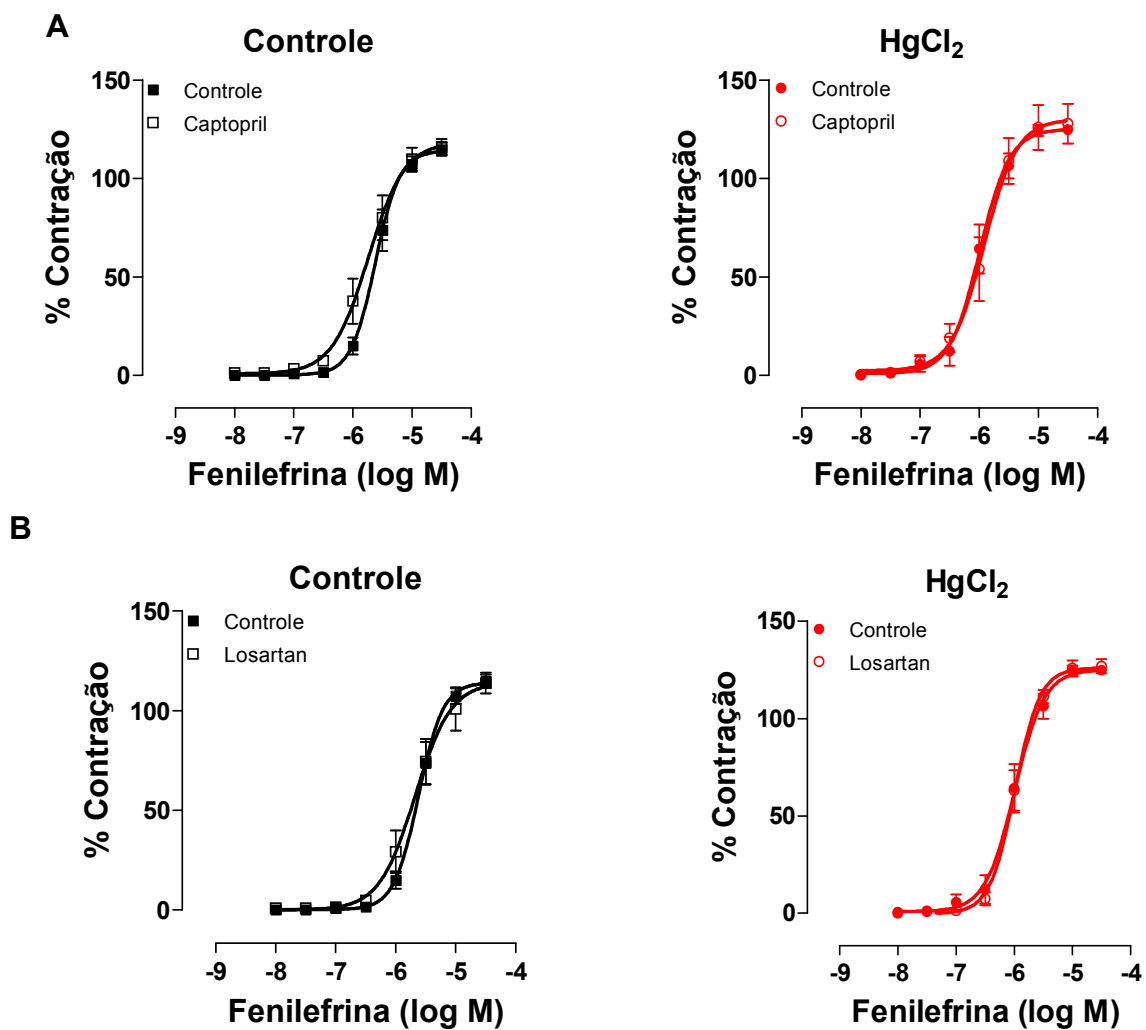
Uma vez que está descrito que o NO pode também ativar canais de K<sup>+</sup> induzindo assim o relaxamento vascular, realizamos experimento para comprovar se a menor disponibilidade de NO devido ao aumentadas espécies reativas de oxigênio era a responsável da falta de participação dos canais K<sup>+</sup> ativados por cálcio na resposta a fenilefrina pelo tratamento com HgCl<sub>2</sub>. Para tal, as artérias foram incubadas com TEA mais SOD. Como se mostra na figura 13, o tratamento com SOD não restaurou o efeito potencializador resposta a fenilefrina induzida pela TEA que se observa nas artérias dos ratos controle. Estes resultados sugerem que o tratamento com mercúrio prejudica a participação dos canais de potássio ativados por cálcio na resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de maneira independente ao efeito do NO sobre estes canais.



**Figura 13:** Efeito da associação do bloqueador dos canais de potássio ativados por cálcio, TEA (2 mM) associado a SOD (150 U/ml) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos dos grupos Controle (Controle, n = 9; TEA+SOD, n = 9) e HgCl<sub>2</sub> (Controle, n = 8; TEA+SOD, n = 9). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA (duas vias):  $P < 0,05$  (TEA+SOD vs Controle – grupo Controle).

#### 4.3.8 Efeito do sistema renina angiotensina sobre a resposta contrátil a fenilefrina

Com base em resultados previamente publicados pelo grupo (Wiggers *et al.* 2008) foi evidenciado que o aumento da atividade da enzima conversora da angiotensina participa da hiperreatividade à fenilefrina induzida pelo HgCl<sub>2</sub> no leito vascular caudal de ratos. Assim, no presente estudo foi investigado a participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos tratados cronicamente com HgCl<sub>2</sub>. Para tal, segmentos de artérias mesentéricas de animais dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> eram incubados com o inibidor da enzima conversora da angiotensina, o Captopril (0,1 mM) e com um antagonista dos receptores AT<sub>1</sub>, o Losartan (10 mM). Pode ser observado que o Captopril (Figura 14 A) ou o Losartan (Figura 14 B) não alteraram a resposta máxima ou a sensibilidade à fenilefrina em nenhum dos grupos experimentais, sugerindo que o tratamento com cloreto de mercúrio parece não alterar a participação do sistema renina-angiotensina na resposta vascular a fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência.



**Figura 14:** (A) Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) pela incubação com Captopril (0,1 mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle (Controle n = 9; Captopril n = 10) e HgCl<sub>2</sub> (Controle n = 8; Captopril n = 8). (B) Efeito do bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> pela incubação com o antagonista Losartan (10 mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle (Controle n = 9; Losartan n = 8) e HgCl<sub>2</sub> (Controle n = 8; Losartan n = 6). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA: P > 0,05.

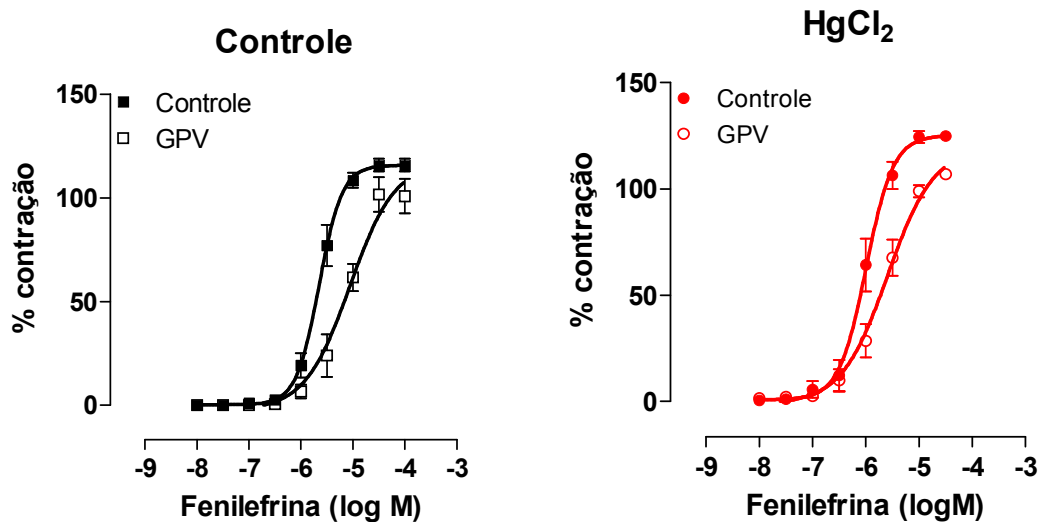
**Tabela 2:** Valores de pD<sub>2</sub> e resposta máxima (R<sub>máx</sub>, % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub> na condição controle e após incubação com L-NAME (100 µM), SOD (150 U/ml), LNAME+SOD (100 µM+ 150 U/ml), Tiron (1 mM), Tempol (10µM), Catalase (1000 U/ml), Indometacina (INDO-10 nM), TCP (10 mM), TEA (2 mM), TEA+SOD, Captopril (0,1 mM), Losartan (10 mM).

	n	Controle		HgCl <sub>2</sub>	
		pD <sub>2</sub>	R <sub>máx</sub>	pD <sub>2</sub>	R <sub>máx</sub>
Controle	9	5,61 ± 0,08	115,8 ± 3,5	6,01 ± 0,10 *	124,3 ± 2,4
LNAME	12	6,22 ± 0,13 #	121,8 ± 3,3	6,05 ± 0,07	127,6 ± 2,5
SOD	10	5,77 ± 0,05	111,8 ± 4,2	6,15 ± 0,09	116,4 ± 2,2
L-NAME+SOD	6	6,14 ± 0,21 #	124,9 ± 7,0	6,42 ± 0,10 #	132,8 ± 2,2
Tiron	10	5,72 ± 0,06	132,7 ± 5,2	5,87 ± 0,04	138,2 ± 6,5
Tempol	6	5,77 ± 0,09	129,2 ± 4,8	5,77 ± 0,09	149,4 ± 7,6
Catalase	5	5,67 ± 0,07	135,0 ± 3,6	5,78 ± 0,09	138,7 ± 8,1
INDO	7	5,75 ± 0,16	111,7 ± 7,3	5,85 ± 0,06	121,5 ± 5,2
TCP	6	5,50 ± 0,13	128,7 ± 8,4	5,7 ± 0,1	145,5 ± 10,1
TEA	15	6,06 ± 0,07#	116,1 ± 3,4	5,99 ± 0,17	123,6 ± 3,5
TEA+SOD	9	6,03 ± 0,63#	111,3 ± 2,4	6,18 ± 0,14	119,6 ± 3,7
Captopril	10	5,63 ± 0,13	136,4 ± 3,9	5,88 ± 0,10	141,2 ± 10,1
Losartan	7	5,32 ± 0,36	133,9 ± 4,8	5,94 ± 0,07	140,5 ± 4,6

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. teste t: \* P < 0,05 Controle vs HgCl<sub>2</sub>; # P < 0.05 vs curva controle.

#### 4.3.9 Efeito dos derivados vasoativos liberados pelo tecido perivascular sobre a resposta contrátil a fenilefrina

Posto que o mercúrio tem grande afinidade pelos depósitos de gordura e pode alterar a função dos adipócitos (Ferens, 1974; Levine *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2003) e a gordura perivascular libera fatores que controlam o tônus vascular (Fernandez-Alfonso, 2004), nos propusemos avaliar se o tratamento com  $\text{HgCl}_2$  afeta a participação dos derivados vasoativos liberados pela gordura perivascular sobre a contração a fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência. Como podemos observar na figura 15, a presença de gordura perivascular produziu uma diminuição da sensibilidade à resposta vasoconstritora a fenilefrina nas artérias de ratos do grupo controle ( $5,61 \pm 0,08$  vs  $5,09 \pm 0,13$ ) e  $\text{HgCl}_2$  ( $6,01 \pm 0,10$  vs  $5,59 \pm 0,13$ ) sem alterar a resposta máxima (grupo controle:  $115,8 \pm 3,5$  vs  $118,6 \pm 12,0$  e grupo  $\text{HgCl}_2$ :  $124,3 \pm 2,4$  vs  $124,24 \pm 4,9$ ). No entanto, o efeito da presença de gordura perivascular sobre a resposta a fenilefrina foi similar nas artérias de ambos os grupos. Estes dados sugerem que a gordura perivascular libera fatores dilatadores e que o tratamento com mercúrio não altera estes fatores.

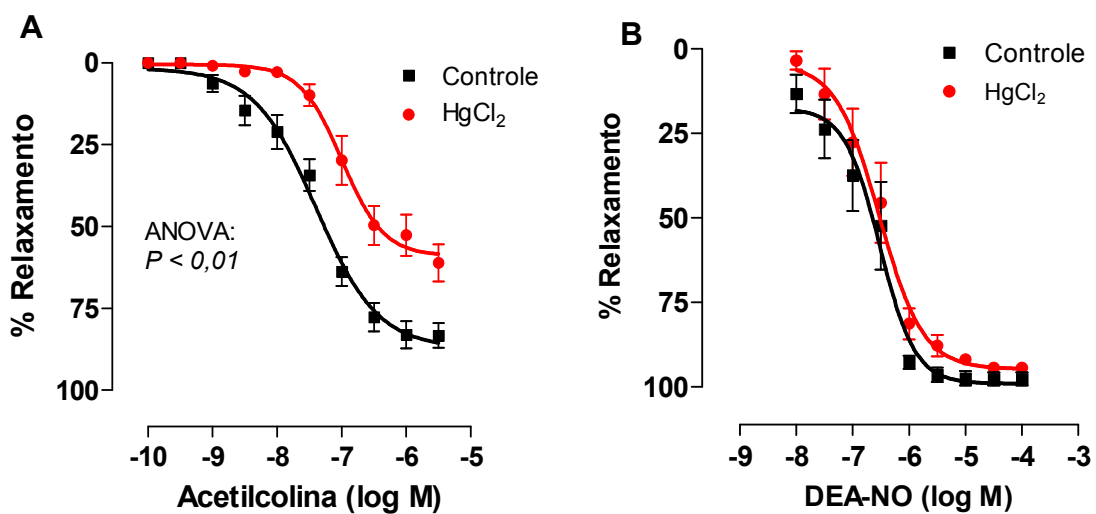


**Figura 15:** Efeito da gordura perivascular (GPV) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos Controle (Controle n = 9; GPV n = 5) e  $\text{HgCl}_2$  (Controle n = 8; GPV n = 8). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA:  $P > 0,05$ .

#### 4.3.10 Efeito do tratamento com $HgCl_2$ sobre a resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio

Para avaliar o efeito da exposição crônica ao  $HgCl_2$  sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (1nM - 30  $\mu$ M) e DEA-NO (10 nM – 0,1 mM), respectivamente.

A acetilcolina promoveu relaxamento concentração-dependente nas artérias dos animais de ambos os grupos experimentais, no entanto, houve prejuízo deste relaxamento nos segmentos arteriais de animais do grupo  $HgCl_2$ , com redução da sensibilidade e da resposta máxima à acetilcolina (Figura 16A, Tabela 3). Na curva concentração-resposta ao DEA-NO não foram observadas diferenças significativas na sensibilidade ou na resposta máxima entre os grupos experimentais estudados (Figura 16B, Tabela 3). Assim, pode-se sugerir que o tratamento com  $HgCl_2$  promoveu disfunção endotelial e não alterou o relaxamento independente do endotélio.



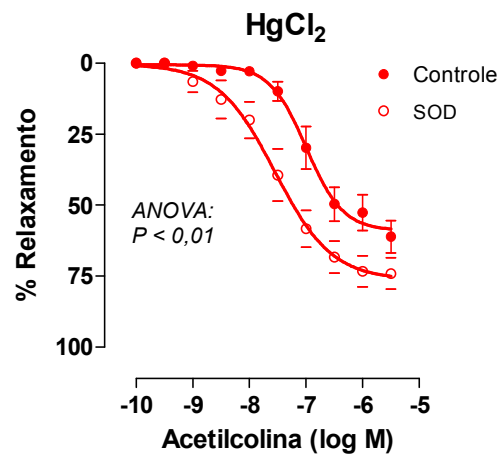
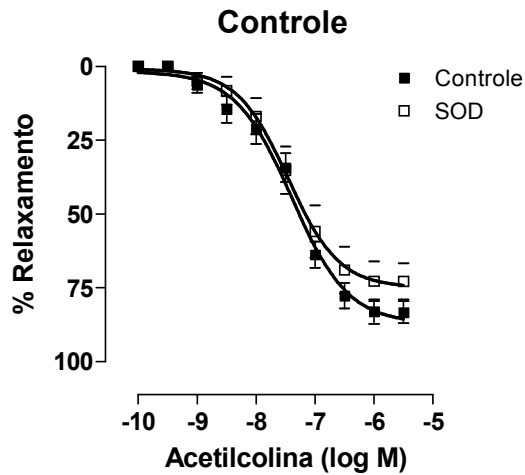
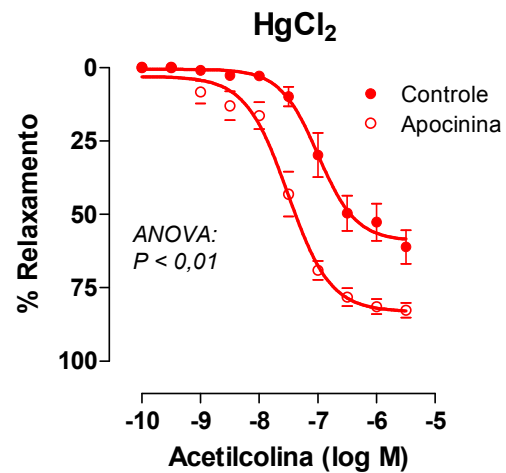
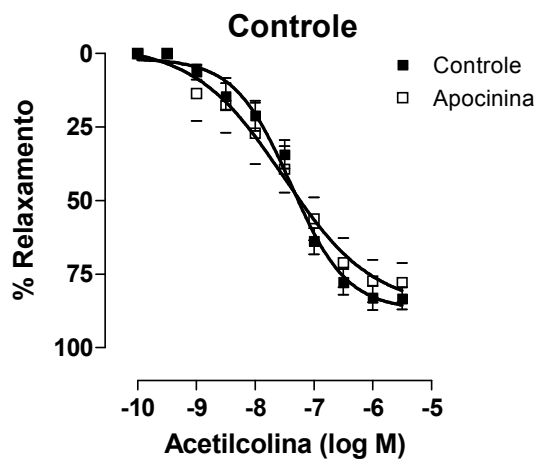
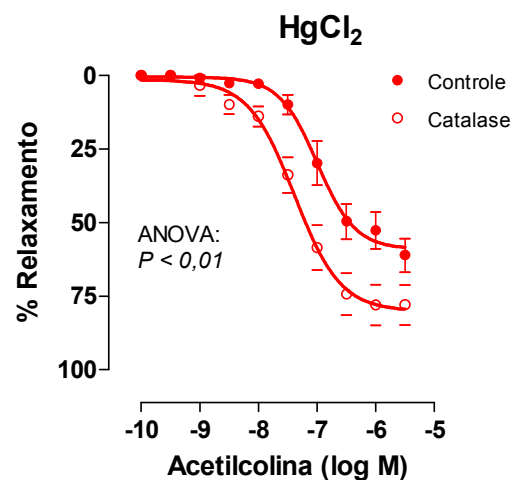
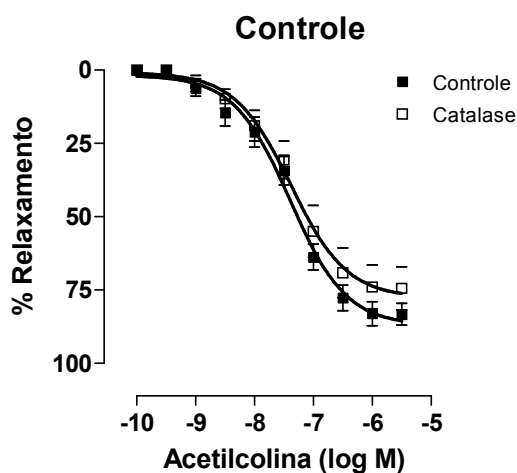
**Figura 16:** (A) Curva concentração-resposta à acetilcolina (Controle, n = 6 vs  $HgCl_2$ , n = 6) e (B) curva concentração-resposta ao DEA-NO (Controle, n = 7 vs  $HgCl_2$ , n = 8) em artérias mesentéricas de resistência dos grupos Controle e  $HgCl_2$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ANOVA:  $P < 0,01$  Controle vs  $HgCl_2$ .

