

# Efeitos cardiovasculares da exposição crônica a cloreto de mercúrio em ratos

Lorena Barros Furieri

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas  
(Fisiologia cardiovascular)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Agosto de 2008

# Efeitos cardiovasculares da exposição crônica a cloreto de mercúrio em ratos

Lorena Barros Furiéri

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

Aprovada em 14/08/2008 por:

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo - Orientador, UFES

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Kalinin, UFSCar

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg –  
Coordenador do PPGCF, UFES

---

**Furieri, Lorena Barros, 1985**

**Efeitos Cardiovasculares da Exposição Crônica a Cloreto de Mercúrio em Ratos.** [Vitória] 2008

**XIX, 115 p.**, 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2008)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Mercúrio 2. Coração isolado 3. Músculo papilare 4. Contratilidade miocárdica

---

“Não faças de ti  
Um sonho a realizar.  
Vai.”

*Cecília Meireles*

Agradeço a Deus, aos meus pais,  
ao Rogério, aos familiares  
e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre iluminou os caminhos do bem. Presença constante e confortável nos momentos de solidão e inquietude.

Aos meus pais, Jovino Mauro e Francisléa por terem me ensinado o que realmente tem valor na vida. Amo vocês incondicionalmente e tenho certeza que esse amor é recíproco. Obrigada por tudo que vocês sempre fizeram e fazem por mim. Por cada palavra de conforto e por terem acreditado nos meus sonhos.

A tia Mara, tio Sant'Anna, Luiza, Rafa, Pedrinho, tio Ney, tia Adri, Júnior, Leo e a Vovó por terem sido minha família sempre presente. Obrigada pelo momentos compartilhados, pelo apoio e pelas boas gargalhadas.

Ao Rogério, o amor da minha vida. Obrigada por estar sempre presente, nos momentos de glória e naqueles em que enfraqueci. Te amo muito pelo que você é, e pela mulher feliz que sou ao seu lado.

A Mirian, amiga fiel e companheira. Muito obrigada pelo companheirismo, e por tornar tão especial e harmonioso nosso trabalho. Essa dissertação é um trabalho feito a 4 mãos com muito carinho e é fruto de uma grande amizade.

Ao Dalton, meu querido "Chefe". As palavras faltam para agradecer a quem acreditou que eu poderia dar certo na pesquisa. Obrigada pelas palavras plenamente confortantes, pela disponibilidade, pela amizade, pelas risadas, pelo ombro... Enfim, obrigada por ter sido assim, exatamente como você é!

A Ivanita por ter sido sempre tão disponível a ajudar, pelos ensinamentos e pelo convívio diário. Você é para mim um exemplo de boa postura profissional e imparcialidade.

Aos professores do PPGCF pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do LEMC: Alessandra, Altemar, Aurélia, Edna, Eduardo, Fabiana, Fernanda, Franck, Gabriel, Guilherme, Giulia, Jhuli Keli, Jorge, Juliana, Karina, Larissa, Lélia, Lili, Luciana, Nelson, Neto, Núbia, Priscila, Rogério e Taís.

As minhas grandes amigas Marcela, Nathalia, Thaíssa e Mirian.

A Aurélia e ao Rogério Faustino pela amizade e pela aquisição dos dados bioquímicos.

## SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	X
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	XI
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
	RESUMO.....	XVI
	ABSTRACT.....	XVIII
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1	O MERCÚRIO.....	22
1.1.1	<b>Ocorrência na natureza.....</b>	<b>23</b>
1.1.2	<b>Propriedades físico-químicas e uso industrial.....</b>	<b>25</b>
1.2	EXPOSIÇÃO POPULACIONAL E OCUPACIONAL.....	27
1.2.1	<b>Vacinas.....</b>	<b>27</b>
1.2.2	<b>Consumo de peixes.....</b>	<b>29</b>
1.2.3	<b>Amálgamas dentários.....</b>	<b>29</b>
1.4	EFEITOS BIOLÓGICOS DO MERCÚRIO.....	31
1.4.1	<b>Efeitos cardiovasculares.....</b>	<b>32</b>
1.5	ACOPLAMENTO                    EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO                    E CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	35
1.5.1	<b>Fatores que afetam a contratilidade miocárdica.....</b>	<b>36</b>
1.5.1.1	Influência da Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> - ATPase e da troca Na <sup>+</sup> -Ca <sup>++</sup> .....	36
1.5.1.2	Estimulação β-adrenérgica.....	37
1.5.1.3	Responsividade miofibrilar ao cálcio.....	38
1.5.1.5	Mudança no pH intracelular.....	38
1.5.1.6	Estiramento.....	38
1.5.1.7	Óxido nítrico.....	39
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	41

3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	43
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
3.3	AVALIAÇÃO PONDERAL.....	45
3.4	AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR <i>IN VIVO</i> .....	46
3.5	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDÍACOS EM CORAÇÕES ISOLADOS.....	48
<b>3.5.1</b>	<b>Protocolos experimentais.....</b>	<b>50</b>
3.5.1.1	Intervenção Heterométrica.....	50
3.5.1.2	Intervenção Homeométrica.....	50
3.6	MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS.....	51
<b>3.6.1</b>	<b>Protocolos experimentais.....</b>	<b>51</b>
3.6.1.1	Força de contração isométrica e parâmetros temporais.....	51
3.6.1.2	Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos.....	52
3.6.1.3	Força desenvolvida em diferentes frequências de estimulação elétrica .....	53
3.6.1.4	Força desenvolvida durante contrações tetânicas.....	53
3.6.1.5	Força desenvolvida após repouso de 10 minutos.....	54
3.7	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	55
<b>3.7.1</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> ATPase miosínica.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase.....</b>	<b>56</b>
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
3.9	FÁRMACOS E REAGENTES.....	58
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1	AVALIAÇÃO PONDERAL.....	60
4.2	AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR <i>in vivo</i> .....	63
4.3	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDÍACOS EM	

	CORAÇÕES ISOLADOS .....	67
4.3.1	<b>Intervenção Heterométrica.....</b>	68
4.3.2	<b>Intervenção Homeométrica: Resposta <math>\beta</math>-adrenérgica .....</b>	69
4.4	MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS.....	71
4.4.1	<b>Força de contração isométrica e parâmetros temporais .....</b>	71
4.4.2	<b>Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos .....</b>	72
4.4.3	<b>Força desenvolvida em diferentes frequências de estimulação elétrica.....</b>	72
4.4.4	<b>Força desenvolvida durante contrações tetânicas .....</b>	73
4.4.5	<b>Força desenvolvida após repouso de 10 minutos .....</b>	74
4.5	ANÁLISE BIOQUÍMICA .....	76
4.5.1	<b>Ca<sup>2+</sup>ATPase miosínica .....</b>	76
4.5.2	<b>Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase .....</b>	76
5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	78
5.1	AVALIAÇÃO PONDERAL .....	80
5.1.1	<b>Peso corporal .....</b>	80
5.1.2	<b>Peso dos ventrículos .....</b>	80
5.2	ANÁLISE BIOQUÍMICA .....	82
5.2.1	<b>Ca<sup>2+</sup> ATPase miosínica .....</b>	82
5.2.2	<b>Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - ATPase .....</b>	83
5.3	AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR <i>in vivo</i> .....	85
5.4	AVALIAÇÃO EM CORAÇÕES ISOLADOS .....	88
5.4.1	<b>Intervenção Heterométrica: Curva de função ventricular ....</b>	89
5.4.2	<b>Intervenção Homeométrica: Resposta <math>\beta</math>-adrenérgica .....</b>	89
5.5	MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS.....	91
5.5.1	<b>Força de contração isométrica e parâmetros temporais .....</b>	91
5.5.2	<b>Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos .....</b>	94

5.5.3	Força desenvolvida em diferentes frequências de estimulação elétrica .....	95
5.5.4	Força desenvolvida durante contrações tetânicas .....	96
5.5.5	Força desenvolvida após repouso de 10 minutos .....	96
6	CONCLUSÕES .....	98
7	REFERÊNCIAS .....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Compostos de mercúrio.....	22
Tabela 2-	Relação entre a forma química, propriedades características e aplicações do mercúrio.....	26
Tabela 3-	Dados da avaliação ponderal dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	62
Tabela 4-	Dados da avaliação cardiovascular <i>in vivo</i> dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	66