#### ***4.3.11 Efeito das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta do relaxamento dependente do endotélio***

Como os resultados demonstraram que o tratamento com HgCl<sub>2</sub> promove disfunção endotelial nas artérias mesentéricas de resistência e as espécies reativas de oxigênio participam do aumento da resposta contrátil a fenilefrina, investigamos se o prejuízo do relaxamento a acetilcolina poderia estar relacionado ao aumento da produção de espécies reativas do oxigênio. Para tal, o relaxamento à acetilcolina foi avaliado na presença de um inibidor da NADPH oxidase, a Apocinina (0,3 mM), com a enzima detoxificadora de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a SOD (150 U/ml) ou com a enzima detoxificadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Catalase (1000 U/ml).

Em artérias do grupo Controle, nem a resposta máxima nem a sensibilidade à acetilcolina foram alteradas na presença de Apocinina, SOD ou Catalase (Figuras 17A, B e C, Tabela 3). No entanto, a presença destes fármacos provocou aumento da sensibilidade e da resposta máxima a acetilcolina nas artérias mesentéricas dos animais do grupo HgCl<sub>2</sub> (Figuras 17A, B e C, Tabela 3).

Estes resultados indicam que a disfunção endotelial observada nos animais expostos cronicamente ao HgCl<sub>2</sub> parece ser provocada pelas espécies reativas derivadas do oxigênio.

**A****B****C**

**Figura 17:** Efeito da SOD (150 U/ml) (A), Apocinina (0,3 mM) (B) e Catalase (1000 U/ml) (C) sobre o relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas de ratos Controle ( ( A), Controle n = 6; SOD, n = 6; (B) Controle n = 6; Apocinina, n = 4; (C) Controle n = 6; Catalase, n = 7) e HgCl<sub>2</sub> ( (A), Controle n = 6; SOD, n = 6; (B) Controle n = 6; Apocinina, n = 6; (C) Controle n = 6; Catalase, n = 6). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA: P < 0,01.



**Tabela 3:** Valores de  $pD_2$  e resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ , % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à DEA-NO e acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle e  $HgCl_2$  na condição controle e após incubação com Apocinina (0,3 mM), SOD (150U/ml) e Catalase (1000 U/ml).

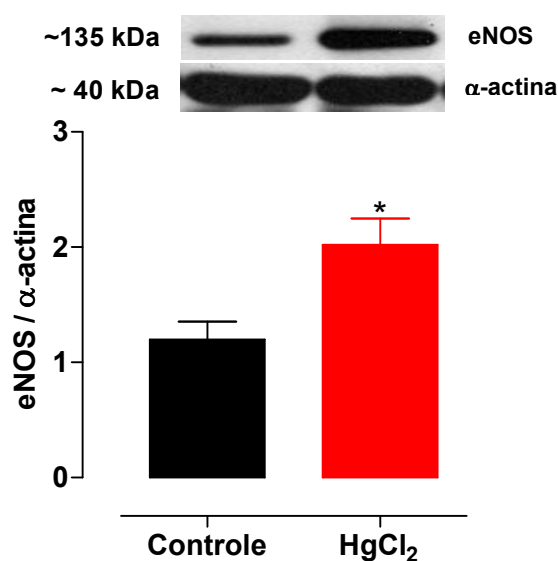
	Controle			$HgCl_2$		
	n	$pD_2$	$R_{m\acute{a}x}$	n	$pD_2$	$R_{m\acute{a}x}$
<b>DEA-NO</b>	6	6,49 ± 0,11	98,3 ± 2,0	8	6,81 ± 0,28	93,3 ± 1,6
<b>Acetilcolina</b>						
Controle	6	7,43 ± 0,12	88,6 ± 5,3	6	6,96 ± 0,13 *	59,5 ± 5,4 *
Apocinina	4	8,62 ± 1,14	77,1 ± 5,0	6	7,55 ± 0,09 #	85,4 ± 4,0 #
SOD	6	7,54 ± 0,18	75,2 ± 5,6	6	7,69 ± 0,30 #	74,9 ± 5,8 #
Catalase	7	8,77 ± 1,43	82,3 ± 6,1	6	7,37 ± 0,08 #	80,5 ± 6,9 #

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. Teste t: \*  $P < 0,05$  Controle vs  $HgCl_2$ ; #  $P < 0,05$  vs curva Controle (grupo  $HgCl_2$ ).

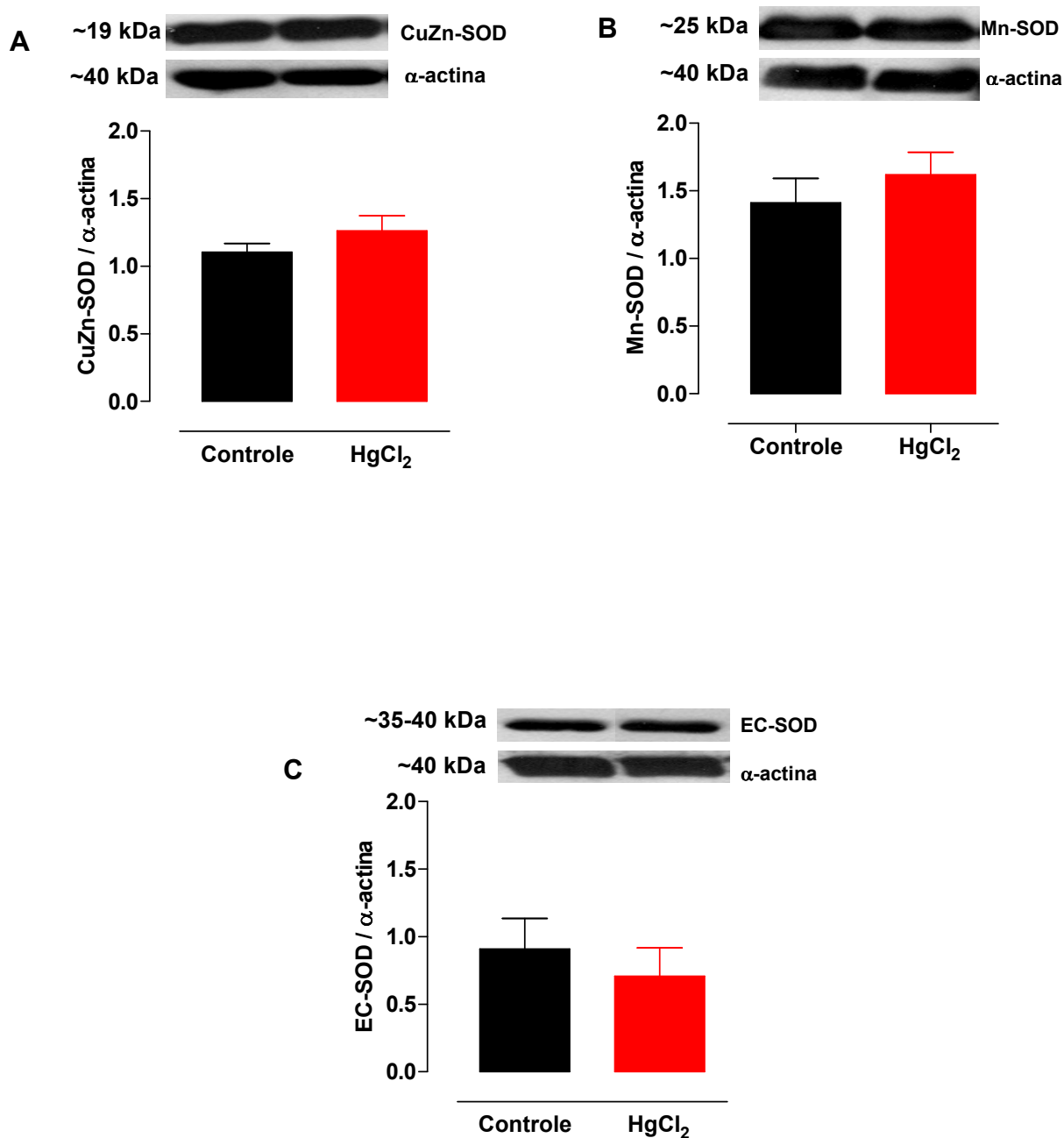
#### 4.3.12 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e isoformas CuZn (cobre-zinco), Mn (manganês) e EC (extracelular) da superóxido dismutase (SOD) e expressão gênica da NOX-1

Foram detectadas, por meio de Western Blot, em artérias mesentéricas de resistência, a presença da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) nos animais dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Como pode ser observado na Figura 18 o tratamento com HgCl<sub>2</sub> provocou aumento da expressão desta isoforma da sintase de óxido nítrico.

Ainda investigamos se o tratamento com HgCl<sub>2</sub> alterava a expressão protéica das três isoformas da SOD. Como observado na Figura 19 não houve alteração na expressão protéica das isoformas, CuZn, Mn ou EC da SOD nas artérias mesentéricas de animais dos dois grupos experimentais.



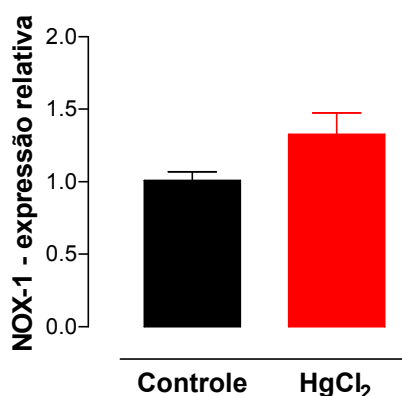
**Figura 18:** Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle (n = 8) e HgCl<sub>2</sub> (n = 8). As fotos acima mostram as bandas representativas da expressão da eNOS e da α-actina em artérias mesentéricas de ratos de ambos grupos. O controle positivo utilizado foram células endoteliais humanas (não demonstrado). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como expressão da eNOS em relação a α-actina. \* P < 0,05 – Controle vs HgCl<sub>2</sub>.



**Figura 19:** A. Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica das três isoformas da superóxido dismutase (SOD) de artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle (n = 8) e HgCl<sub>2</sub> (n = 8). (A) CuZn-SOD, (B) Mn-SOD, e (C) EC-SOD. As fotos acima mostram as bandas representativas da expressão de CuZn-SOD, Mn-SOD e EC-SOD e da  $\alpha$ -actina em artérias mesentéricas de ratos de ambos grupos. O controle positivo utilizado foram para CuZn-SOD e Mn-SOD de extrato de tecido cerebral de rato e para EC-SOD extrato de tecido pulmonar de rato

(não demonstrado). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão mostrados como expressão das isoformas de SOD em relação à  $\alpha$ -actina.

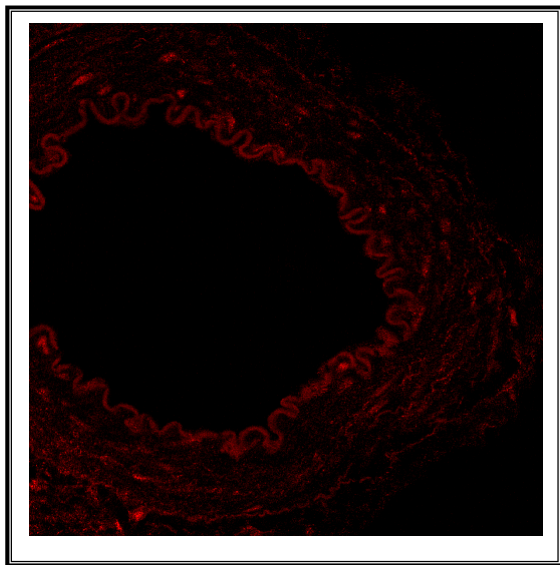
Para corroborar com os dados indicativos que o tratamento com  $\text{HgCl}_2$  causa dano endotelial com redução da biodisponibilidade de NO pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, foi analisada a expressão gênica da NOX-1, a principal subunidade da NADPHoxidase precursora da formação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Soccio *et al.*, 2005). Como mostra a figura 20, houve uma tendência ao aumento da expressão do RNAm da NOX-1 nas MRA dos ratos do  $\text{HgCl}_2$  ( $p = 0,09$ ).



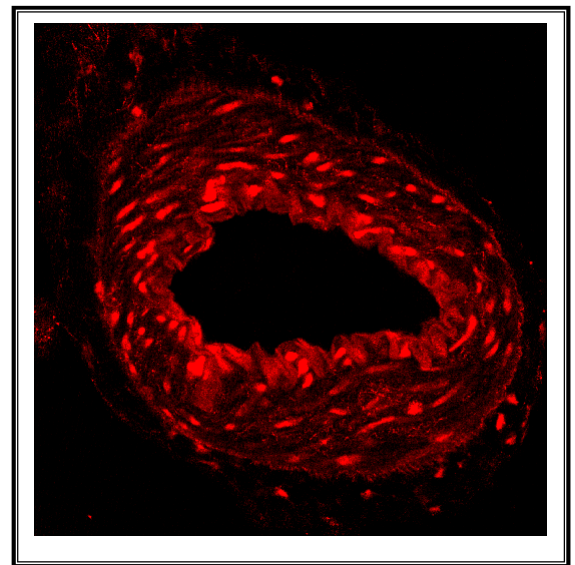
**Figura 20:** Expressão do RNAm da NOX-1 por RT-PCR quantitativa em artérias mesentéricas de ratos do grupo Controle ( $n=7$ ) e  $\text{HgCl}_2$  ( $n=7$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.3.13 Detecção vascular “*in situ*” da produção de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

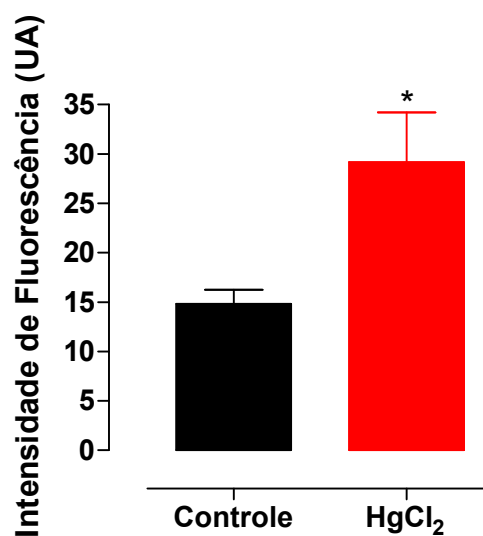
Resultados anteriores deste estudo indicam que o tratamento com  $\text{HgCl}_2$  promove disfunção endotelial que parece ser provocada por espécies reativas do oxigênio. Assim sendo, avaliamos se o tratamento com  $\text{HgCl}_2$  promove alteração na produção basal de ânion superóxido. Para isso, anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos dos grupos Controle e  $\text{HgCl}_2$  foram incubados com dihidroetídio e, como pode ser observado na Figura 21 o tratamento com  $\text{HgCl}_2$  aumentou a fluorescência produzida por dihidroetídio indicando maior produção basal do ânion superóxido nestas artérias.



Controle



HgCl<sub>2</sub>

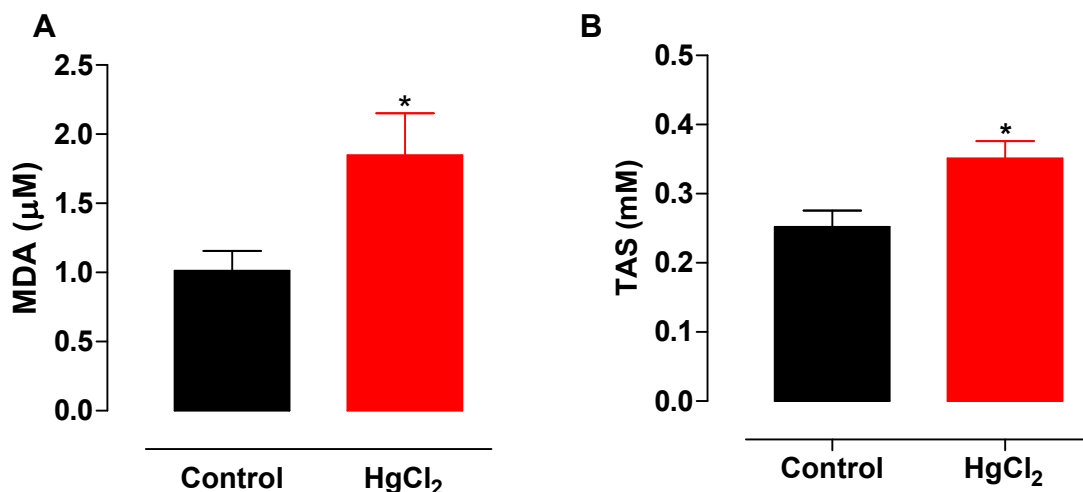


**Figura 21:** Painéis com microfotografias representativas da fluorescência emitida por dihidroetídeo (DHE) em cortes transversais de anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos Controle (painel à esquerda) e HgCl<sub>2</sub> (painel à direita). Tamanho da imagen 375 x 375 μm. O gráfico representa a Intensidade de Fluorescência em unidade arbitrária (UA) emitida por DHE nos dois grupos experimentais (Controle=7; HgCl<sub>2</sub>=10). Os resultados (média ± erro padrão da média). teste *t*. \* P < 0,05 – Controle vs HgCl<sub>2</sub>.

#### 4.3.14 Medida da produção de malondialdeído (MDA) e do estado total antioxidante plasmático (TAS)

Com o intuito de verificar se o estado oxidante e antioxidante plasmático são alterados pelo tratamento com  $\text{HgCl}_2$  foram realizadas medidas da produção do malondialdeído e do estado total antioxidante plasmático.

Como se observa na Figura 22A os níveis plasmáticos de malondialdeído estão aumentados nos animais do grupo  $\text{HgCl}_2$ . Por outro lado, o estado antioxidante plasmático, representado na figura 22B, também se encontra aumentado nos animais do grupo  $\text{HgCl}_2$ . Estes resultados indicam que o tratamento com mercúrio induz aumento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidativa.



**Figura 22:** Gráfico representativo da concentração de Malondialdeído Plasmático (Controle, n = 9;  $\text{HgCl}_2$ , n = 13) (A) e do Estado Total Antioxidante Plasmático (Controle, n = 11;  $\text{HgCl}_2$ , n = 11) (B) em ratos dos grupos Controle e  $\text{HgCl}_2$ . teste t: \* P < 0,05.

#### 4.4 Experimentos com Artérias Basilares

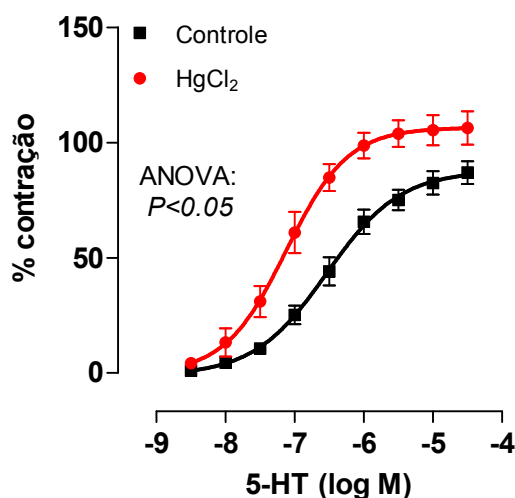
Como o mercúrio possui grande afinidade pelo tecido cerebral, averiguamos se o tratamento por 30 dias com  $\text{HgCl}_2$  afetava a função de artérias cerebrais.