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ciclo do mercúrio no meio ambiente.....	24
Figura 2-	Entrada e extrusão do cálcio no miócito cardíaco e participação do cálcio no potencial de ação miocárdico.....	36
Figura 3-	Ativação $\beta$ -adrenérgica no miócito cardíaco.....	37
Figura 4-	Registro típico das mensurações cardiovasculares <i>in vivo</i> .....	47
Figura 5-	Registros típicos obtidos de uma preparação de coração isolado	49
Figura 6-	Registros típicos da resposta homeométrica ao isoproterenol.....	50
Figura 7-	Registro típico de contrações isométricas desenvolvidas por músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos.....	52
Figura 8-	Registro típico evidenciando os parâmetros temporais da contração isométrica de músculos papilares de VE de ratos.....	52
Figura 9-	Registros típicos de contrações isométricas após estabilização e PPP obtidas após pausas de 15, 30 e 60 s em músculos papilares de VE de ratos.....	53
Figura 10-	Registros típicos de contrações isométricas desenvolvidas por músculos papilares de VE de ratos em diferentes freqüências de estimulação elétrica.....	53
Figura 11-	Registro típico de uma contração tetânica, indicando o pico e platô dessas contrações características.....	54
Figura 12-	Avaliação do ganho ponderal nos grupos Controle e Mercúrio.....	60
Figura 13-	Avaliação ponderal das câmaras cardíacas em ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	61
Figura 14-	Avaliação hemodinâmica <i>in vivo</i> dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	63
Figura 15-	Avaliação dos parâmetros do ventrículo esquerdo <i>in vivo</i> dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	64
Figura 16-	Avaliação dos parâmetros do ventrículo direito <i>in vivo</i> dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	65
Figura 17-	Valores de pressão sistólica isovolumétrica, derivadas temporais e pressão de perfusão coronariana de corações isolados de ratos do grupo Controle e do grupo Mercúrio após estabilização.....	68

Figura 18-	Valores de pressão sistólica isovolumétrica, derivadas temporais e pressão de perfusão coronariana de corações isolados de ratos dos grupos Controle e Mercúrio em diferentes pressões diastólicas.....	69
Figura 19-	Resposta à estimulação $\beta$ -adrenérgica em corações isolados de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	70
Figura 20-	Força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	71
Figura 21-	Parâmetros temporais em músculos papilares de VE de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	72
Figura 22-	PPP de 15, 30 e 60 segundos, em músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	73
Figura 23-	Força desenvolvida, em diferentes freqüências de estimulação elétrica, por músculos papilares de VE de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	73
Figura 24-	Força desenvolvida em contrações tetânicas por músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	74
Figura 25-	Potenciação relativa das contrações após pausas na estimulação elétrica (PRC) de 10 min em músculos papilares de VE de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	75
Figura 26-	Atividade específica da enzima ATPase miosínica de corações de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.....	76
Figura 27-	Atividade enzimática específica da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

%- Porcentagem

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – Concentração intracelular de cálcio

[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> – Concentração intracelular de sódio

°C- Graus Celsius

μM- micromolar

AC- Adenilato ciclase

AD – Átrio direito

AE – Átrio Esquerdo

Ag/AgCl – Prata/cloreto de prata

ANOVA- Análise de variância

ATP- Trifosfato de adenosina

bpm – Batimentos por minuto

CAM- Ca<sup>2+</sup> - ATPase miosínica

CEUA/EMESCAM- Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória.

CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico

dP/dt máx – Derivada máxima de pressão

dP/dt min - Derivada mínima de pressão

dP/dt VD- Derivadas temporais do ventrículo direito

dP/dt VE- Derivadas temporais do ventrículo esquerdo

eNOS- Isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico

EPM- erro padrão da média

FC – Frequência Cardíaca

Hg- Mercúrio

HgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Mercúrio

Hz- Hertz

i.p.- Intra-peritoneal

$L_{max}$ - Comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima

M- Molar

MDA- Malondialdeído

mM- milimolar

mmHg- Milímetros de mercúrio

MPLC- Cadeia leve fosforilável da miosina

ms – Milissegundos

n- número de unidades experimentais

NKA-  $Na^+K^+$ - ATPase

nM- nanomolar

$O_2$  - Oxigênio

PA- Pressão arterial

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PAM – Pressão Arterial Média

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PC final - Peso corporal final

PC inicial - Peso corporal inicial

PD – Pressão diastólica

PDfVD - Pressão Diastólica final do Ventrículo Direito

PDfVE – Pressão Diastólica final do Ventrículo Esquerdo

PDIVE – Pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo

PKA – Proteína cinase dependente de AMPc

PKG- Proteína cinase dependente de GMPc

PLB- Fosfolambam

PPC- pressão de perfusão coronariana

ppm- Partículas por milhão

PPP- Potenciação pós-pausa

PRC- Contrações após repouso de 10 minutos

PSVD - Pressão Sistólica do Ventrículo Direito

PSVE – Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo

PVD- Pressão do ventrículo direito

PVE- Pressão do ventrículo esquerdo

RS- Retículo sarcoplasmático

RyR- Receptor de rianodina

-SH – Grupamentos sulfidrílicos

TA- tempo de ativação

TnI- Troponina I

TR- tempo de relaxamento

UFES- Universidade Federal do Espírito Santo

V – Volts

VD – Ventrículo Direito

VD/PC - Relação peso do ventrículo direito pelo peso corporal

VE – Ventrículo Esquerdo

VE/PC - Relação peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal

## RESUMO

A avaliação da exposição ambiental a pequenas quantidades de mercúrio tem demonstrado que o metal afeta o sistema cardiovascular. Sua exposição crônica promove hipertensão arterial e correlaciona-se com eventos cardiovasculares e, em baixas concentrações, promove stress oxidativo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição por 30 dias à 20 nM de  $\text{HgCl}_2$  sobre parâmetros hemodinâmicos e a contratilidade miocárdica.

Ratos Wistar foram separados aleatoriamente em dois grupos. O grupo Controle recebeu, durante 30 dias, injeções intramusculares (IM) de salina e o grupo tratado recebeu no primeiro dia de tratamento uma injeção IM de solução de  $\text{HgCl}_2$  suficiente para alcançar a concentração plasmática de 20 nM. Até o término do tratamento, os ratos recebiam diariamente doses de reforço para manter a concentração desejada.

Após 30 dias os ratos eram anestesiados, heparinizados e submetidos à canulação da artéria carótida e da veia jugular direitas para medidas da pressão arterial sistólica, arterial diastólica, arterial média, e pressões sistólica e diastólica de VE e VD e suas derivadas temporais.

Foram avaliados os parâmetros contráteis de corações isolados perfundidos pela técnica de Langendorff. Um balão de látex, conectado a um transdutor de pressão, foi utilizado para determinação da pressão diastólica (PD) e mensuração da pressão sistólica isovolumétrica do VE. Os protocolos realizados foram: resposta ao aumento da PD e resposta à estimulação  $\beta$ -adrenérgica. Durante todo o experimento também foi medida a pressão de perfusão coronariana (PPC).

Também foram analisados, em músculos papilares de VE: o inotropismo cardíaco, os parâmetros temporais, a atividade funcional do retículo sarcoplasmático, a permeabilidade da membrana sarcolemal ao cálcio e a responsividade das proteínas contráteis.

Por fim, foram medidas as atividades específicas da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (NKA) e da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase miosínica cardíacas.

Análise estatística: ANOVA duas vias ou teste  $t$ -Student.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Os parâmetros hemodinâmicos mostraram uma única alteração, aumento da pressão diastólica final de VE (PDfVE) no grupo Mercúrio em relação ao Controle. No entanto, em corações isolados observamos, no grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>, diminuição da pressão desenvolvida e das derivadas temporais na condição basal e em praticamente todas as PD estudadas. Os corações do grupo Mercúrio também apresentaram diminuição da resposta β-adrenérgica.

No entanto, o tratamento crônico com HgCl<sub>2</sub> não foi capaz de alterar os parâmetros contráteis em músculos papilares do VE, mas aumentou a atividade da e Ca<sup>2+</sup> ATPase miosínica e inibiu a atividade específica da NKA.

Possivelmente, o aumento da PDfVE *in vivo* e o efeito inotrópico negativo em corações isolados se devem a inibição da NKA, que causa aumento da concentração intracelular de cálcio, induzindo defeito no relaxamento por sobrecarga de cálcio no músculo cardíaco.

Como os parâmetros hemodinâmicos encontram-se preservados *in vivo*, podemos especular que fatores neuro-humorais estejam participando da manutenção do inotropismo cardíaco e pressão arterial. O aumento da atividade da Ca<sup>2+</sup> ATPase miosínica também poder ser um mecanismo compensatório do músculo cardíaco.

Sugerimos que a diminuição da resposta β-adrenérgica é conseqüência da dessensibilização dos receptores β cardíacos, por uma ativação simpática aumentada, como mecanismo compensatório, durante a exposição ao HgCl<sub>2</sub>.

Podemos concluir que a exposição a baixa concentração de HgCl<sub>2</sub> promove efeito inotrópico negativo em corações isolados, déficit de relaxamento *in vivo*, aumento da ATPase miosina e inibição da NKA.

## ABSTRACT

The evaluation of environmental exposure to small quantities of mercury showed that the metal affects the cardiovascular system. The chronic exposition produces hypertension and correlates with cardiovascular events and promotes oxidative stress.

Our objective was to study the effects of 20 nM HgCl<sub>2</sub> exposure during 30 days on hemodynamic parameters and cardiac contractility.

Wistar rats were divided at random in 2 groups. The control group received intramuscular injections (IM) of saline during 30 days and the treated group received, in the first day, one IM injection containing HgCl<sub>2</sub> sufficient to produce a plasma concentration of 20 nM HgCl<sub>2</sub>. Until the end of the treatment period rats received a supplement dose to maintain the desired plasma concentration.

After 30 days rats were anesthetized, received heparin and the right carotid artery and jugular vein were cannulate, for measurements of systolic, diastolic and mean arterial pressure, left and right systolic and diastolic ventricular pressure and their time derivatives.

In isolated perfused rats according to the Langendorff technique contractile characteristics were investigated. A latex balloon, connected to a pressure transducer was used to measure isovolumetric left ventricular systolic and diastolic pressures. The following protocols were performed: progressive increments of diastolic pressure and the answer to  $\beta$ -adrenergic stimulation. Throughout the experiment the coronary mean perfusion pressure was measured (CPP).

Cardiac contractility was also evaluated in left ventricle papillary muscles: inotropism, temporal parameters, sarcoplasmic reticulum activity, sarcolemmal calcium permeability and the role of contractile proteins.

The myocardial activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) and myosin Ca<sup>2+</sup> ATPase were also measured.

Statistical analyses: two-way ANOVA and the Student *t* test.  $p < 0,05$  was considered significant.

Hemodynamic parameters showed one single alteration, the increase of the left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) in the Mercury group when compared to

control. However, in isolated hearts it was observed in the HgCl<sub>2</sub> group reduction of developed pressure and time derivatives in control conditions and in all diastolic pressures. The hearts from the Mercury group also showed a reduction of the β-adrenergic response.

Moreover, the HgCl<sub>2</sub> chronic treatment was not capable to alter the contractile parameters in left ventricle papillary muscles, but increased the myosin Ca<sup>2+</sup> ATPase and the NKA specific activity.

Possibly the LVEDP increase *in vivo* and the negative inotropic effect observed in isolated hearts are linked to the NKA inhibition that causes an increase of intracellular calcium inducing a defective relaxation by the myocardium calcium overload.