##### 4.4.1 Efeito do tratamento com mercúrio sobre o diâmetro das artérias basilares e resposta vascular ao Cloreto de Potássio (KCl)

O diâmetro luminal efetivo das artérias basilares não diferiu entre os grupos experimentais (Controle:  $228,3 \pm 6,7 \mu\text{m}$  vs  $\text{HgCl}_2$ :  $228,5 \pm 7,3 \mu\text{m}$ ; teste  $t - P > 0,05$ ). Os valores de contração máxima induzida por 120 mM de KCl foram de similar magnitude nos segmentos arteriais nos grupos Controle ( $1,98 \pm 0,14 \text{ mN/mm}$ ;  $n=14$ ) e  $\text{HgCl}_2$  ( $1,95 \pm 0,08 \text{ mN/mm}$ ;  $n=11$ ) (teste  $t - P > 0,05$ ).

#### 4.4.2 Efeito do tratamento com $\text{HgCl}_2$ sobre a resposta vasoconstritora à serotonina (5-HT)

A administração de 5-HT aumentou, de maneira concentração-dependente o tônus basal dos anéis de artérias basilares isoladas de animais Controle e tratados com  $\text{HgCl}_2$  (Figura 23). Entre estes grupos, não houve diferença na resposta máxima (Controle:  $87,0 \pm 7,0$  vs  $\text{HgCl}_2$ :  $106,9 \pm 7,0$ ; teste  $t - P > 0,05$ ), no entanto a sensibilidade a 5-HT aumentou no grupo tratado com  $\text{HgCl}_2$  (Controle:  $6,5 \pm 0,12$  vs  $\text{HgCl}_2$ :  $7,18 \pm 0,2$ ; teste  $t - P < 0,01$ ).

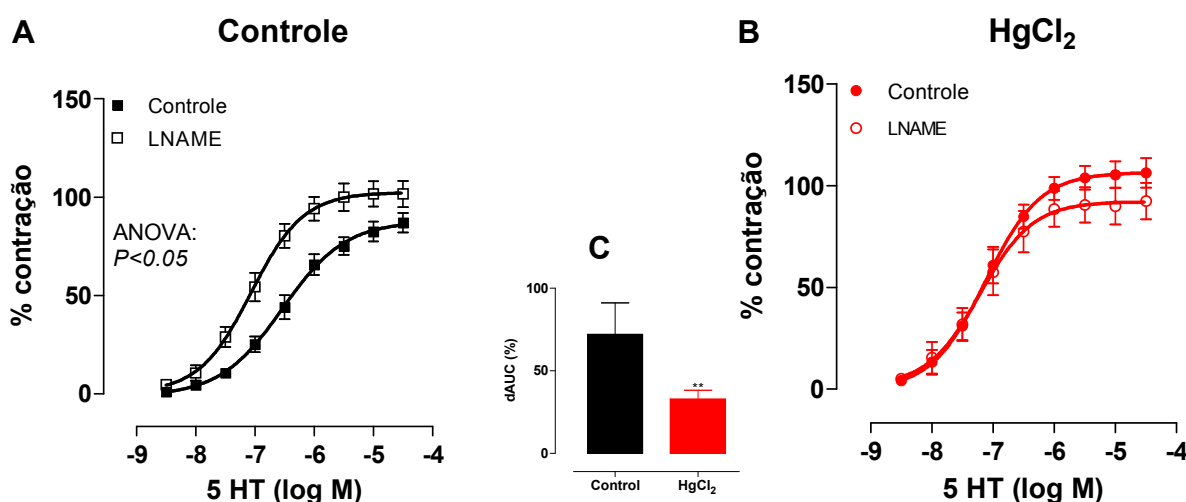


**Figura 23:** Resposta contrátil induzida por 5-HT, em artérias basilares de ratos dos grupos Controle ( $n = 12$ ) e  $\text{HgCl}_2$  ( $n = 5$ ). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA:  $P < 0,05$ .

#### 4.4.3 Influência do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora induzida por 5-HT

Para analisar o papel do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em basilares, segmentos arteriais com endotélio intacto foram pré-incubados com um inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico, o L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ). No grupo

controle o L-NAME induziu aumento da sensibilidade (Controle:  $6,5 \pm 0,12$  vs LNAME:  $7,1 \pm 0,1$ ; teste  $t - P < 0,05$ ) sem alterar a resposta máxima à fenilefrina nas artérias isoladas dos animais (Controle:  $87,0 \pm 5,6$  vs LNAME:  $101,3 \pm 6,2$ ; teste  $t - P > 0,05$ ) (Figura 24A). No grupo  $HgCl_2$  não houve alteração na sensibilidade (Controle:  $-7,2 \pm 0,2$  vs LNAME:  $-7,7 \pm 0,6$ ; teste  $t - P > 0,05$ ) e na resposta máxima (Controle:  $106,9 \pm 7,0$  vs LNAME:  $93,4 \pm 9,5$ ; teste  $t - P > 0,05$ ) (Figura 24B). Como evidenciado pelos valores de dAUC (Figura 24C) o efeito da inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME foi menor no grupo  $HgCl_2$  comparado ao Controle, sugerindo que o tratamento com mercúrio promoveu prejuízo da via do óxido nítrico (NO) sobre a resposta contrátil a 5-HT.



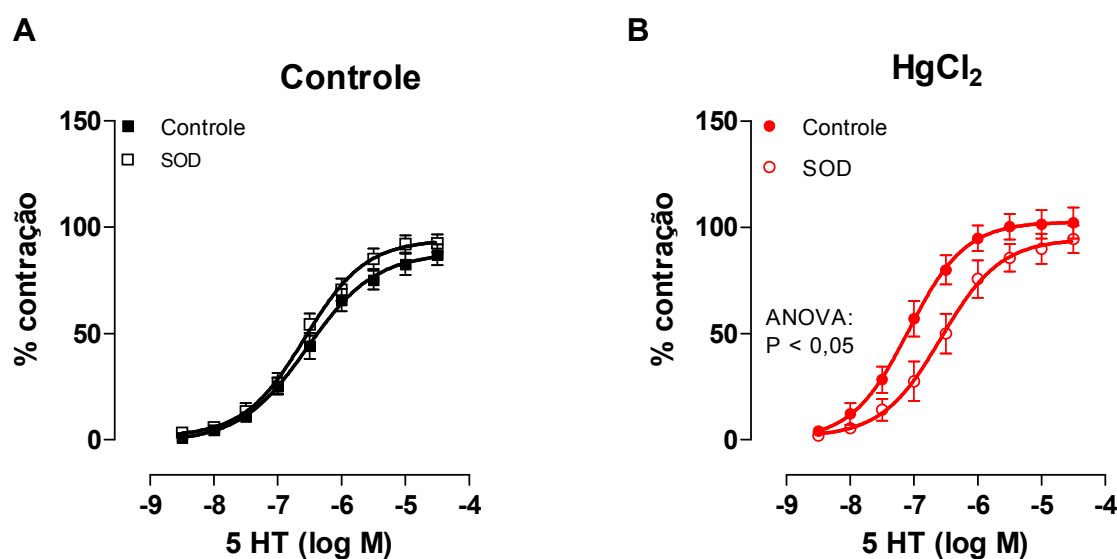
**Figura 24:** Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME ( $100 \mu M$ ) sobre a resposta contrátil induzida por 5-HT em artérias basílicas de ratos Controle (A, Controle,  $n = 12$ ; L-NAME,  $n = 9$ ) e  $HgCl_2$  (B, Controle,  $n = 5$ ; L-NAME,  $n = 7$ ). Em C diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em artérias basílicas dos grupos experimentais. Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por  $120 mM$  de KCl. ANOVA:  $P < 0,05$  – Controle vs L-NAME: grupo Controle e teste  $t$ :  $P < 0,01$  na dAUC.

#### 4.4.4 Influência das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta vasoconstritora induzida por 5-HT

Como podemos observar a SOD não alterou a resposta máxima (Controle:  $87,0 \pm 5,6$  vs SOD:  $96,5 \pm 7,4$ ; teste  $t - P > 0,05$ ) ou sensibilidade (Controle:  $6,5 \pm$



0,1 vs SOD:  $6,6 \pm 0,11$ ; teste  $t - P > 0,05$ ) a contração induzida pela 5-HT no grupo Controle (Figura 25A). No grupo  $HgCl_2$  não houve alteração na resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ : Controle:  $106,9 \pm 7,0$  vs SOD:  $93,6 \pm 6,0$ ; teste  $t - P > 0,05$ ) porém a SOD reduziu significativamente a sensibilidade ( $pD_2$ : Controle:  $7,2 \pm 0,2$  vs SOD:  $6,6 \pm 0,2 - P < 0,05$ ) (Figura 25B). Assim, estes resultados indicam que as espécies reativas de oxigênio são responsáveis pela maior contração induzida por 5-HT em artérias basilares pelo tratamento com  $HgCl_2$ .

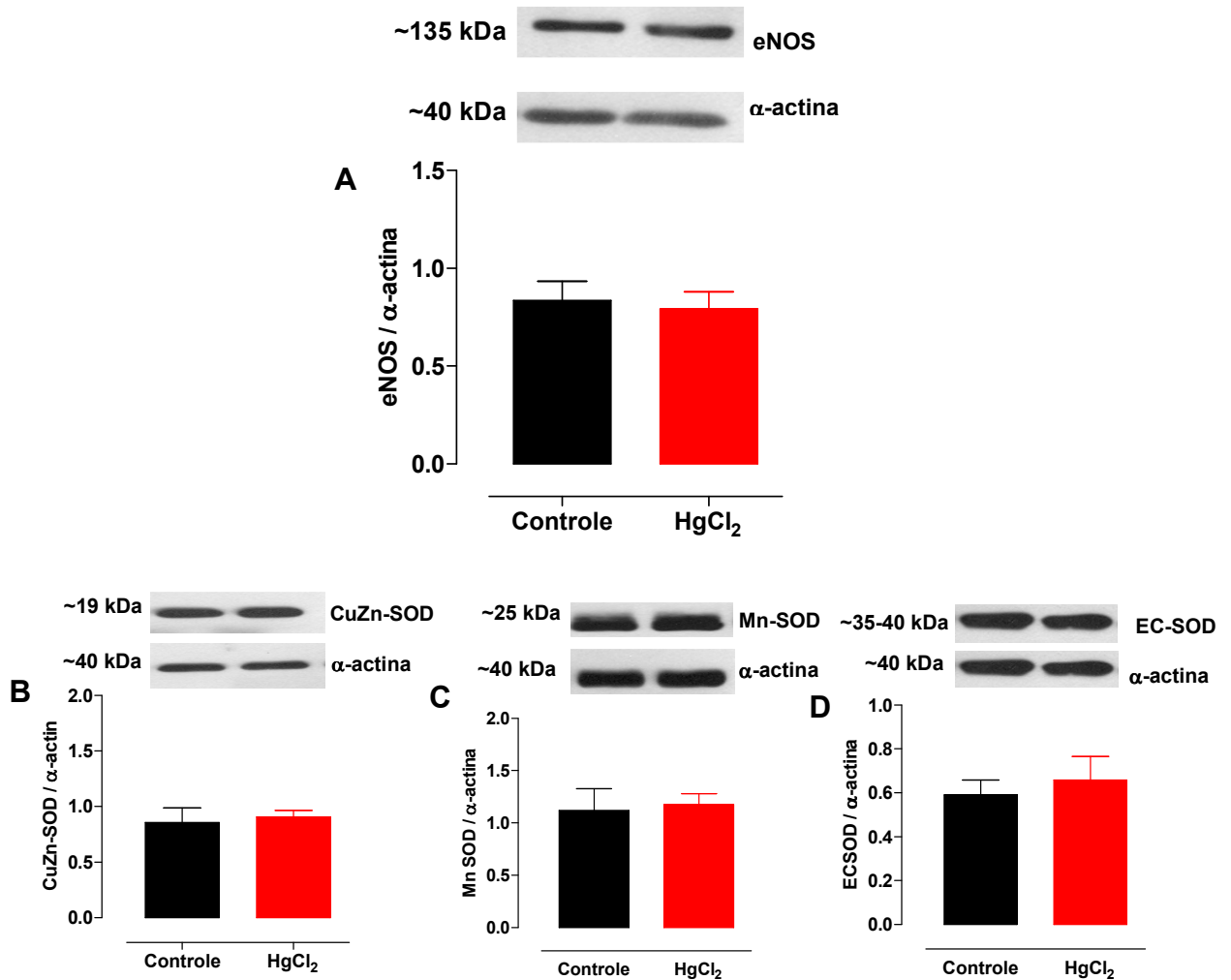


**Figura 25:** Efeito da SOD (150 U/ml) sobre a contração induzida por 5-HT em artérias basilares de ratos Controle (A) (Controle n = 12; SOD, n = 15); e  $HgCl_2$  (B), (Controle n = 5; SOD, n = 5). Em C dados comparativos das curvas Controle do grupo Controle com a do grupo  $HgCl_2$  sem e com a presença de SOD. Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA: P < 0,01.

#### 4.4.5 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e isoformas CuZn (cobre-zinco), Mn (mangânês) e EC (extracelular) da superóxido dismutase (SOD) em artérias basilares

Assim como realizado com as MRA foram detectadas, por meio de Western Blot, em artérias basilares, a presença da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), e das três isoformas da SOD nos animais dos grupos Controle e  $HgCl_2$ . Como pode ser

observado na Figura 26 o tratamento com HgCl<sub>2</sub> não alterou a expressão protéica das proteínas estudadas.



**Figura 26:** Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da eNOS (A) (Controle, n=8 e HgCl<sub>2</sub>, n=7) e das isoforma superóxido dismutase CuZn-SOD (B) (Controle, n=8 e HgCl<sub>2</sub>, n=8), da MnSOD (C) (Controle, n=8 e HgCl<sub>2</sub>, n=8) e da EC-SOD (D) (Controle, n=16 e HgCl<sub>2</sub>, n=16) de artérias basílicas de ratos Controle e HgCl<sub>2</sub>. O controle positivo utilizado foram para CuZn-SOD e Mn-SOD de extrato de tecido cerebral de rato e para EC-SOD extrato de tecido pulmonar de rato (não demonstrado). Os resultados (média  $\pm$  erro padrão da média) estão mostrados como expressão das isoformas de SOD em relação à  $\alpha$ -actina.

## ***DISCUSSÃO***

## V DISCUSSÃO

Neste estudo foi desenvolvido um modelo experimental animal de exposição crônica a baixas doses de  $\text{HgCl}_2$  que ao final de 30 dias os animais apresentavam concentrações sanguíneas semelhantes às encontradas em humanos expostos. De forma inédita, os resultados obtidos neste estudo indicam que a exposição crônica a baixas doses deste metal induz a disfunção endotelial em artérias de resistência possivelmente pelo aumento do estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO pelo aumento da produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  derivada da NADPH oxidase. Ainda, a exposição ao mercúrio induz alterações estruturais nas artérias de resistência. Dentre os principais resultados deste estudo destaca-se que a exposição crônica ao mercúrio provocou: 1) aumento da resposta vasoconstritora a fenilefrina ou serotonina e redução modulação endotelial do NO a esta resposta; 2) redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzida por ACh; 3) aumento da produção de ânion superóxido, malondialdeído plasmático e estado total antioxidante; 4) restauração da modulação endotelial do NO na resposta contrátil a fenilefrina e na vasodilatação induzida pela ACh na presença da SOD (scavenger do ânion superóxido) e da apocinina (inibidor da NADPH oxidase); 5) alteração estrutural das MRA com aumento do diâmetro das artérias e redução da espessura de suas paredes.

A EPA (*US Environmental Protection Agency's*, 1997) recomenda valor de referência de mercúrio no sangue onde à exposição é considerada sem efeito adverso de 5,8 ng/ml (*National Academy of Science*, 2000, Golpon *et al.*, 2003, Rice, 2004, Stern, 2005) e estima que cada amálgama dental libere de 3 a 17  $\mu\text{g}$  de vapor de mercúrio por dia. Em indivíduos com restauração de amálgama a concentração de mercúrio inorgânico no sangue é de cerca de 4,3 ng/ml (~16 nM) (Vamnes *et al.*, 2000). Indivíduos com mais de seis restaurações de amálgama tem em média 2,3  $\mu\text{g}$  Hg/g de tecido (Bjorkman *et al.*, 1997) e podem chegar, em alguns casos, a 380  $\mu\text{g}$  Hg/g (Frèden *et al.*, 1974). A concentração no sangue, relatada em populações não expostas, é de aproximadamente 3 ng/ml (~11 nM) (WHO, 1990) e em estudo com trabalhadores expostos ao mercúrio foi encontrada concentração sanguínea de mercúrio  $10,8 \pm 1,3$  ng/ml e de  $1,6 \pm 0,2$  ng/ml em indivíduos controles (Gupta *et al.*, 1996). Os valores séricos em residentes da província de Guizhou na China, uma

típica área contaminada foi de  $7,5 \pm 3,2$  ng/ml enquanto em indivíduos não expostos foi de  $0,91 \pm 0,3$  ng/ml (Chen *et al.*, 2005). Crianças espanholas, consumidoras de dieta rica em peixe, possuem concentração de mercúrio no cabelo três vezes maior quando comparados a crianças que não consomem peixe (1,4 ng/g vs 0,49 ng/g), concentração esta superior a recomendada pela EPA (1 ng/g) (Díez *et al.*, 2008). População adulta ribeirinha do rio Amazonas e de seus afluentes, consumidores freqüentes peixe, possuem concentração no cabelo em média de 3,7 µg/g e apresentam alterações cognitivas correlacionadas com esta exposição (Yokoo *et al.*, 2003). No presente estudo, foram injetadas baixas doses de HgCl<sub>2</sub> por 30 dias e o conteúdo encontrado foi em torno de 8 ng/ml (~29nM), o que se aproxima de concentrações encontradas em humanos expostos em larga escala. Isto serve para determinar a importância deste novo modelo experimental de exposição crônica ao mercúrio que mimetiza as condições mais comuns de intoxicação humana.

Tem sido descrito que o mercúrio pode produzir alterações no peso corporal. Estas alterações parecem ser dependentes da dose de mercúrio administrada e do tempo de administração. Assim, estudos anteriores demonstram que ratos jovens tratados com doses altas de metilmercúrio (MeHg) (5 mg/Kg/dia – via oral) por 30 dias mostraram redução no peso corporal sendo este um sinal sensível de intoxicação por mercúrio (Briggs & Oehme, 1980; Sakamoto *et al.*, 2004). Resultados similares foram observados em ratos tratados com 5 mg/kg/dia de MeHg por *gavagem* durante 35 dias (de Freitas *et al.*, 2008). No presente estudo, não houve alteração no peso corporal dos ratos tratados corroborando dados de Eide & Wesenberg (1992), que utilizando 10 a 100 µgHg/m<sup>3</sup> (4 a 11 semanas) não observaram efeito negativo no estado geral e no peso dos ratos tratados. Ainda, investigação em longo prazo, dois anos de tratamento com HgCl<sub>2</sub> por *gavagem com* altas doses (20 mg/Kg - MeHg), verificou perda de 15% do peso corporal, porém em doses menores (1, 5 e 10 mg/Kg - MeHg) não houve alteração no peso corpóreo (*National Toxicology Program*, 1993). Cabe ressaltar que só foi notada perda de peso quando realizado tratamento com altas doses de mercúrio diferente deste estudo, em que o rato foi exposto a baixas doses, o que pode ser a razão da não observação da redução ponderal.

Há décadas a toxicidade do mercúrio em altas doses é conhecida no sistema nervoso central e renal. No entanto, poucos dados, referem-se ao efeito da

exposição de baixas doses na função e estrutura vascular, bem como, sobre o comportamento da pressão arterial. O mercúrio tem sido sugerido como um fator de risco de doença cardiovascular em humanos (Houston, 2007; Virtanen *et al.*, 2007). Demonstrou-se relação entre conteúdo de mercúrio nas unhas e maior incidência e risco de infarto agudo do miocárdio (Guallar *et al.*, 2002). Ainda tem sido descrito associação entre toxicidade do mercúrio e o desenvolvimento de hipertensão arterial em humanos. Torres *et al.* (2000) descreveram que duas crianças com sintomas de hipertensão arterial apresentavam níveis de mercúrio no sangue de 24 e 42 ng/ml, também foi observado em trabalhadores de minas de mercúrio significativo aumento da pressão arterial sistólica (PAS), sendo este aumento correlacionado com peroxidação lipídica e estresse oxidativo (Boffetta *et al.*, 2001; Kobal *et al.*, 2004, García-Gomez *et al.*, 2007). Aumento da PAS também ocorre em ratos tratados cronicamente com altas doses de mercúrio (0.5 mg/kg/dia ou 200 µg/ml na água de beber por 180 dias) (Wakita, 1987, Carmignani *et al.*, 1992). E ainda, baixas concentrações (680 ng/Kg) de HgCl<sub>2</sub> administradas agudamente aumentam a PAS, PAD e frequência cardíaca de ratos sendo este mecanismo aparentemente dependente da geração de espécies reativas de oxigênio (Machado *et al.*, 2007). No entanto, no presente estudo não foi observado alteração na pressão arterial sistólica resultado este que pode ser devido às baixas concentrações e também ao tempo de exposição utilizado.

### **5.1 Efeitos do tratamento com HgCl<sub>2</sub> na estrutura dos vasos de resistência**

Artérias com diâmetro < 500µm, chamadas de artérias de resistência, tem um papel fundamental na resistência vascular total e, portanto na manutenção da homeostase pressórica (Mulvany & Aalkjaer, 1990). A resistência vascular periférica é inversamente proporcional ao raio do vaso à quarta potência e, portanto, diminuições no tamanho destas artérias, podem produzir importantes aumentos na resistência periférica e, por conseguinte da pressão arterial (Mulvany & Aalkjaer, 1990). Sabe-se que as alterações cardiovasculares, como hipertensão, cursam com mudanças estruturais nos vasos de resistência, um processo conhecido como remodelamento vascular (Schiffirin *et al.*, 1992; Mulvany, 2002; Schiffirin & Touyz, 2004; Mulvany, 2008), geralmente associado a diminuições do diâmetro vascular. O remodelamento vascular é um processo complexo que pode envolver um aumento (hipertrofia), diminuição (hipotrofia) ou rearranjo (eutrofia) do material da parede

vascular (Mulvany *et al.* 1996; Mulvany, 2002). Na literatura não existia até então nenhuma evidência experimental de que o tratamento crônico com HgCl<sub>2</sub> pudesse estar associado a alterações estruturais ou mecânicas de vasos de resistência. Por isso, neste estudo foram avaliadas as propriedades estruturais e mecânicas de artérias mesentéricas de terceira ordem de ratos Controle e tratados com HgCl<sub>2</sub>, em sistema para artérias pressurizadas, o qual representa um dos métodos atuais mais apropriados para esse tipo de estudo por sua aproximação com as condições *in vivo* (Schiffirin & Hayoz, 1997). O tratamento com mercúrio produziu uma redução da espessura da parede e na relação média: lúmen dos vasos assim como um aumento do diâmetro interno, que poderia ser consequência da diminuição da espessura da parede vascular. Estes parâmetros correspondem à definição de remodelamento hipotrófico para fora. O tipo de remodelamento em hipertensão depende do modelo de experimental estudado (Mulvany, 2008). Assim por exemplo, as artérias de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam remodelamento eutrófico (Briones *et al.*, 2003), enquanto que a hipertensão induzida pela administração de Angiotensina II pode produzir remodelamento eutrófico (Virdis *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005) ou hipertrófico (Boonen *et al.*, 1993; Neves *et al.*, 2003; de Ciuceis *et al.*, 2005).

Os mecanismos responsáveis pela diminuição da espessura da parede arterial e da área de secção transversa não foram estudados em profundidade neste estudo. Uma possibilidade que poderia explicar tais alterações seria uma diminuição das proteínas da matriz extracelular que se encontram nos espaços entre as células. Neste sentido se sabe que alterações nas proteínas da matriz extracelular podem influenciar as propriedades mecânicas que podem afetar o diâmetro luminal e consequentemente a resistência periférica e o fluxo sanguíneo (Intengan & Schiffirin, 2001). O tratamento com mercúrio não produziu mudanças nas propriedades mecânicas da parede uma vez que a relação “*stress-strain*” e seus respectivos derivados (parâmetro  $\square$ ) foram similares nas artérias de ratos controles e tratados com mercúrio. Estes resultados aparentemente sugerem que não existem mudanças nas proteínas da matriz extracelular e que, portanto, este não seria o mecanismo responsável da diminuição da espessura da parede vascular promovida pelo tratamento com mercúrio. Ainda, poderia ser que o tratamento com mercúrio afetasse de maneira diferente a principal proteína responsável pelo aumento da rigidez vascular, o colágeno e a principal proteína responsável pela elasticidade

vascular a elastina, de maneira que o efeito destas mudanças fosse um resultado da manutenção das propriedades mecânicas. Estudos adicionais são necessários para comprovar esta hipótese.

Outra possibilidade que pode explicar estes resultados reside na capacidade do mercúrio de promover peroxidação lipídica, necrose e apoptose celular mediado pelo aumento de ROS (Valko *et al.*, 2006). Estudo desenvolvido em células epiteliais de brônquio de humanos evidenciou que concentrações de mercúrio equivalentes a 8 ppm, promoveram aumento de ROS, citotoxicidade com dano ao DNA celular e ativação da caspase-3, um pró-apoptótico (Park & Park, 2007). Em órgãos como pulmões e rins observaram-se fibrose e necrose por prejuízo no sistema enzimático por compostos sulfidril-Hg<sup>2+</sup> (Asano *et al.*, 2000). No presente trabalho foi demonstrado um aumento na produção de ROS nos vasos dos animais tratados com mercúrio e se tem descrito que as ROS regulam mecanismos de apoptose por uma variedade de estímulos nas células endoteliais (Dimmerler & Zeiher, 2000) e outros tipos celulares vasculares (Irani 2000), assim pode-se sugerir que a diminuição da espessura da parede poderia ser devido mecanismos pró-apoptóticos ou necróticos induzidos pelo mercúrio. Como o tratamento com mercúrio produziu um aumento no diâmetro interno, mas não do diâmetro externo as células mais prováveis de serem acometidas pelo mercúrio são àquelas próximas a luz vascular. O mercúrio, por ter grande afinidade pelo grupo tiol prejudica a ativação de NFκB, um fator anti-apoptótico e é um dos fatores que permeiam a patogênese da toxicidade de mercúrio nas células renais (Dieguez-Acuña *et al.*, 2004). Nossos resultados sugerem, ao contrário das observações em vasos de hipertensos, onde há um aumento da espessura da parede e uma diminuição do diâmetro interno, que explica o aumento da resistência periférica, que o remodelamento promovido pela administração crônica de baixas doses de mercúrio poderia constituir, neste tipo de artérias, uma adaptação vascular que ajudaria a explicar a manutenção da pressão arterial normal.

## **5.2 Efeito do tratamento com mercúrio sobre a função vascular**

O efeito do mercúrio sobre a função vascular já tinha sido investigado por outros autores que observaram que a exposição aguda ao mercúrio induzia vasoconstrição (Evans & Weingarten, 1990; da Cunha *et al.*, 2000). No entanto, vasorelaxamento ou redução da resposta contrátil a norepinefrina tem sido descrito



em segmentos de aorta (Golpon *et al.*, 2003) após exposição aguda dos vasos ao HgCl<sub>2</sub> em concentrações superiores às utilizadas neste estudo. Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, demonstramos que a administração aguda de mercúrio induz aumento da contratilidade vascular em artéria caudal de ratos (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008). Neste trabalho, estudamos se o tratamento crônico de animais com baixas concentrações de mercúrio alterava a função de artérias mesentéricas de resistência assim como das artérias cerebrais, sendo estas últimas, por sua grande afinidade pelo tecido cerebral (Magos & Clarkson, 2006) o torna mais susceptíveis aos efeitos deletérios do mercúrio.

O tratamento com mercúrio induziu aumento da resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência e a serotonina (5-HT) em artérias basilares. O efeito do mercúrio sobre a função vascular já tinha sido investigado por outros autores que observaram que exposição aguda ao mercúrio induziu vasoconstrição (Evans & Weingarten, 1990; da Cunha *et al.*, 2000). No entanto, vasorelaxamento ou redução da resposta contrátil a noraepinefrina tem sido descrito em segmentos de aorta (Golpon *et al.*, 2003) após exposição aguda dos vasos ao HgCl<sub>2</sub> em concentrações superiores às utilizadas neste estudo. Este aumento não foi devido a um aumento na capacidade contrátil geral dos vasos uma vez que as respostas ao cloreto de potássio não foram afetadas pelo tratamento com mercúrio nem nas artérias mesentéricas nem em basilares. Sugere-se que o aumento da resposta vasoconstritora a fenilefrina encontrada após tratamento com mercúrio deve-se a redução da modulação endotelial (Dowell *et al.* 1999; Dohi *et al.*, 1996; Matsuda *et al.*, 1995), uma vez que se sabe que o endotélio, através da liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras modula o tônus vascular. Para confirmar esta hipótese foram desenvolvidos experimentos em artérias onde o endotélio foi removido mecanicamente. A eliminação do endotélio produziu um aumento das respostas vasoconstritoras à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de ratos controles indicando a participação de substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio no controle da resposta contrátil. No entanto, a eliminação do endotélio não modificou a resposta contrátil a fenilefrina nas artérias de ratos tratadas com mercúrio, sugerindo um prejuízo deste fator vasodilatador derivado do endotélio promovido pelo tratamento com mercúrio.

Entre os fatores vasodilatadores derivados do endotélio mais importantes está o óxido nítrico (NO). O NO modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas que evidencia um aumento das respostas contráteis induzidas por um bloqueador da sintase de NO (NOS) (Le Marquer-Domagala & Finet, 1997; Dowell *et al.*, 1999; Briones *et al.*, 2000; Xavier *et al.*, 2004; Budzyn *et al.*, 2008). Assim, a participação do NO neste vasos foi avaliada mediante experimento em que as artérias foram incubadas com um inibidor inespecífico da sintase do NO, o L-NAME. De forma similar com o que ocorreu com a retirada do endotélio, a incubação das artérias mesentéricas de resistência com L-NAME produziu um aumento da resposta contrátil a fenilefrina em artérias de ratos controles, mas não em artérias de ratos mercúrio. Estes resultados sugerem que o tratamento com mercúrio induz uma diminuição da disponibilidade de NO do endotélio. Resultados similares foram encontrados em artérias basilares nas quais se sabe que o NO é um fator chave no controle do tônus vascular cerebral (Briones *et al.*, 1999). Assim, o L-NAME potencializou a resposta vasoconstritora a serotonina em artérias de ratos controles, mas não em artérias de ratos tratados com mercúrio sugerindo também prejuízo do NO neste leito vascular pelo tratamento crônico com baixas doses de mercúrio.

Para comprovar se o tratamento com mercúrio alterava as respostas vasorelaxadoras dependentes de endotélio nos vasos de resistência, se realizaram curvas concentração resposta a acetilcolina. O tratamento com mercúrio induziu um prejuízo nas respostas vasodilatadoras a acetilcolina em artérias mesentéricas. De forma similar, a exposição aguda a altas concentrações de MeHg (1 a 5  $\mu$ M) diminuiu o relaxamento induzido por ACh em aorta e artéria caudal de ratos (da Cunha *et al.*, 2000; <sup>a</sup>Golpon *et al.*, 2003). Sabe-se que a resposta dilatadora a ACh neste leito vascular é parcialmente dependente de NO (Tschudi *et al.*, 1996). Portanto, uma alteração nos mecanismos de relaxamento do NO poderia estar envolvido na diminuição das respostas vasorelaxantes a ACh. No entanto, o tratamento com mercúrio não afetou o relaxamento induzido pelo doador de NO, DEA-NO. O mesmo foi também observado em segmentos de aorta expostos agudamente a HgCl<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) e que não apresentaram alteração do relaxamento induzido por trinitrato de glicerina (<sup>a</sup>Golpon *et al.*, 2003). Estes resultados demonstraram que o tratamento por 30 dias com baixas doses de HgCl<sub>2</sub> induz

disfunção endotelial e menor biodisponibilidade de NO tanto em artérias de resistência como em artérias cerebrais

Há estudos que demonstraram que *in vitro* a exposição ao HgCl<sub>2</sub> ou MeHg induz citotoxicidade nas células endoteliais (<sup>a</sup>Kishimoto *et al.*, 1995, <sup>b</sup>Golpon *et al.*, 2003; Wolf & Baynes, 2007; Mazerik *et al.*, 2007). Ainda a redução da disponibilidade de NO poder ser devido a um prejuízo da atividade da NOS. Assim, tem sido descrito que o MeHg (0,5 - 2 µM) inibe a produção de NO e a atividade da NOS em cultura de células endoteliais humanas de cordão umbilical (<sup>b</sup>Kishimoto *et al.*, 1995) e estudo de Jie *et al.* (2007) com ratos com dieta de arroz contaminado com mercúrio também não evidenciou alteração na atividade da NOS, mas observou redução de NO sérico. Em cérebro de ratos expostos ao mercúrio foi encontrada atividade reduzida da forma constitutiva da NOS provavelmente pela ação deste metal no sítio catalítico ou por união direta do metal a esta sintase (Mittal *et al.*, 1995). No presente estudo, não foram realizadas medidas da atividade da NOS, portanto não podemos descartar a redução da atividade destas isoformas como responsáveis destes efeitos observados. Uma redução da expressão protéica da NOS poderia inibir a produção de NO e participar no prejuízo da modulação endotelial mediada por NO. Está descrito que o mercúrio reduz a expressão protéica de iNOS em células β do pâncreas (Eckhardt *et al.*, 1999) e de eNOS em glomérulos de ratos expostos a HgCl<sub>2</sub> (Yanagisawa *et al.*, 1998). No entanto, encontramos aumento da expressão de eNOS em MRA de animais tratados com mercúrio comparados com animais controle. Este aumento na expressão da eNOS pode ser um mecanismo compensatório a esta redução de NO. O mesmo não ocorreu com as basilares onde não houve alteração da expressão protéica da eNOS o que sugere diferentes mecanismos de regulação da eNOS em resposta ao mercúrio nos distintos leitos vasculares. Em definitivo, podemos dizer que uma vez que em nenhum dos leitos vasculares foi observado redução da expressão de NOS, este mecanismo é pouco provável como possível responsável pela disfunção endotelial observada após tratamento com mercúrio. Outra possibilidade para explicar a diminuição na modulação endotelial pelo NO promovido pelo tratamento com mercúrio é a eliminação do NO pela sua reação com espécies reativas de oxigênio (ROS); esta possibilidade será discutida mais adiante.

Como mencionado anteriormente, as células endoteliais são importantes reguladoras do tônus vascular através da produção de vários mediadores vasodilatadores como o óxido nítrico, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF) ou vasoconstritores como endotelina, angiotensina, tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e outros prostanóides. O mercúrio parece estar associado ao aumento do ácido araquidônico (AA) e da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Kaeffer *et al.*, 2004; Sraer *et al.*, 1982). Alguns estudos apontam ainda que o mercúrio induz disfunção em células endoteliais pela ativação da PLA<sub>2</sub>, mediadas pela produção de ROS (Mazerik *et al.*, 2007; Shanker *et al.*, 2003). Estudo em leito arterial caudal evidenciou a participação dos prostanóides vasoconstritores na resposta contrátil à fenilefrina mediados pelo aumento de ROS (da Cunha *et al.*, 2000). Já outros estudos demonstram a ação inibitória do mercúrio sobre a PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> (Fujimoto *et al.*, 1986). Em determinados modelos de hipertensão se tem demonstrado um aumento na síntese de fatores endoteliais contráteis derivados de COX (Vanhoutte, 1995; Taddei *et al.*, 1997; Davidge, 2001), os quais poderiam ser responsáveis pelo prejuízo no relaxamento (Dohi *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999), assim como o incremento da vasoconstrição induzida por agonistas (Taddei & Vanhoutte, 1993). Como neste modelo experimental o mercúrio induz uma disfunção endotelial com prejuízo na produção de fatores vasodilatadores, fomos comprovar se o tratamento crônico com baixas doses de mercúrio alterava a participação dos prostanóides vasodilatadores, na resposta vasoconstritora a fenilefrina. A incubação das artérias com indometacina, um inibidor não-específico da COX e a tranilcipromina (TCP) um inibidor da síntese de prostaciclina não modificou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina nem em artérias mesentéricas de ratos controles nem nos ratos tratados com mercúrio, o que indica que a via da ciclooxigenase não parece ser a responsável pelo aumento nas respostas vasoconstritoras induzidas pelo tratamento com mercúrio. Ainda, de acordo com estes resultados funcionais, o tratamento com mercúrio não altera a expressão gênica da COX-2, a qual parece participar nas respostas vasoconstritoras a noradrenalina neste leito vascular (Briones *et al.*, 2000).

Além do óxido nítrico e das prostaglandinas derivadas da via do ácido-araquidônico-ciclooxigenase, um outro fator capaz de modular a resposta vasoconstritora induzida por estimulação alfa-adrenérgica, é o EDHF (Dora *et al.*,

2000). Em artérias de resistência, incluindo artérias mesentéricas, coronárias, hepáticas, cerebrais e renais, o EDHF parece ser o principal componente da vasodilatação dependente do endotélio (Parkington *et al.*, 1995; Brandes *et al.*, 2000; McNeish *et al.*, 2002). O EDHF realiza a hiperpolarização do músculo liso vascular através da abertura de canais para o potássio ativados por cálcio (Félètou & Vanhoutte, 1996 e <sup>a</sup>2006). A origem do EDHF ainda é desconhecida, mas se tem sugerido vários possíveis fatores como EDHF. Entre estes fatores figuram os produtos do ácido araquidônico pela via da citocromo P450, o íon potássio, o óxido nítrico de estoques intracelulares, o peróxido de hidrogênio ou mesmo o acoplamento elétrico entre as células endoteliais e musculares lisas através de junções comunicantes (*gap junctions*) (Rabelo *et al.*, 2003; Scotland *et al.*, 2005; <sup>b</sup>Félètou & Vanhoutte, 2006).

Existem evidências que sugerem interações entre estes dois fatores vasodilatadores derivados do endotélio, o NO e o EDHF. Assim, se tem sugerido que a interação entre EDHF e NO pode reduzir sua ação (Nishikawa *et al.*, 2000), pois a vasodilatação mediada pelo EDHF encontra-se aumentada em resposta ao bloqueio de óxido nítrico (Brandes *et al.*, 2000). Estes resultados sugerem que em alguns casos o EDHF pode funcionar como um sistema reserva, o qual parece estar mais ativado quando a síntese de óxido nítrico está reduzida. Entretanto, existem também evidências que o óxido nítrico e o EDHF podem agir de maneira sinérgica no controle do tônus vascular (Freitas *et al.*, 2003) ou ainda de maneira independente, em alguns leitos vasculares (Cohen *et al.*, 1997, Matoba *et al.*, 2000). No presente estudo, não avaliamos se o tratamento com mercúrio promove prejuízo no relaxamento mediado por EDHF na resposta vasodilatadora a acetilcolina. No entanto, estudamos a participação dos canais de potássio ativados por cálcio na resposta vasoconstritora a fenilefrina. Os canais de K<sup>+</sup> desempenham papel chave na regulação do potencial de repouso de membrana celular e no tônus vascular (Nelson & Quayle, 1995). Assim, a ativação dos canais de K<sup>+</sup> no músculo liso vascular leva a hiperpolarização, diminui a atividade dos canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L voltagem dependentes, reduzem o cálcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e promove vasodilatação. O bloqueador de canais de potássio ativados por cálcio, TEA, potencializou a resposta vasoconstritora a fenilefrina em artérias de ratos controles, mas não em artérias de ratos tratadas com mercúrio o que sugere uma diminuição

da participação destes canais pelo tratamento com mercúrio. Esta menor participação de um fator hiperpolarizante nas artérias dos animais tratados com mercúrio contribuiria, portanto para a maior resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina. O NO estimula GC solúvel no músculo liso e pode ativar, dependendo do tecido muscular ou espécie estudada, canais de potássio sensíveis a ATP, de larga condutância ou voltagem dependentes (Waldron & Cole, 1999). Além disso, o NO ativa canais de potássio de larga condutância ativados por cálcio (BKCa) independentemente de GMPc (Bolotina *et al.*, 1994; Waldron & Cole, 1999; Fèlétou & Vanhoutte, 2000; Paolocci *et al.*, 2001; <sup>b</sup>Fèlétou & Vanhoutte, 2006). Do que se sabe e está descrito na literatura, não há estudos que demonstrem o efeito do mercúrio sobre a participação destes canais na respostas vasoativas. Estes resultados preliminares abrem uma interessante linha de investigação para determinar os mecanismos responsáveis deste achado.

O tecido adiposo periadventício tem função parácrina na regulação do tônus vascular, liberando um fator relaxante derivado do adipócito que promove relaxamento vascular relacionados à abertura de canais de K<sup>+</sup> voltagem dependente no músculo liso vascular (Gollasch & Dubrovskaja, 2004). Em ratos hipertensos, a menor quantidade de tecido adiposo facilita a contração em artérias mesentéricas, o que pode ser atribuído a diminuição da regulação parácrina do tecido gorduroso perivascular no tônus mesentérico arterial via canais de potássio voltagem dependentes (Gálvez *et al.*, 2006) Em artérias mesentéricas também já foi demonstrado que estes canais são ativados pelo tecido adiposo promovendo vasorelaxamento (Verlohren *et al.*, 2004). Se sabe que o mercúrio pode ser depositado nos adipócitos e portanto poderia alterar sua função. Ezaki (1989) demonstrou que adipócitos expostos a 100  $\mu$ M de HgCl<sub>2</sub> possuem transporte de glicose estimulado. Barnes *et al.* (2003) observaram que o HgCl<sub>2</sub> (1 a 10  $\mu$ M) altera o transporte de glicose, inibe a adipogênese e contribui para a resistência a insulina. Por isso, testamos se o tratamento com mercúrio poderia afetar a participação do tecido adiposo perivascular sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência. A presença de gordura perivascular produziu uma diminuição da resposta vasoconstritora a fenilefrina em artérias de ratas controles e tratadas com mercúrio sugerindo a liberação de fatores de natureza relaxante deste tecido. Esta inibição foi similar em artérias de ambos

grupos o que indica que o tratamento com mercúrio não afeta a participação de substâncias vasodilatadoras liberadas pelo tecido periadventício.

A angiotensina II pode ser uma das vias de ação vascular do mercúrio. Chávez, *et al.*, (1990), mostraram que a inibição da ECA, pelo captopril, inibiu o efeito do mercúrio em mitocôndria de rim. Carmignani *et al.* (1992) evidenciaram que mercúrio inorgânico diminuía a renina plasmática e aumentava a atividade da ECA. Outros estudos também demonstram que o mercúrio aumenta a renina plasmática (Kozma *et al.*, 1996). Em vaso, estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstram que em artérias caudais de ratos a administração aguda de 20 nM de mercúrio produziu um aumento da atividade da enzima conversora da angiotensina (Wiggers *et al.* 2008). Uma vez que é bem conhecido que a angiotensina II modula o tônus vascular (Ceravolo *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2008), investigamos a possibilidade da Angiotensina II constituir um possível mediador da hiperreatividade à fenilefrina em nosso modelo experimental de exposição crônica a baixas doses de mercúrio. Para isso, as artérias mesentéricas foram incubadas com captopril, um inibidor da ECA e losartan, antagonista de receptor AT<sub>1</sub>. No entanto, nenhum dos fármacos alterou a resposta vascular a fenilefrina, o que a princípio parece excluir a angiotensina II como mediadora dos efeitos do mercúrio nestas artérias. No entanto, para descartar totalmente a participação do sistema renina angiotensina e as alterações vasculares induzidas por mercúrio, seria necessário realizar tratamentos concomitantes de mercúrio e de fármacos bloqueantes deste sistema, uma vez que as artérias quando extraídas do animal podem ter seus níveis de angiotensina II local, não aumentados, apesar de uma possível hiperativação deste sistema de forma sistêmica.

### **5.3 Efeito do tratamento com mercúrio no estresse oxidativo plasmático e vascular**

O endotélio é capaz de liberar espécies reativas de oxigênio o que tem sido amplamente estudado nos últimos anos. É bem sabido que as espécies reativas de oxigênio (ROS) tem papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Lyle & Griendling, 2006; Paravicini & Touyz, 2008). Assim, se tem demonstrado que fisiologicamente ROS está implicado na regulação no tônus vascular não somente de forma direta pela modulação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, mas também indiretamente pela diminuição da

biodisponibilidade de NO pelo ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) para formação de peróxido de nitrito ( $ONOO^{\bullet-}$ ) (Lyle & Griending, 2006; Paravicini & Touyz, 2008).

O  $O_2^{\bullet-}$  é formado pela redução da molécula de oxigênio que é rapidamente convertida em  $H_2O_2$  pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) e fica restrito ao seu local de produção por sua baixa permeabilidade na membrana, já o  $H_2O_2$  é mais difusível e exerce seus efeitos em longas distâncias (Ardanaz & Pagano 2006; Paravicini & Touyz 2008). O  $O_2^{\bullet-}$  pode reagir com o NO mais rapidamente do que com a SOD e quando há aumento destas espécies reativas ( $O_2^{\bullet-}$  e NO) pode-se formar  $ONOO^{\bullet-}$ , causando disfunção endotelial (Paravicini & Touyz 2008). As isoformas de SOD são a cobre-zinco (CuZnSOD), encontrada no citosol e núcleo de todos os tipos celulares, a manganês (MnSOD) no citoplasma e a extracelular (ECSOD) no fluido extracelular, especialmente com esta última, são as principais reguladoras da biodisponibilidade do NO derivado do endotélio (McIntyre *et al.*, 1999). Os níveis destes radicais livres são dependentes não só de sua formação, mas também da ação de mecanismos antioxidantes. Em particular, as isoformas da SOD são o pivô na regulação dos níveis de  $O_2^{\bullet-}$ , enquanto a glutathiona peroxidase e a catalase são os maiores antioxidantes envolvidos na degradação de  $H_2O_2$ . Alterações neste sistema, que deve ser mantido em equilíbrio, podem ocorrer pela ação de agentes agressores como o mercúrio, que pode exercer efeitos na função celular pela alteração de reguladores fisiopatológicos de cascatas intracelulares (Ray & Shan, 2005).

Nos vasos existem diversas fontes de ROS. As fontes mais comuns de ROS são as derivadas das xantinas oxidases, cadeia mitocondrial, NADPH oxidases, lipoxigenases, P-450 e COX.

A xantino oxireductase (XOR) é uma enzima que participa dos últimos passos da catalise do metabolismo de purina, a transformação de hipoxantina e xantina em ácido úrico, gera superóxidos e seus produtos. Existem duas formas de XOR, a xantina dehidrogenase (XDH) e xantina oxidase (XO). XDH é convertida em XO pela oxidação reversível do grupo sulfidril, e a XO é um importante fonte de superóxidos/ $H_2O_2$  e esta transformação está presente em casos de processo inflamatório e isquemia/reperfusão (Szasz *et al.*, 2007). A cadeia respiratória mitocondrial que é a principal fonte celular de energia. Cataliza transferência de



elétrons utilizando mais de 80 peptídeos em quatro complexos e despende cerca de 1 a 2% da perda de elétrons para gerar superóxidos (St-Pierre *et al.*, 2002).

Existem várias evidências que demonstram o papel das ROS na modulação da expressão de COX-2. Observou-se indução de COX-2 mediada por ROS em células mesangiais (Tetsuka *et al.*, 1996) e em células endoteliais humanas (Cosentino *et al.*, 2003).

Além das fontes enzimáticas de geração de ROS, outra possibilidade reside na própria sintase de NO (NOS) que por um desacoplamento, especialmente pela deficiência de co-fator essencial tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) pode ser a causa de aumentada produção de radicais livres (Stroes *et al.*, 1998). Uma vez oxidada, a BH<sub>4</sub>, é inativada e conseqüentemente a NOS é mantida desacoplada levando a uma maior produção de ânion superóxido (da Luz *et al.*, 2003). Quando isto ocorre, eNOS torna-se grande fonte de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

Entre as maiores fontes de ROS na parede vascular está a NAD(P)H oxidase (Lassègue *et al.*, 2003; Lee & Griendling, 2008). NAD(P)H oxidases são uma família de enzimas em que cada membro pode ser distinguido por uma subunidade catalítica específica de NOX. Até hoje, foram identificadas 7 isoformas de NOX em mamíferos (NOX-1 – NOX-7) (Sumimoto, 2008), os quais muitas delas estão presentes na parede vascular (Cave *et al.*, 2006; Brandes & Schröder, 2008). A NADPHoxidase, presente nas células endoteliais e musculares lisas, quando ativa sua subunidade catalítica contendo flavina funciona como um transportador de elétrons que é transferido a molécula de oxigênio resultando na geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, o que a torna uma grande fonte de radicais livres de oxigênio. O significado funcional das isoformas de NOX no músculo liso vascular ainda não é claro, e tem sido sugerido que parece desempenhar diferentes papéis na modulação intracelular da sinalização mediada por ROS. Por exemplo, NOX4 parece ser importante na manutenção do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> basal (Ellmark *et al.*, 2006; Brandes & Schröder, 2008) enquanto NOX1 parece ser responsável pela produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e pela sinalização redox após estimulação e em condições patológicas como aterosclerose, diabetes e hipertensão (Chose *et al.*, 2008). Muitos fatores têm sido implicados na regulação da atividade da NADPH oxidase na doença vascular, incluindo fatores físicos (fluxo, pressão, distensão), agentes vasoativos (Ang II, ET-1 e aldosterona) e fatores de crescimento (Ray & Shan, 2005; Paravicini & Touyz, 2008).

Em animais e humanos expostos ao mercúrio a toxicidade por mercúrio é associada ao estresse oxidativo *in vivo*, em animais e humanos expostos ao mercúrio por promover a geração de espécies reativas de oxigênio com subsequente dano oxidativo em vários órgãos e sistemas e por alterar as defesas antioxidantes celulares (Mahboob *et al.*, 2001, Reus *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 1996, Miller & Woods 1993, Chen *et al.*, 2005; Shanker *et al.*, 2004; Bando *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2008). Quando os níveis de  $O_2^{\bullet-}$  estão aumentados, o mercúrio, teoricamente, também pode agir como catalítico na reação de Fenton, no lugar do ferro ( $Fe^{+2}$ ) resultando na formação de radicais livres hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) podendo interferir na função mitocondrial (Virtanen *et al.*, 2007; Wolin, 2000). Baseando-se nestas informações, fomos comprovar se nosso modelo experimental de tratamento crônico com baixas doses de mercúrio estava associado a um aumento do estresse oxidativo. Os radicais livres reagem com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e, portanto um bom indicador de peroxidação lipídica. Neste estudo encontramos aumento do MDA plasmático, o que indica que o tratamento com mercúrio induz estresse oxidativo. Níveis elevados de MDA em urina também foram encontrados em trabalhadores em minas expostos por longo tempo ao mercúrio (Kobal *et al.*, 2004), e em ratos tratados com dieta contaminada (Jie *et al.*, 2007). Também foi encontrado aumento do estresse oxidativo com consequente aumento de MDA em rim, fígado, cérebro e cerebelo de ratos tratados por *gavagem* com 2 mg/Kg de MeHg (de Freitas *et al.*, 2008).

Como mencionado anteriormente, o aumento na produção de ROS poderia ser devido a uma diminuição nos mecanismos antioxidantes. Ao analisarmos o estado plasmático antioxidante neste modelo experimental de ratos expostos cronicamente a baixas doses de cloreto de mercúrio foi notado que o mesmo encontra-se aumentado. Estes resultados estão de acordo com os de Chen *et al.* (2005), que reportaram aumento na atividade sérica de enzima antioxidante, a glutathiona peroxidase, e também da SOD em indivíduos expostos ao mercúrio. De forma similar, uma correlação positiva entre atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) e conteúdo de mercúrio nos rins (Girardi & Elias, 1995) e aumento da atividade enzimática e níveis de proteínas hepáticas antioxidantes (Bando *et al.*,

2005) têm sido reportados em ratos tratados com mercúrio. Por outro lado, Wolf & Baynes (2007) descreveram que em células endoteliais de artéria pulmonar de bovinos a exposição a altas concentrações de mercúrio (maiores que 3-5 mM) induziram a depleção de GSH e inibição da atividade da enzima tiol do tipo glicose-6-fosfato dehidrogenase (G6PDH) e gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH) enquanto baixas concentrações (< 1-2  $\mu$ M) induziram aumento na GSH e da atividade enzimática tiol. De forma importante, em humanos expostos ao mercúrio o aumento da atividade antioxidante seja por meio das SODs, catalase ou glutathiona peroxidase podem ser considerados biomarcadores de estresse oxidativo provocado pela exposição ao mercúrio (Perrin-Nadif *et al.*, 1996; Bélanger *et al.*, 2008). Nossos resultados, portanto parecem excluir a diminuição de mecanismos antioxidantes como responsáveis do aumento de estresse oxidativo induzido pelo mercúrio. Ainda, podemos sugerir que mecanismos antioxidantes possam ser ativados em ratos expostos ao mercúrio para proteger as células contra o aumento das espécies reativas de oxigênio.

Além de aumentar os níveis plasmáticos de MDA, o tratamento com mercúrio induziu um aumento na produção local de  $O_2^{\bullet-}$  nas três camadas vasculares, endotélio, músculo liso e células adventícias, das artérias mesentéricas de resistência. Avaliamos a continuação, se este aumento poderia ser devido a uma maior expressão da maior produtora de  $O_2^{\bullet-}$  a nível vascular, a NADPH oxidase. O tratamento com mercúrio produziu um ligeiro aumento na expressão gênica da NOX-1 nas artérias mesentéricas de resistência, ainda que este incremento não alcançasse diferença estatisticamente significativa. Não podemos descartar, portanto, que o mercúrio esteja produzindo maior quantidade de  $O_2^{\bullet-}$  por ativação da enzima ao invés da modulação de sua expressão. Ainda, o aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$  não parece estar relacionado com a redução de enzimas detoxificantes uma vez que a expressão das 3 isoformas da SOD foi similar em artérias mesentéricas de ratos controles e tratados com mercúrio. Estes resultados concordam com os obtidos por outros investigadores que demonstraram que indivíduos expostos cronicamente ao mercúrio também não evidenciaram aumento da CuZn SOD, somente observaram aumento na atividade da enzima detoxificante catalase e glutathiona peroxidase não investigadas neste estudo (Kobal *et al.*, 2004; Barregard *et al.*, 1990; Björkman *et al.*, 1993). No entanto, em ratos tratados com 0,1 mg/Kg de  $HgCl_2$

evidenciaram aumento da MnSOD e de CuZnSOD e seu decréscimo quando a dose foi aumentada (Bando *et al.*, 2005). A atividade da MnSOD também foi encontrada aumentada em rins de ratos tratados agudamente com mercúrio (Shimojo *et al.*, 2002).

Como mencionado anteriormente, o tratamento com mercúrio produziu uma diminuição da modulação endotelial mediada NO nas respostas vasoconstritoras a fenilefrina ou serotonina. O NO pode reagir com as ROS promovendo assim diminuição dos níveis de NO. Esta reação pode ter uma conseqüência funcional vascular. Assim, os ânions superóxido podem causar a degradação do óxido nítrico resultando na potencialização das respostas vasoconstritoras (da Cunha *et al.*, 2000). Além disso, a associação entre aumento de produção de  $O_2^{\bullet-}$  com o prejuízo do relaxamento dependente do endotélio e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial, já está descrita na literatura (Touyz, 2004; Fèlétou & Vanhoutte, 2006). A incubação de artérias basilares com SOD diminuiu a resposta vasoconstritora a serotonina somente em artérias de animais tratados com mercúrio indicando a participação de  $O_2^{\bullet-}$  no aumento desta resposta neste leito vascular. De acordo com estes resultados, estudo prévio em leito vascular caudal demonstrou a reversão do aumento da resposta contrátil à fenilefrina promovida pelo mercúrio administrado agudamente com incubação de tempol (Wiggers *et al.*, 2008). No entanto, curiosamente, nem a SOD nem outros varredores de ROS como tiron ou tempol afetaram as respostas contráteis a fenilefrina em artérias de ratos tratadas com mercúrio. As razões da falta de efeito destes fármacos sobre a resposta a fenilefrina em artérias tratadas com mercúrio não estão claros e necessitam mais estudos. Não obstante, e o que é mais importante, a incubação das artérias mesentéricas com SOD restaurou o efeito potencializador do L-NAME em resposta a fenilefrina nas artérias dos animais tratados com mercúrio indicando aumento de biodisponibilidade do NO devido à eliminação de  $O_2^{\bullet-}$ . Ainda, a redução do relaxamento dependente do endotélio induzida por mercúrio em artérias mesentéricas foi restaurada por SOD o que indica que dita disfunção endotelial também parece estar associada ao aumento de  $O_2^{\bullet-}$ . Por outra parte, a incubação das artérias com TEA e SOD não produziu uma recuperação do efeito potencializador induzido por TEA nas respostas a fenilefrina em artérias de animais tratados o que exclui, portanto, que a menor disponibilidade de NO seja a responsável pela menor

participação de canais de potássio na resposta a fenilefrina promovida pelo tratamento com mercúrio.

Como mencionado anteriormente, a NADPH oxidase é uma importante fonte de ânion superóxido a nível vascular e o aumento na atividade desta enzima é associado com disfunção endotelial (Soccio *et al.*, 2005; Paravicini & Touyz, 2006; Vaziri & Rodríguez-Iturbe, 2006). A apocinina, um inibidor da NAD(P)H oxidase, restaurou o prejuízo da resposta a acetilcolina observado em MRA de ratos tratados com mercúrio o que sugere a participação da NADPH oxidase na produção de  $O_2^{\bullet-}$  induzida por mercúrio. Resultados semelhantes foram vistos em artérias basilares de cachorro (Tosaka *et al.*, 2002). Ainda, a adição exógena da enzima detoxificante de  $H_2O_2$ , catalase, também melhorou a resposta vasodilatadora a acetilcolina em artérias de animais tratados com mercúrio indicando a participação do  $H_2O_2$  em dita resposta. Neste sentido nosso grupo descreveu que em artérias mesentéricas de resistência de rato, o  $H_2O_2$  induz respostas vasoconstritoras e produz liberação de  $O_2^{\bullet-}$  através da ativação da NADPH oxidase (García-Redondo *et al.*, 2008).

Em conclusão, no presente trabalho desenvolvemos um modelo experimental de ratos tratados com baixas doses de mercúrio durante tempo prolongado com concentração de mercúrio no sangue em níveis similares a encontradas em profissionais expostos. Estas concentrações de mercúrio afetam a estrutura dos vasos de resistência e induzem alteração na reatividade vascular em artérias de resistência mesentéricas e cerebrais com aumento da resposta vasoconstritora, redução da modulação endotelial pelo NO e redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Estas alterações da função vascular parecem ser promovidas pela redução da biodisponibilidade do NO pelo aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$  derivada da NADPH oxidase. Nossos resultados demonstram que o aumento da expressão da principal enzima sintetizadora de NO assim como do estado antioxidante são mecanismos que tentam compensar o aumento na produção de ROS e a diminuição de NO.

## PERSPECTIVAS

O tratamento com mercúrio a baixas doses por tempos prolongados induz estresse oxidativo e alterações das respostas vasculares mediadas pelo aumento deste estresse oxidativo. Estes achados têm especial importância, pois os níveis de mercúrio estudados são semelhantes aos encontrados na população exposta atualmente em muitos casos. Antioxidantes e *scavengers* de radicais livres, como selênio e seus derivados, vitamina E, C, cisteína, dentre outros, podem proteger contra os efeitos do mercúrio (Park *et al.*, 1996; Ganther, 1980, de Freitas *et al.*, 2008). Portanto, estudos dirigidos para avaliar o efeito da administração de antioxidantes, concomitantemente com mercúrio, serão de grande utilidade para melhor conhecimento dos mecanismos implicados nos efeitos prejudiciais do mercúrio sobre a função vascular.

A exposição ambiental do homem a vários tipos de metais inclusive o mercúrio ser mais comum do que se espera e tem conseqüências para a saúde, ainda não elucidadas. O presente estudo mostrou que exposição a baixas doses de mercúrio tem efeito deletério importante na função vascular pela redução da biodisponibilidade do NO. Este impacto pode ser comparado aos produzidos pelos fatores tradicionais de risco cardiovascular como hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia. Portanto, o mercúrio pode ser considerado um importante fator de risco para doença cardiovascular que pode participar do desenvolvimento de eventos cardiovasculares. Se estes efeitos aumentam as conseqüências dos tradicionais fatores de risco ou se desempenham papel primário nestes pacientes com baixo risco cardiovascular, precisam ser melhor investigados.

## ***CONCLUSÕES***

## **VI CONCLUSÕES**

- O tratamento com injeções intramusculares por 30 dias de cloreto de mercúrio é útil como modelo crônico experimental de baixas concentrações de mercúrio semelhantes às encontradas na população geral;
- Este tipo de tratamento afeta a estrutura dos vasos de resistência e induzem alteração na reatividade vascular em artérias de resistência mesentéricas e cerebrais com aumento da resposta vasoconstritora, redução da modulação endotelial pelo NO e redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio;
- Estas alterações da função vascular parecem ser promovidas pela redução da biodisponibilidade do NO pelo aumento da produção de  $O_2^-$  derivada da NADPH oxidase;
- Este tratamento ainda dispara mecanismos compensatórios para contrabalancear o aumento na produção de ROS e a diminuição de NO. Estes mecanismos são o aumento da expressão da principal enzima sintetizadora de NO assim como do estado antioxidante;
- A intoxicação com baixas doses de mercúrio pode promover alterações vasculares comparadas àquelas produzidas pelos fatores de risco cardiovascular tradicionais. Portanto, o mercúrio pode ser considerado um importante fator de risco para doença cardiovascular e pode participar do desenvolvimento de eventos cardiovasculares.



## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## **VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adeagbo ASO, Trigle CR. Varying extracellular  $[K^+]$ : a functional approach to separating EDHF and EDNO related mechanisms in perfused mesenteric arterial bed. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1993; 21:423-29.
- Adeagbo ASO, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens*. 2005. 23:1025-36.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for mercury. Washington (DC): ATSDR, Public Health Service, US Department of health and human services: 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pediatric/appendixb.html> (Acesso: 10/09/2007).
- Ahlqwist M, Bengtsson C, Lapidus L, Gergdahl IA, Schütz A. Serum mercury concentration in relation to survival, symptoms, and diseases: results from the prospective population study of women in Gothenburg, Sweden. *Acta Odontol Scand*. 1999; 57(3):168-74.
- American Dental Association. ADA statement on dental amalgam. 2003.
- Appleton JD, Williams TM, Breward N, Apostol A, Miguel J, Miranda C. Mercury contamination associated with artisanal gold mining on the island of Mindanao, the Philippines. *Sci Total Environ*. 1999; 228(2-3):95-109.
- Ardanaz N and Pagano PJ (2006) Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 237-251.
- Asano S, Eto K, Kurisaki E, Gunji H, Hiraiwa K, Sato M, Sato H, Hasuike M, Hagiwara N, Wakasa H. Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathol Int*. 2000; 50(3):169-74.
- Asari M, Fukui K, Sakai S. Life-cycle flow of mercury and recycling scenario of fluorescent lamps in Japan. *Sci Total Environ*. 2008; 393(1):1-10.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JBT. Metallothioneins: mercury species-specific induction and their potential role in attenuating neurotoxicity. *Exp. Biol. Med*. 2006; 231:1468-73.
- Ashe WF, Largent EJ, Dutra FR, Hubbard DM, Blackstone M. Behavior of mercury in the animal organism following inhalation. *A M A Arch Ind Hyg Occup Med*. 1953; 7(1):19-43.

- Augusti PR, Conterato GM, Somacal S, Einsfeld L, Ramos AT, Hosomi FY, Graça DL, Emanuelli T. Effect of lycopene on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007; 100(6):398-402.
- Augusti PR, Conterato GM, Somacal S, Sobieski R, Spohr PR, Torres JV, Charão MF, Moro AM, Rocha MP, Garcia SC, Emanuelli T. Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(1):212-9.
- Azevedo, F. A de. *Toxicologia do Mercúrio*. São Carlos: RiMa, 2003.
- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004; 16:42-49.
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med*. 2001. 79:76-102.
- Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*. 1973; 181(96):230-41.
- Ballatori N, Clarkson TW. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam Appl Toxicol*. 1985; 5(5):816-31.
- Bando I, Reus MI, Andrés D, Cascales M. Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. *J Biochem Mol Toxicol*. 2005; 19(3):154-61.
- Barnes DM, Hanlon PR, Kircher EA. Effects of inorganic HgCl<sub>2</sub> on adipogenesis. *Toxicological Sciences*. 2003; 75:368-77.
- Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 2):H1283-9
- Barregård L, Thomassen Y, Schütz A, Marklund SL. Levels of selenium and antioxidative enzymes following occupational exposure to inorganic mercury. *Sci Total Environ*. 1990; 99(1-2):37-47
- Basu N, Scheuhammer Am, Evans RD, O'Brien M, Chan HM. Cholinesterase and monoamine oxidase activity in relation to mercury levels in cerebral cortex of wild river otters. *Human & Experimental Toxicology*. 2007; 26:213-20.
- Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension*. 1989 Jun;13(6 Pt 2):968-72.
- Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of National Academy Science USA*. 1990; 87:1620-1624.

- Bélanger MC, Mirault ME, Dewailly E, Plante M, Berthiaume L, Noël M, Julien P. Seasonal mercury exposure and oxidant-antioxidant status of James Bay sport fishermen. *Metabolism*. 2008; 57(5):630-6
- Berlin M. Risk of methylmercury cumulation in man with refernce to consumption of fish contaminated with methylmercury. *Nippon Ishikai Zasshi*. 1969; 61(9):1047-50.
- Berlin M. Mercury in dental-filling materials – an updated risk analysis in environmental medical terms. The dental Material Commission. Kv.Spectren, SE-103, 33 Stockholm, Sweden, 2003.
- Berlin, M. Mercury. In: Friberg, L; Nordberg, GF; Voulk, V. ed. Handbook on the toxicology of metals, 2<sup>nd</sup>, Amsterdam. Elsevier Science Publisher. 1986; 387-45.
- Björkman L, Langworth S, Lind B, Elinder CG, Nordberg M. Activity of antioxidative enzymes in erythrocytes and concentration of selenium in plasma related to mercury exposure. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*. 1993;7(3):157-64.
- Björkman L, Sandborgh-Englund G, Ekstrand J. Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;144(1):156-62.
- Bluhm RE, Bobbitt RG, Welch LW, Wood AJ, Bonfiglio JF, Sarzen C, Heath AJ, Branch RA. Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers. Part I: History, neuropsychological findings and chelator effects. *Hum Exp Toxicol*. 1992; 11(3):201-10.
- Boffetta P, Sällsten G, Garcia-Gómez M, Pompe-Kirn V, Zaridze D, Bulbulyan M, Caballero JD, Ceccarelli F, Kopal AB, Merler E. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med*. 2001 Jul;58(7):461-6.
- Boldrini, CV, Padua HB, Pereira DN, Resende EK de, Juras AA. Contaminação por mercúrio nos rios Miji-Guaçu e Pardo (SP).1983; v. 135, p. 106-17.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368:850-3.
- Boonen HC, Daemen MJ, Eerdmans PH, Fazzi GE, van Kleef EM, Schiffers PM, De Mey JG. Mesenteric small artery changes after vasoconstrictor infusion in young rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22(3):388-95.
- Brandão R, Santos FW, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. DMPS and N-acetylcysteine induced renal toxicity in mice exposed to mercury. *Biometals*. 2006; 19(4):389-98.

- Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res.* 2005. 65:16-27.
- Brandes RP, Schröder K. Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends Cardiovasc Med.* 2008; 18:15-19.
- Brandes, R.P.; Schmitz-Winnenthal, F.H.; Feletou, M.; Godecke, A.; Hunag, P.L.; Vanhoutte, P.M.; Fleming, I.; Busse, R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proceedings of National Academy Science USA* 2000.97:9747-52.
- Bridges CC, Battle JR, Zalups RK. Transport of thiol-conjugates of inorganic mercury in human retinal pigment epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 221(2):251-60.
- Briggs GB, Oehme FW. Toxicology. In: *Laboratory Rat* (HJ Baker, JR Lindsey e SH Weisbrogh) vol. 2, 104-18. Academic Press, New York, 1980.
- Briones AM, Alonso MJ, Marin J, Balfagon G and Salaices M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 2000; 131:185-94.
- Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2005; 25(4):155-62.
- Briones, A.M.; Gonzalez, J.M.; Somoza, B.; Giraldo, J.; Daly, C.J.; Vila, E.; Gonzalez, M.C.; McGrath, J.C.; Arribas, S.M.. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *Journal of Physiology.* 2003; 552:185-95.
- Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Salaices M. Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1999;126(1):111-20.
- British Dental Health Foundation. Policy statement - dental amalgam. 2003.
- Brodkin E, Copes R, Mattman A, Kennedy J, Kling R, Yassi A. Lead and mercury exposures: interpretation and action. *CMAJ.* 2007 Jan 2; 176(1):59-63.
- Budzyn K, Ravi RM, Miller AA and Sobey CG (2008) Mechanisms of augmented vasoconstriction induced by 5-hydroxytryptamine in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 155:210-216.

- Buñag RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol*. 1973; 34(2):279-82.
- Cannon VT, Barfuss DW, Zalups RK. Molecular homology and the luminal transport of Hg<sup>2+</sup> in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11(3):394-402.
- Carmignani M, Boscolo P, Artese L, Del Rosso G, Porcelli G, Felaco M, Volpe AR, Giuliano G. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats. *Br J Ind Med*. 1992; 49(4):226-32.
- Carmignani M, Boscoso P, Preziosi P. Renal ultrastructural alterations and cardiovascular functional changes in rats exposed to mercury chloride. 1989; 13:353-56.
- Carmignani M, Finelli VN, Boscolo P. Mechanisms in cardiovascular regulation following chronic exposure of male rats to inorganic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1983; 69(3):442-50.
- Carranza-Rosales P, Said-Fernández S, Sepúlveda-Saavedra J, Cruz-Vega DE, Gandolfi AJ. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology*. 2005; 210(2-3):111-21.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*. 2000; 184(3):409-20.
- Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8:691-728.
- Ceravolo GS, Fernandes L, Munhoz CD, Fernandes DC, Tostes RC, Laurindo FR, Scavone C, Fortes ZB, Carvalho MH. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension*. 2007; 50(4):756-61.
- Chanez C, Flexor MA, Bourre JM. Effect of organic and inorganic mercuric salts on Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase in different cerebral fractions in control and intrauterine growth-retarded rats: alterations induced by serotonin. *Neurotoxicology*. 1989; 10(4):699-706.
- Chávez E, Zazueta C, Díaz E, Holquín JA. Characterization by Hg<sup>2+</sup> of two different pathways for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> release. *Biochim Biophys Acta*. 1989; 986(1):27-32.
- Chen C, Qu L, Li B, Xing L, Jia G, Wang T, Gao Y, Zhang P, Li M, Chen W, Chai Z. 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(4):759-67.

Chose O, Sansilvestri-Morel P, Badier-Commander C, Bernhardt F, Fabiani JN, Rupin A, Verbeuren TJ. Distinct role of nox1, nox2, and p47phox in unstimulated versus angiotensin II-induced NADPH oxidase activity in human venous smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 51:131-136.

Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol.* 2008.

Cherian MG, Hursh JB, Clarkson TW, Allen J. Radioactive mercury distribution in biological fluids and excretion in human subjects after inhalation of mercury vapor. *Arch Environ Health.* 1978; 33(3):109-14.

Chose O, Sansilvestri-Morel P, Badier-Commander C, Bernhardt F, Fabiani JN, Rupin A, Verbeuren TJ. Distinct role of nox1, nox2, and p47phox in unstimulated versus angiotensin II-induced NADPH oxidase activity in human venous smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 51:131-136.

Christensen KL, Mulvany MJ. Location of resistance arteries. *J Vasc Res.* 2001; 38(1):1-12.

Clarkson TW. The biological properties and distribution of mercury. *Biochem J.* 1972; 130(2):61P-63P.

Clarkson TW. Molecular and ionic Mimicry of Toxic Metals. *Annu, Research Pharmacol. Toxicol.* 1993; 32:545-71.

Clarkson TW. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect.* 2002; 110 (Suppl 1): 11-23.

Clarkson TW. Metal toxicity in Central Nervous System. *Enviro. Health Persp.* 1987: 75:59-64.

Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med.* 2003; 349(18):1731-7.

Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med.* 2007; 50(10):757-64.

Cohen, R.A.; Plane, F.; Najibi, S.; Huk, I.; Malinsk, T.; Garland, C.J. (1997). Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery. *Proceedings of National Academy Science USA*, 94:4193-98.

Cosentino F, Eto M, De Paolis P, Van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in

- human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 2003. 25:1017-23.
- da Cunha, V.; Rossoni, L.V.; Oliveira, P.A.; Poton, S.; Pretti, S.C.; Vassallo, D.V.; Stefanon, I. Cyclooxygenase inhibitor reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rat. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2000; 22: 203-215.
- da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu, 2003.
- Danscher G, Hørsted-Bindslev P, Rungby J. Traces of mercury in organs from primates with amalgam fillings. *Exp Mol Pathol*. 1990; 52(3):291-9.
- Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res*. 2001. 89(8):650-660.
- Davidson PW, Myers GJ, Weiss B. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics*. 2004; 113(4 Suppl):1023-9.
- Davidson PW, Myers GJ, Weiss B, Shamlaye CF, Cox C. Prenatal methyl mercury exposure from fish consumption and child development: a review of evidence and perspectives from the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology*. 2006; 27(6):1106-9.
- Day JJ, Reed MN, Newland C. Neuromotor deficits and mercury concentrations in rats exposed to methyl mercury and fish oil. *Neurol and Teratol*. 2005; 27:629-41.
- de Assis GP, Silva CE, Stefanon I, Vassallo DV. 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.
- de Campos EBP, Yoshida WB. P papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia reperfusão em retalhos cutâneos: modelo experimental e estratégias de tratamento. *J Vasc Br*. 2004; 3(4):357-66.
- de Freitas, Funk VR, Rotta MS, Bohrer D, Morschbacher V, Puntel RL, Nogueira CW, Farina M, Aschner M, Rocha JBT. Diphenyl Diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Research Bulletin*. 2008.
- de Wit C, Bolz SS, Pohl U. Interaction of endothelial autacoids in microvascular control. *Kardiology*. 2000; 89(suppl 9):IX/113-16.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2000; 18:655-673.



- Dieguez-Acuña FJ, Polk WW, Ellis ME, Simmonds PL, Kushleika JV, Woods JS. Nuclear factor kappaB activity determines the sensitivity of kidney epithelial cells to apoptosis: implications for mercury-induced renal failure. *Toxicol Sci.* 2004; 82(1):114-23.
- Díez S, Delgado S, Aguilera I, Astray J, Pérez-Gómez B, Torrent M, Sunyer J, Bayona JM. Prenatal and Early Childhood Exposure to Mercury and Methylmercury in Spain, a High-Fish-Consumer Country. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2008.
- Dimmerler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensina II and pro-atherosclerotic factors. *Regul. Pept.* 2000; 90:19-25.
- Dobrin PB. Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev.* 1978; 58(2):397-460.
- Dohi Y, Kojima M, Sato K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension.* 1996; 28:732-37.
- Domingo JL. Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review. *J Toxicol Environ Health.* 1994; 42(2):123-41.
- Dora KA, Martin PEM, Chaytor AT, Evans WH, Garland C, Griffith TM. Role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: inhibition by a connexin mimetic peptide. *Biochemistry and Biophysical Research Communication.* 1999; 254:27-31.
- Dowell FJ, Martin W, Dominiczak AF and Hamilton CA (1999) Decreased basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol* 379:175-182.
- Dye BA, Schober SE, Dillon CF et al. Urinary mercury concentration associated with dental restorations in adult women aged 16-49 years: United States, 1999-2000. *Occup Environ Med.* 2005; 62:268-75.
- Echeverria D, Aposhian HV, Woods JS, Heyers NJ, Aposhian MM, Bittner Jr. AC, et al. Neurobehavioral effects from exposure to dental amalgam Hg<sup>0</sup>: new distinction between recent exposure and Hg body burden. *FASEB J.* 1998; 12:971-80.
- Eckhardt W, Bellmann K, Kolb H. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in beta cells by environmental factors: heavy metals. *Biochem J.* 1999; 338 (Pt 3):695-700.
- Eide R, Wesenberg GR. Mercury contents of indicators and target organs in rats after long-term, low-level, mercury vapor exposure. *Environ Res.* 1993; 61(2):212-22.

**Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res.* 2005; 65:495-504.**

Engley FB Jr. The persistence (survival) of microorganisms. III. In culture media. *Tex Rep Biol Med.* 1956;14(2):114-203.

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

Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15:1514-29.

Eto K, Yasutake A, Miyamoto K, Tokunaga H, Otsuka Y. Chronic effects of methylmercury in rats. II. Pathological aspects. *Tohoku J Exp Med.* 1997;182(3):197-205.

Evans DH, Weingarten K. The effect of cadmium and other metals on vascular smooth muscle of the dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Toxicology.* 1990 Apr 30;61(3):275-81.

Ezaki O. Iib group metal ions (Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>) stimulate glucose transport activity by post-insulin receptor kinase mechanism in rat adipocyte. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:16118-22.

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

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996; 23(12):1082-90.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(3):H985-1002.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2000; 21(1):1-18.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(6):1215-25.

Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38:499-507.

- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994; 23(6 Pt 2):1121-31.
- Fredén H, Helldén L, Milleding P. Mercury content in gingival tissues adjacent to amalgam fillings. *Odontol Revy*. 1974; 25(2):207-10.
- Freitas, M.R.; Schott, C.; Corriu, C.; Sassard, J.; Stoclet, J.C.; Andriantsitohaina, R.. Heterogeneity of endothelium-dependent vasorelaxation in conductance and resistance arteries from Lyon normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 2003. 21:1505-12.
- Fugimoto Y, Yabuno T, Kato M, Nishioka K, Fujita T. Effect of methyl mercury on prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla slices. *Res Commun Pathol Pharmacol*. 1986; 54(1):115-9.
- Ganther HE. Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;355:212-26.
- Gálvez B, de Castro J, Herold D, Dubrovskaja G, Arribas S, González MC, Aranguéz I, Luft FC, Ramos MP, Gollasch M, Fernández Alfonso MS. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(6):1297-302.
- García Gómez M, Boffetta P, Caballero Klink JD, Español S, Gómez Quintana J. Cardiovascular mortality in mercury miners. *Med Clin (Barc)*. 2007; 128(20):766-71.
- García-Redondo AB, Briones AM, Beltrán AE, Alonso MJ, Simonsen U, Salas M. Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased TXA<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008.
- Gassó S, Cristófol R M, Selema G, Rosa R, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C. Antioxidant compounds and Ca<sup>2+</sup> pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercury chloride neurotoxicity. *Journal of Neurosci Res*. 2001; 66:135-45.
- Gauthier KM, Zhang DX, Cui L, Nithipatikom K, Campbell WB. Angiotensin II relaxations of bovine adrenal cortical arteries: role of angiotensin II metabolites and endothelial nitric oxide. *Hypertension*. 2008; 52(1):150-5.
- Geier DA, Kern JK, Garver CR, Adams JB, Audhya T, Nataf R, Geier MR. Biomarkers of environmental toxicity and susceptibility in autism. *J Neurol Sci*. 2008.
- Geier DA, Sykes LK, Geier MR. A review of Thimerosal (Merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2007; 10(8):575-96.

- Gil-Longo J, Gonzalez-Vazquez C. Characterization of four different effects elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat aorta. *Vasc Pharmacol*. 2005; 43:128–138.
- Gilman Ag, Hardman JG, Limbird LE. - Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana Brasil; 2007.
- Girardi G, Elias MM. Mercury chloride effects on renal redox enzyme activities: SOD protection. *Free Rad Biol Med*. 1995; 18:61-66.
- Gochfeld M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2003; 56(1):174-9.
- Goldstein, S. & Czapski, G. The reaction of NO<sup>-</sup> with O<sub>2</sub><sup>-</sup> and HO<sub>2</sub><sup>-</sup> a pulse radiolysis study. *Free Radical and Biological Medicine*. 1995;19:505-10.
- Golpon HA<sup>a</sup>, Püchner A, Barth P, Welte T, Wichert P, Feddersen CO. Nitric oxide-dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. *Toxicology*. 2003; 192(2-3):179-88.
- Golpon HA<sup>b</sup>, Püchner A, Schmidt L, Jungclas H, Barth P, Welte T, Wichert PV, Feddersen CO. Mercury contamination of rat amylin mimics vasoactivity and cytotoxic effects. *Peptides*. 2003; 24(8):1157-62.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sørensen N, Dahl R, Jørgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol*. 1997; 19(6):417-28.
- Gollasch M, Dubrovskaja G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Dec;25(12):647-53
- Gupta M, Bansal JK, Khanna CM. Blood mercury in workers exposed to the preparation of mercury cadmium telluride layers on cadmium telluride base. *Ind Health*. 1996; 34(4):421-5.
- Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P. Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol*. 1983; 32(19):2969-72.
- Guallar E, Sanz-Gallardo MI, van't Veer P, Bode P, Aro A, Gómez-Aracena J, Kark JD, Riemersma RA, Martín-Moreno JM, Kok FJ; Heavy Metals and Myocardial Infarction Study Group. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2002; 347(22):1747-54.
- Hacon S, Barrocas PR, de Vasconcellos AC, Barcellos C, Wasserman JC, Campos RC, Ribeiro C, Azevedo-Carlsoni FB. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008; 24(7):1479-92.

- Hahn LJ, Kloiber R, Leininger RW, Vimy MJ, Lorscheider FL. Whole-body imaging of the distribution of mercury released from dental fillings into monkey tissues. *FASEB J.* 1990; 4(14):3256-60.
- Halbach S, Clarkson TW. Enzymatic oxidation of mercury vapor by erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 523(2):522-31.
- Halbach S, Schönsteiner G, Vierling W. The action of organic mercury compounds on the function of isolated mammalian heart muscle. *Eur J Pharmacol.* 1989; 167(2):255-64.
- Halbach S, Vogt S, Kohler W, Felgenhauer N, Welzl G, Kremers L, et al. Blood and urine mercury levels in adult amalgam patients of a randomized controlled trial: interaction of Hg species in erythrocytes. *Environ Res.* 2008; 107(1):69-78.
- Hallgren CG, Hallmans G, Jansson JH, Marklund SL, Huhtasaari F, Schütz A, Strömberg U, Vessby B, Skerfving S. Markers of high fish intake are associated with decreased risk of a first myocardial infarction. *Br J Nutr.* 2001; 86(3):397-404.
- Hamilton, C.A.; Brosnan, M.J.; McIntyre, M.; Graham, D.; Dominiczak, A.F.. Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2001; 37 (2):529-34.
- Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Heart Vessels.* 1998;13(1):9-17.
- Heller R, Polack T, Gräbner R, Till U. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis.* 1999;144(1):49-57.
- Heron J, Golding J, and ALSPAC Study Team. Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a prospective cohort study in the United Kingdom does not show a causal association. *Pediatrics,* 2004; 114:577-583.
- Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem.* 1991; 266(34):22789-91.
- Hodgson S, Nieuwenhuijsen MJ, Elliott P, Jarup L. Kidney disease mortality and environmental exposure to mercury. *Am J Epidemiol.* 2007; 165(1):72-7.
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent Progress in Angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999; 33:613-621.
- Houston MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med.* 2007; 13(2):S128-33.

- Huang CF, Hsu CJ, Liu SH, Lin-Shiau SY. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase involved. *Toxicol Lett.* 2008; 176(3):188-97.
- Hursh JB, Sichak SP, Clarkson TW. In vitro oxidation of mercury by the blood. *Pharmacol Toxicol.* 1988; 63(4):266-73.
- Hylander LD, Lindvall A, Gahnberg L. High mercury emissions from dental clinics despite amalgam separators. *Sci Total Environ.* 2006; 362(1-3):74-84.
- Hylander LD, Meili M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Sci Total Environ.* 2003; 304(1-3):13-27.
- Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.* 2001; 38(3 Pt 2):581-7.
- Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 2000; 87(3):179-83.
- Jie XL, Jin GW, Cheng JP, Wang WH, Lu J, Qu LY. Consumption of mercury-contaminated rice induces oxidative stress and free radical aggravation in rats. *Biomed Environ Sci.* 2007; 20(1):84-9.
- Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316(1):42-52.
- Kaeffer V, Firla U, Resch K. Sulfhydryl reagents as model substances for eicosanoid research. *Eicosanoids.* 1988; 1(1):49-57.
- Kang-Yum E, Oransky SH. Chinese patent medicine as a potential source of mercury poisoning. *Vet Hum Toxicol.* 1992; 34(3):235-8.
- Kerper LE, Ballatori N, Clarkson TW. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am J Physiol.* 1992; 262(5 Pt 2):R761-5.
- Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension.* 1999; 33(6):1353-8.
- Kershaw TG, Clarkson TW, Dhahir PH. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. *Arch Environ Health.* 1980; 35(1):28-36.

- Kingman A, Albertini T, Brown LJ. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US military population. *J Dent Res.* 1998; 77(3):461-71.
- Kishimoto T<sup>a</sup>, Oguri T, Abe M, Kajitani H, Tada M. Inhibitory effect of methylmercury on migration and tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Arch Toxicol.* 1995; 69(6):357-61.
- Kishimoto T<sup>b</sup>, Oguri T, Tada M. Methylmercury-injury effect on tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Cell Biol Toxicol.* 1995; 11(1):29-36.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008; 44(2): 65-81.
- Kobal AB, Horvat M, Prezelj M, Briski AS, Krsnik M, Dizdarevic T, Mazej D, Falnoga I, Stibilj V, Arneric N, Kobal D, Osredkar J. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol.* 2004; 17(4):261-74.
- Kozma L, Lenkey Á, Varga É, Gomba Sz. Induction of renin release from isolated glomeruli by inorganic mercury(II). *Toxicology Letters.* 1996; 85:49-54.
- Kumar SV, Bose R, Bhattacharya S. Low doses of heavy metals disrupt normal structure and function of rat platelets. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001; 20(1):65-75.
- Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285:R277-297.
- Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview : Overview of the renin-angiotensin system- an endocrine and paracrine system. *Endocrinology.* 2003; 144:2179-83.
- Le Marquer-Domagala F and Finet M (1997) Comparison of the nitric oxide and cyclo-oxygenase pathway in mesenteric resistance vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 121:588-594.
- Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10:1045-1059.
- Leistevuo J, Leistevuo T, Helenius H, Pyy L, Osterblad M, Huovinen P, Tenovuo J. Dental amalgam fillings and the amount of organic mercury in human saliva. *Caries Res.* 2001; 35(3):163-6.
- Leong CC, Syed NI, Lorscheider FL. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury. *Neuroreport.* 2001 Mar 26;12(4):733-7.

- Levenson CW, Axelrad DM. Too much of a good thing? Update on fish consumption and mercury exposure. *Nutr Rev.* 2006; 64(3):139-45.
- Limbong D, Kumampung J, Rimper J, Arai T, Miyazaki N. Emissions and environmental implications of mercury from artisanal gold mining in North Sulawesi, Indonesia. *Sci Total Environ.* 2003.
- Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review. cGMP-dependent protein kinase signalling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 2001; 91:1421-30.
- Lindberg, S.E., Bullock, O.R., Ebinghaus, R., Engstron, D.R., Feng, X., Fitzgerald, W.F., Pirrone, N., Prestbo, E. and Seigneur, C. (2007). A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio.* 36: 19-32.
- Livardjani F, Ledig M, Kopp P, Dahlet M, Leroy M, Jaeger A. Lung and blood superoxide dismutase activity in mercury vapor exposed rats: effect of N-acetylcysteine treatment. *Toxicology.* 1991; 66(3):289-95.
- Lorscheider FL, Vimy MJ. Mercury from dental amalgam. *Lancet.* 1990; 336(8730):1578-9.
- Lyle AN and Griending KK (2006) Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 21:269-280.
- Machado AC, Padilha AS, Wiggers GA, Siman FDM, Stefanon I, Vassallo D V. Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2007; 24:92-97.
- Magos L & Clarkson T W. Overview of the clinical toxicity of mercury. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 257-68.
- Mahaffey KR, Clickner RP, Jeffries RA. Methylmercury and omega-3 fatty acids: Co-occurrence of dietary sources with emphasis on fish and shellfish. *Environmental Research.* 2008; 107 (1):20-29.
- Mahboob M, Shireen KF, Atkinson A, Khan AT. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B.* 2001; 36(5):687-97.
- Malmstrom C, Hanson M, Nylander M. Conference on Trace elements in Health and disease. Stockholm, 1992.



- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol*. 1995; 15:279-307.
- Massaroni L, Oliveira EM, Stefanon I, Vassallo DV. Effects of mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(8):861-4.
- Massaroni L, Rossoni LV, Amaral SM, Stefanon I, Oliveira EM, Vassallo DV. Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of mercury in anaesthetized rats and in langendorff perfused rat hearts. *Pharmacol Res*. 1995; 32(1-2):27-36.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K et al., Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarization factor in mice. *J Clin Invest*. 2000; 106:1521-30.
- Mazerik JN, Hagele T, Sherwani S, Ciapala V, Butler S, Kuppusamt ML, et al. Phospholipase A(2) activation regulates cytotoxicity of methylmercury in vascular endothelial cells. *Int. J. Toxicol*. 2007; 26:553-69.
- McCrea FD, Meek WJ. The action of mercury upon the heart. 1928.
- McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999; 34(4 Pt 1):539-45.
- McKelvey W, Gwynn RC, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, Palmer CD, Parsons PJ. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults *Environ Health Perspect*. 2007; 115(10):1435-41.
- McNeish, A.J.; Wilson, W.S; Martin, W. Ascorbate blocks endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated vasodilation in the bovine ciliary vascular bed and rat mesentery. *British Journal of Pharmacology*. 2002. 135:1801-1809.
- Mergler D, Anderson HA, Chan LH, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, Stern AH; The Panel on Health Risks and Toxicological Effects of Methylmercury. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio*. 2007; 36(1):3-11.
- Miller DM, Woods JS. Urinary porphyrins as biological indicators of oxidative stress in the kidney. Interaction of mercury and cephaloridine. *Biochem Pharmacol*. 1993; 46(12):2235-41.
- Mittal CK, Harrell WB, Mehta CS. *Mol Cell Biochem*. Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase. 1995; 149-150:263-5.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43(2):109-42.

- Montgomery KS, Mackey J, Thuett K, Ginestra S, Bizon JL, Abbott LC. Chronic, low-dose prenatal exposure to methylmercury impairs motor and mnemonic function in adult C57/B6 mice. *Behavioural Brain Research*. 2008; 191(1):55-61.
- Moreira CM, Oliveira EM, Bonan CD, Sarkis JJ, Vassallo DV. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003; 135C(3):269-75.
- Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits *JAMA*. 2006; 296(15):1885-99.
- Mukherjee AB, Zevenhoven R. Mercury in coal ash and its fate in the Indian subcontinent: A synoptic review. *Sci Total Environ*. 2006; 368(1):384-92.
- Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput*. 2008.
- Mulvany, M.J. & Halpern, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*. 1977; 41:19-26.
- Mulvany, M.J.. Determinants of vascular hemodynamic characteristics. *Hypertension*. 1984; 6(2):13-18.
- Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev*. 1990 Oct;70(4):921-61
- Mulvany MJ. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on vascular remodelling of resistance vessels in hypertensive patients. *J Hypertens Suppl*. 1996;14(6):S21-4.
- Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002; 17:105-9.
- Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye C, Cernichiari E, Clarkson TW. Twenty-seven year studying the human neurotoxicity of methylmercury exposure. *Envir, Res*. 2000. section A 83:275-85.
- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268:C799-C822.
- Neves MF, Virdis A, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused rats: effects of aldosterone antagonism. *J Hypertens*. 2003; 21(1):189-98.

- Nielsen KF. Absorption of mercury vapor from the respiratory tract in man. *Acta Pharmacol Toxicol* 1965; 23: 250-62.
- Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279(2):H459-65.
- NRC (National Research Council). Risk assessment in the Federal Government: managing the process. National Academy Press, Washington, DC. 388p. 2000.
- Nriagu JO, Pfeiffer WC, Malm O, Magalhaes de Souza CM, Mierle G. Mercury pollution in Brazil. *Nature*. 1992; 356(6368):389.
- Ogata M, Kenmotsu K, Hirota N, Meguro T, Aikoh H. Reduction of mercuric ion and exhalation of mercury in acatalasemic and normal mice. *Arch Environ Health*. 1987; 42(1):26-30.
- Oka M, Horrobin DF, Manku MS, Cunnane SC, Ally AI, Morgan RO. Effect of mercuric chloride on the rat mesenteric vascular bed: relevance to the mechanism of mercury toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1979; 51(3):427-38.
- Oliveira EM, Vassallo DV. Effects of mercury on the contractility of isolated rat cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(10):1037-40.
- Oliveira EM, Vassallo DV, Sarkis JJ, Mill JG. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994; 128(1):86-91.
- Oomen CM, Feskens EJ, Räsänen L, Fidanza F, Nissinen AM, Menotti A, Kok FJ, Kromhout D. Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy, and The Netherlands. *Am J Epidemiol*. 2000; 151(10):999-1006.
- Oskarsson A, Schültz A, Skerfving S, Hallén IP, Ohlin B, Lagerkvist BJ. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch Environ Health*. 1996; 51(3):234-41.
- Osol G, Cipolla M, Knutson S. A new method for mechanically denuding the endothelium of small (50-150 microns) arteries with a human hair. *Blood Vessels*. 1989;26(5):320-4.
- Pacyna EG, Pacyna JM, Fudala J, Strzelecka-Jastrzab E, Hlawiczka S, Panasiuk D. Mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe in 2000 and their scenarios until 2020. *Sci Total Environ*. 2006; 370(1):147-56.
- Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 195(2):539-44.
- Paolocci N, Pagliaro P, Isoda T, Saavedra FW, Kass DA. Role of calcium sensitive K<sup>+</sup> channels and nitric oxide in in vivo coronary vasodilation from enhanced perfusion pulsatility. *Circulation*. 2001; 103:119-24.

- Paravicini TM and Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008; 31 Suppl 2:S170-180.
- Park EJ, Park K. Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. *Toxicol In Vitro*. 2007; 21(5):789-94.
- Parker SK, Schwartz B, Todd J, Pickering LK. Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorders: a critical review of published original data. *Pediatrics* 2004; 114:793-804.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology*. 1996 Spring;17(1):37-45.
- Parkington HC, Tonta MA, Coleman HA, Tare M. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *Journal of Physiology*. 1995; 484(2):469-80.
- Passos CJ, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saude Publica*. 2008;24 Suppl 4:s503-20.
- Perrin-Nadif R, Dusch M, Koch C, Schmitt P, Mur JM. Catalase and superoxide dismutase activities as biomarkers of oxidative stress in workers exposed to mercury vapors. *J Toxicol Environ Health*. 1996; 48(2):107-19.
- Pesce AJ, Hanenson I, Sethi K. beta2 microglobulinuria in a patient with nephrotoxicity secondary to mercuric chloride ingestion. *Clin Toxicol*. 1977;11(3):309-15.
- Pestana MHD & Formoso MLL. Mercury contamination in Lavras do Sul, south Brazil: a legacy from past and recent gold mining. *The Science of the Total Environment*. 2003; 307: 125-40.
- Pinheiro MC, Macchi BM, Vieira JL, Oikawa T, Amoras WW, Guimarães GA, et al. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. *Environ Res*. 2008.107(1):53-9.
- Pinheiro MC, Oikawa T, Vieira JL, Gomes MS, Guimarães GA, Crespo-López ME, et al. Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(3):411-4.
- Plenz G, Eschert H, Beisert S, Arps V, Sindermann JR, Robenek H, Völker W. Alterations in the vascular extracellular matrix of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) -deficient mice. *FASEB J*. 2003; 17(11):1451-7.
- Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*. 1990; 70(2):427-51.

Portaria Nº 744-A / 99, de 25 de Agosto de 1999. Programas de ação específicos para evitar ou eliminar poluição proveniente de fontes múltiplas de mercúrio. MINISTÉRIOS DA SAÚDE E DO AMBIENTE.

Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000; 44(2):333-40.

Rabelo, L.A.; Cortes, S.F.; Alvarez-Leite, J.I.; Lemos, V.S. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *British Journal of Pharmacology*. 2003;138:1215-20.

Rajanna B, Hobson M, Harris L, Ware L, Chetty CS. Effects of cadmium and mercury on Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>, ATPase and uptake of 3H-dopamine in rat brain synaptosomes. *Arch Int Physiol Biochim*. 1990; 98(5):291-6.

Ray R, Shan AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science*. 2005; 109:217-26.

Raymond LJ, Ralston NVC. Mercury: selenium interactions and health implications. *Seychelles Med Dental J*. 2004; 7:72-7.

Reichl FX, Walther UI, Durner J, Kehe K, Hickel R, Kunzelmann KH, Spahl W, Hume WR, Benschop H, Forth W. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. *Dent Mater*. 2001; 17(2):95-101.

Reus IS, Bando I, Andrés D, Cascales M. 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(3):161-8.

Rice DC. The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. *Environ Res*. 2004; 95(3):406-13.

Risher JM, Nickle RA, Amler SN. Elemental poisoning in occupational and residential settings. *Int J Hyg Environ Health*. 2003; 206:371-9.

Rissanen T, Voutilainen S, Nyssönen K, Lakka TA, Salonen JT. Fish oil-derived fatty acids, Eicosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Circulation*. 2000; 102(22):2677-9.

Ritchie KA, Gilmour WH, Macdonald EB, Burke FJT, McGowan DA Dale IM. Health and neuropsychological functioning of dentists exposed to mercury. *Occup Environ Med*. 2002; 59:287-93.

Rodríguez-Martínez MA, Ruiz-Torres A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev*. 1992; 66:213-22.

- Rooney JP. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*. 2007 May 20; 234(3):145-56. Review. Erratum in: *Toxicology*. 2007; 238(2-3):216.
- Rossoni, L.V.; Cunha V., França, A.; Vassallo, D.V. (1999). The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 34:887-892.
- Ryaboshapko A, Bullock OR Jr, Christensen J, Cohen M, Dastoor A, Ilyin I, Petersen G, Syrakov D, Artz RS, Davignon D, Draxler RR, Munthe J. Intercomparison study of atmospheric mercury models: 1. Comparison of models with short-term measurements. *Sci Total Environ*. 2007; 376(1-3):228-40.
- Saha JG, Lee YW. Interference of fats in the determination of mercury residues in fish by atomic absorption spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1972; 7(5):301-4.
- Saint-Phard D, Van Dorsten B. Mercury toxicity: clinical presentations in musculoskeletal medicine. *Orthopedics*. 2004; 27(4):394-7; 398-9.
- Sakamoto M, Kakita A, de Oliveira RB, Sheng Pan H, Takahashi H. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004; 152(2):171-6.
- Salonen JT. Excessive intake of iron and mercury in cardiovascular disease. *Bibl Nutr Dieta*. 1998; (54):112-26.
- Salonen JT, Seppänen K, Lakka TA, Salonen R, Kaplan GA. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis*. 2000; 148(2):265-73.
- Salonen JT, Seppänen K, Nyyssönen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, Tuomilehto J, Esterbauer H, Tatzber F, Salonen R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation*. 1995; 91(3):645-55.
- Sato RL, Li GG, Shaha S. Antepartum seafood consumption and mercury levels in newborn cord blood. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 194(6):1683-8.
- Scheidt W. Mercury poisoning in Mozart, Beethoven and Schubert? *Med Klin*. 1967; 62(5):195-6.
- Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc Pharmacol*. 2005. 43:19-29.
- Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287(2):H435-46.

- Schiffrin EL, Deng LY, Laroche P. Blunted effects of endothelin upon small subcutaneous resistance arteries of mild essential hypertensive patients. *J Hypertens*. 1992 May;10(5):437-44.
- Schiffrin EL, Hayoz D. How to assess vascular remodelling in small and medium-sized muscular arteries in humans. *J Hypertens*. 1997; 15(6):571-84.
- Schober SE, Sinks TH, Jones RL, Bolger PM, McDowell M, Osterloh J, Garrett ES, Canady RA, Dillon CF, Sun Y, Joseph CB, Mahaffey KR. Blood mercury levels in US children and women of childbearing age, 1999-2000. *JAMA*. 2003; 289(13):1667-74.
- Schroeder, WA; Munthe, J. Atmospheric Mercury – an overview. *Atmospheric Environmental*, 1998; 32: 809-22.
- Schuurs AH. Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *J Dent*. 1999; 27(4):249-56.
- Scotland RS, Ahluwalia A, Hobbs AJ. C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease. *Pharmacol. Ther*. 2005; 105:85-93.
- Seal D, Ficker L, Wright P, Andrews V. The case against thiomersal. *Lancet*. 1991; 338(8762):315-6.
- Seppänen K, Kantola M, Laatikainen R, Nyysönen K, Valkonen VP, Kaarlöpp V, Salonen JT. Effect of supplementation with organic selenium on mercury status as measured by mercury in pubic hair. *J Trace Elem Med Biol*. 2000; 14(2):84-7.
- Sharma MK, Sharma A, Kumar A, Kumar M. *Food Chem Toxicol*. Evaluation of protective efficacy of *Spirulina fusiformis* against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. 2007; 45(6):879-87.
- Shimojo N, Kumagai Y, Nagafune J. Difference between kidney and liver in decreased manganese superoxide dismutase activity caused by exposure of mice to mercuric chloride. *Arch Toxicol*. 2002; 76(7):383-7.
- Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res*. 2004 Jun;49(6):543-9.
- Simmons-Willis TA, Koh AS, Clarkson TW, Ballatori N. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neural amino acid transport (LAT) 1 and LAT2. *Biochem. J*. 2002; 367:239-46.

- Skanker G, Aschner JL, Syversen T. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004; 128(1):48-57.
- Skanker G, Syversen T, Aschner JL, Aschner M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. 2005; 137:11-22.
- Skanker G, Syversen T, Aschner M. Astrocyte-mediated methylmercury neurotoxicity. *Biol Trace Elem Res*. 2003; 95(1):1-10.
- Skerfving S. Methylmercury exposure, mercury levels in blood and hair, and health status in Swedes consuming contaminated fish. *Toxicology*. 1974; 2(1):3-23.
- Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest*. 2005; 35:305-314.
- Sørensen N, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiology*. 1999; 10(4):370-5.
- Spann JW, Heath RG, Kreitzer JF, Locke LN. Ethyl mercury p-toluene sulfonanilide: lethal and reproductive effects on pheasants. *Science*. 1972; 175(19):328-31.
- Sraer JD, Baud L, Sraer J, Delarue F, Ardaillou R. Stimulation of PGE<sub>2</sub> synthesis by mercuric chloride in rat glomeruli and glomerular cells in vitro. *Kidney Int Suppl*. 1982; 11:S63-8.
- Srivastava P, Rajanikanth M, Raghavan SA, Dikshit M. Role of endogenous reactive oxygen derived species and cyclooxygenase mediators in 5-hydroxytryptamine-induced contractions in rat aorta: relationship to nitric oxide. *Pharmacol Res*. 2002. 45:375-382.
- Srogi K. Mercury content of hair in different populations relative to fish consumption *Rev Environ Contam Toxicol*. 2007; 189:107-30.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):44784-90.
- Stacchiotti A, Ricci F, Rezzani R, Li Volti G, Borsani E, Lavazza A, Bianchi R, Rodella LF. Tubular stress proteins and nitric oxide synthase expression in rat kidney exposed to mercuric chloride and melatonin. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54(10):1149-57.
- Standen NB, Quayle JM. K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand*. 1998; 164: 549–557.
- Stern AH. Balancing the risks and benefits of fish consumption. *Ann Intern Med*. 2005; 142(11):949.



- Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiothaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol.* 1999; 375:139-155.
- Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiothaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol.* 1999; 375(1-3):139-55.
- Stroes ES, van Faassen EE, van Londen GJ, Rabelink TJ. Oxygen radical stress in vascular disease: the role of endothelial nitric oxide synthase. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 32 Suppl 3:S14-21.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(17):7773-7.
- Sugata Y, Clarkson TW. Exhalation of mercury--further evidence for an oxidation--reduction cycle in mammalian tissues. *Biochem Pharmacol.* 1979; 28(23):3474-6.
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* 2008; 275:3249-77.
- Suzuki, I.; Swej, A.; Zweifach, B.W.; Schmid-Schonbein, G.W. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995; 25:1083-89.
- Swain EB, Jakus PM, Rice G, Lupi F, Maxson PA, Pacyna JM, Penn A, Spiegel SJ, Veiga MM. Socioeconomic consequences of mercury use and pollution. *Ambio.* 2007; 36(1):45-61.
- Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 Jan;232(1):27-37.
- Taddei S, Vanhoutte PM. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension.* 1993. 21:9-15.
- Taueg C, Sanfilippo DJ, Rowens B. Acute and chronic poisoning from residential exposures to elemental mercury. *J. Toxicolol Clin. Toxicolol.* 1992; 31(1):63,-67.
- Taylor JK. Mercury reduction efforts in Michigan. *Fuel Processing Technol.,* v.65-66, p.69-77, 2000.
- Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 1996. 17:11689-93.
- The Madison Declaration on Mercury Pollution. *Ambio.* 2007; 36(1):62-65.

- Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Liu M, Sakuma I, Kitabatake A, Kanno M. Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J Vasc Res.* 1999; 36:311-320.
- Torres AD, Rai AN, Hardiek ML. Mercury intoxication and arterial hypertension: report of two patients and review of the literature. *Pediatrics.* 2000; 105(3):E34.
- Tosaka M, Hashiba Y, Saito N, Imai H, Shimizu T, Sasaki T. Contractile responses to reactive oxygen species in the canine basilar artery in vitro: selective inhibitory effect of MCI-186, a new hydroxyl radical scavenger. *Acta Neurochir.* 2002;144:1305-1310.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal Transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:639-672.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44(3):248-52.
- Trepka MJ, Heinrich J, Krause C, Schulz C, Wjst M, Popescu M, Wichmann HE. Factors affecting internal mercury burdens among eastern German children. *Arch Environ Health.* 1997; 52(2):134-8.
- Tschudi MR, Mesaros S, Luscher TF and Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension.* 1996; 27:32-35.
- US Department of Health and Human Services (DHHS) and US Environmental Protection Agency (EPA). Mercury levels in commercial fish and shellfish. Washington (DC) DHHS and EPA, 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/sea-mehg.html> (Acesso:12/2007).
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160(1):1-40.
- Vamnes JS, Eide R, Isrenn R, Höl PJ, Gjerdet NR. Diagnostic value of a chelating agent in patients with symptoms allegedly caused by amalgam fillings *J Dent Res.* 2000; 79(3):868-74.
- Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res.* 1995; 18:87-98.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2005; 144:449-58.

- Vassallo DV, Moreira CM, Oliveira EM, Bertollo DM, Veloso TC. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 156(2):113-8.
- Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006; 2(10):582-93.
- Veltman JC, Maines MD. Alterations of heme, cytochrome P-450, and steroid metabolism by mercury in rat adrenal. *Arch Biochem Biophys.* 1986; 248(2):467-78.
- Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang SY, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension.* 2004; 44(3):271-6.
- Vimy MJ, Lorscheider FL. Serial measurements of intra-oral air mercury: estimation of daily dose from dental amalgam. *J Dent Res.* 1985; 64(8):1072-5.
- Vimy MJ, Takahashi Y, Lorscheider FL. Maternal-fetal distribution of mercury (<sup>203</sup>Hg) released from dental amalgam fillings. *Am J Physiol.* 1990; 258(4 Pt 2):R939-45.
- Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens.* 2004; 22(3):535-42.
- Virtanen JK, Rissanen TH, Voutilainen S, Tuomainen TP. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(2):75-85.
- Virtanen JK, Siscovick DS, Longstreth WT Jr, Kuller LH, Mozaffarian D. Fish consumption and risk of subclinical brain abnormalities on MRI in older adults. *Neurology.* 2008; 71(6):439-46.
- Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Tuomainen TP, Korhonen MJ, Valkonen VP, Seppänen K, Laukkanen JA, Salonen JT. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(1):228-33.
- Wakatsuki T., Nakaya Y, Inoue I. Vasopressin modulates K<sup>+</sup>-channel activities of cultured smooth muscle cells from porcine coronary artery. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: H491–H496.
- Wakita Y. Hypertension induced by methyl mercury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987; 89(1):144-7.

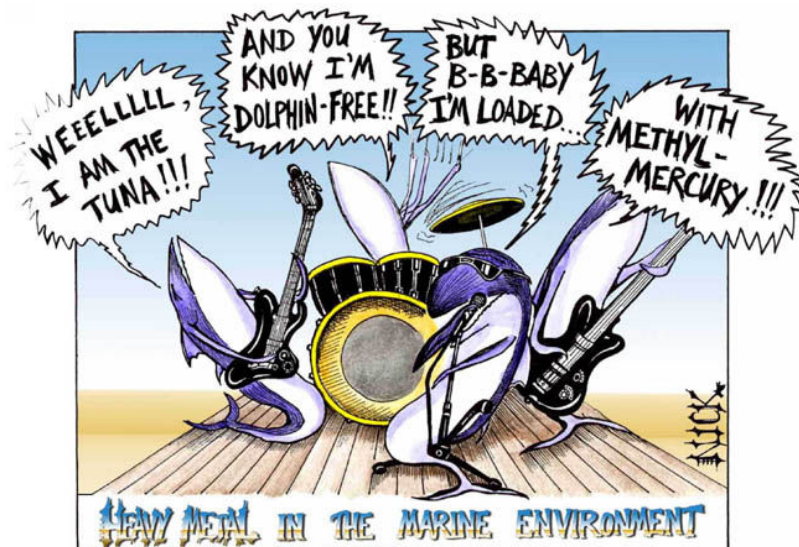
- Waldron GJ, Cole WC. Activation of vascular smooth muscle K<sup>+</sup> channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999; 26(2):180-4.
- Walker-Caprioglio HM, Hunter DD, McGuire PG, Little SA, McGuffee LJ. Composition in situ and in vitro of vascular smooth muscle laminin in the rat. *Cell Tissue Res.* 1995; 281(1):187-96.
- Wang D, Chabrashvili T, Borrego L, Aslam S, Umans JG. Angiotensin II infusion vascular function in mouse resistance vessels: roles of O<sub>2</sub>- and endothelium. *J Vasc Res.* 2006; 43: 109-19.
- Weil M, Bressler J, Parsons P, Bolla K, Glass T, Schwartz B. Blood mercury levels and neurobehavioral function. *JAMA.* 2005; 293(15):1875-82.
- Weinsberg F, Bickmeyer U, Wiegand H. Effects of inorganic mercury (Hg<sup>2+</sup>) on calcium channel currents and catecholamine release from bovine chromaffin cells. *Arch Toxicol.* 1995; 69(3):191-6.
- Williams DL, Katz GM, Roy-Costancin, L, Rubin JP. Guanosine 5-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 85: 9360-64.
- Wiggers GA, Stefanon I, Padilha AS, Peçanha FM, Vassallo DV, Oliveira EM. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008; 147(2):252-60.
- Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1430-42.
- Wolf MB, Baynes JW. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals.* 2007; 20(1):73-81.
- World Health Organization. Methyl Mercury. V. 101. International Programme on Chemical Safety. Geneva, Switzerland, 1990, 1991 e 1996.
- Wössmann W, Kohl M, Grüning G, Bucsky P. Mercury intoxication presenting with hypertension and tachycardia. *Arch Dis Child.* 1999; 80(6):556-7.
- Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vázquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281:R1343-R1360.
- Wu, R.; Millette, E.; Wu, L.; De Champlain, J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Journal of Hypertension.* 2001; 19:741-48.

- Xavier FE, Rossoni LV, Alonso MJ, Balfagon G, Vassallo DV and Salaices M. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 2004; 143:215-225.
- Ximénez Herraiz, L. "Espectroscopia de absorción Atómica" Ed. Publicaciones Analíticas, Madrid (1980).
- Yanagisawa H, Nodera M, Kurihara N, Wada O. *Toxicol Lett.* Altered expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of rats with HgCl<sub>2</sub>-induced acute renal failure 1998; 98(3):181-8.
- Yanagisawa H, Nodera M, Sato M, Moridaira K, Sato G, Wada O. Decreased expression of brain nitric oxide synthase in macula densa cells and glomerular epithelial cells of rats with mercury chloride-induced acute renal failure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 184(3):165-71.
- Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med.* 2002; 347(22):1755-60.
- Yasutake A, Hirayama K, Inoue M. Mechanism of urinary excretion of methylmercury in mice. *Arch Toxicol.* 1989; 63(6):479-83.
- Yasutake A, Sawada M, Shimada A, Satoh m, Tohyama C. Mercury accumulation and its distribution to metallothionein in mouse brain after sub-chronic pulse exposure to mercury vapor. *Arch Toxicol.* 2004; 78:489-95.
- Yee S, Choi BH. Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Exp Mol Pathol.* 1994; 60(3):188-96.
- Yokoo EM, Valente JG, Grattan L, Schmidt SL, Platt I, Silbergeld EK. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults. *Environ Health.* 2003; 2(1):8.
- Zadnik V, Pompe-Kirn V. Effects of 500-year mercury mining and milling on cancer incidence in the region of Idrija, Slovenia. *Coll Antropol.* 2007; 31(3):897-903.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001; 38(6):1395-9.
- Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(1):113-43.
- Zalups RK, Barfuss DW, Kostyniak PJ. Altered intrarenal accumulation of mercury in uninephrectomized rats treated with methylmercury chloride. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992; 115(2):174-82.

Zhou MS, Nishida Y, Chen QH, Kosaka H. Endothelium-derived contracting factor in carotid artery of hypertensive Dahl rats. *Hypertension*. 1999; 34:39-43.

Zhou MS, Jaimes EA, Raij L. Vascular but not cardiac remodeling is associated with superoxide production in angiotensin II hypertension. *J Hypertens*. 2005; 23(9):1737-43.

***ANEXOS***



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
C.A.I.

Centro de Espectrometría Atómica

**Dirección Postal:**  
**Facultad de Ciencias Geológicas**



Ciudad Universitaria  
28040 MADRID  
Tfno.: 394-49-16/7  
Fax: 394-49-17

*INFORME DE ANÁLISIS*

Informe de análisis nº: M-JL-07-58

Nº páginas totales: 2

DATOS CLIENTE:

**Peticionario: Mercedes Salaices Sánchez**  
**Dpto. Farmacología y Terapéutica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Ctra. Cantoblanco Km 15**  
**28049 Cantoblanco-MADRID**

**MUESTRA: DESCRIPCIÓN E IDENTIFICACIÓN**

Se han recibido en el laboratorio el día veintiuno de junio de 2006 trece muestras líquidas correspondientes a sangre total de ratas a las que se les ha inyectado  $\text{HgCl}_2$  en diferentes días y cantidades, para la determinación del contenido en mercurio.

**CÓDIGO CLIENTE**

**CÓDIGO CENTRO**

TT0. 7 días  $\text{HgCl}_2$ -1-16-5-06

M534-0103-B24

TT0. 7 días  $\text{HgCl}_2$ -2-16-5-06

M535-0103-B24

TT0. 7 días  $\text{HgCl}_2$ -3-16-5-06

M536-0103-B24

TT0. 15 días  $\text{HgCl}_2$ -1

M537-0103-B24

TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -2	M538-0103-B24
TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -3	M539-0103-B24
TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -4	M540-0103-B24
TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -5	M541-0103-B24
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -1	M542-0103-B24
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -2	M543-0103-B24
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -3	M544-0103-B24
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -4	M545-0103-B24
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -5	M546-0103-B24

## RESULTADOS ANALÍTICOS

Fecha de inicio/fin

10-07-2006 /19 -07-2006

Se ha realizado el análisis de mercurio mediante Espectrometría de Fluorescencia Atómica, previa disolución con tratamiento ácido.

	Hg (ng ml <sup>-1</sup> )
TT0. 7 días HgCl <sub>2</sub> -1-16-5-06	<b>0,864 ± 0,135</b>
TT0. 7 días HgCl <sub>2</sub> -2-16-5-06	<b>1,37 ± 0,21</b>
TT0. 7 días HgCl <sub>2</sub> -3-16-5-06	<b>1,74 ± 0,27</b>
TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -1	<b>1,72 ± 0,27</b>
TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -2	<b>1,43 ± 0,22</b>
TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -3	<b>1,54 ± 0,24</b>
TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -4	<b>1,27 ± 0,20</b>
TT0. 15 días HgCl <sub>2</sub> -5	<b>1,08 ± 0,17</b>
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -1	<b>8,88 ± 1,38</b>
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -2	<b>6,48 ± 1,01</b>
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -3	<b>6,91 ± 1,08</b>

TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -4	<b>9,63 ± 1,50</b>
TT0. 30 días HgCl <sub>2</sub> -5	<b>7,96 ± 1,24</b>
Material de referencia certificado	<b>Valor teórico: 3,8 ng ml<sup>-1</sup></b> <b>Valor experimental 3,85 ng ml<sup>-1</sup></b>

**Para utilizar los resultados de este informe, tanto en trabajos de investigación y publicaciones como en informes, deberá solicitarse la autorización por escrito al Centro de Espectrometría Atómica de la UCM, y hacerse constar el nombre del Centro como lugar donde ha sido realizado el análisis.**

**Fdo.: M.T. Larrea**

**Directora Técnica**

**(Los resultados declarados en este informe sólo afectan a las muestras analizadas)**