Considering that the hemodynamic parameters are preserved *in vivo* we could speculate that neuro-humoral factors might be playing a role to maintain the cardiac inotropic state and the arterial pressure. The increased activity of the myosin Ca<sup>2+</sup> ATPase might also be a compensatory mechanism of the cardiac muscle.

We suggest that the reduction of the β-adrenergic response is a consequence of a desensitization process caused by an increased sympathetic tone as a compensatory mechanism during HgCl<sub>2</sub> exposure.

We might conclude that the chronic exposure to a small concentration of HgCl<sub>2</sub> produces a negative inotropic effect in isolated hearts, a relaxation deficit *in vivo* and an increase of myosin ATPase activity and NKA inhibition.

## ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de metais pesados está intimamente ligado à história do homem. Já na pré-história o homem descobriu os metais como importante material para fabricação de utensílios e ferramentas. Entretanto, os registros referentes aos metais não são somente aqueles que relatam os seus benefícios (Nascimento & Chasin, 2001). O contato humano com compostos metálicos isentos de atividade fisiológica, mesmo em baixas concentrações, está correlacionado com alta toxicidade (Clarkson *et al.*, 2003; Dufol, 2003). Diversas atividades industriais e agrícolas geram efluentes que contêm uma ampla variedade dessas espécies químicas, como o cádmio, o chumbo e o mercúrio, que estão geralmente associados à poluição ambiental, devido à sua toxicidade e propriedade de acumulação em organismos (Azevedo, 2003).

O mercúrio se destaca neste contexto, devido à sua elevada toxicidade e grande mobilidade nos ecossistemas. Este metal pode ser encontrado em todas as esferas do ambiente, sendo liberado a partir de fontes naturais e antropogênicas, como por exemplo, a queima de combustíveis fósseis e a mineração de ouro e prata. Na atualidade, a exposição a elementos metálicos se dá principalmente na atividade laboral. Entretanto, a poluição do ar, águas oceânicas, rios, solo e da atmosfera ocasiona riscos à população em geral (Alexandre, 2006).

## 1.1 O MERCÚRIO

Por ser líquido, altamente maleável e possuir uma cor mágica, o mercúrio, desde tempos imemoriáveis, encanta o homem (Azevedo, 2003). É o único metal que, em sua forma elementar e em condições normais de temperatura e pressão, encontra-se na forma líquida. Isso explica o seu nome, derivado do latim, *hydrargyrum*, que significa prata líquida, metal ao qual se assemelha (HSDB, 2000).

Esse metal, pertencente à família química dos metais do grupo IIb da tabela periódica dos elementos, pode apresentar-se de três formas distintas. Na forma elementar, na qual se apresenta metálico e com estado de valência 0, sendo a forma mais volátil dos compostos mercuriais. E em outros estados de valência: +1 e +2 chamados, respectivamente, mercúrio mercurioso ( $\text{Hg}_2^{++}$ ) e mercúrio mercúrico ( $\text{Hg}^{++}$ ). Na natureza e gerados por atividade antropogênica encontram-se associados formando compostos orgânicos e inorgânicos, como exposto na tabela 1. Dos compostos inorgânicos, os compostos mercúricos são os mais abundantes.

Tabela 1: Compostos de mercúrio.

Mercúrio Elementar
$\text{Hg}^0$
Compostos Inorgânicos
$\text{HgCl}_2$ , $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , $\text{HgF}_2$ , $\text{Hg}_2\text{F}_2$ , $\text{HgBr}_2$ , $\text{Hg}_2\text{Br}_2$ , $\text{HgI}_2$ , $\text{Hg}_2\text{I}_2$ , $\text{HgH}_2$ , $\text{HgO}$ , $\text{Hg}_2\text{O}$ , $\text{HgS}$ , $\text{HgSe}$ , $\text{HgTe}$ , $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ .
Compostos Orgânicos
$\text{CH}_3\text{HgCl}$ (compostos de alquilmercúrio), $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$ (compostos de arilmercúrio), $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{HgCl}$ (compostos de alcoxiarilmercúrio).

Modificado de Azevedo, 2003.

Os sais mais importantes são: o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), um composto corrosivo e muito tóxico; o cloreto mercurioso, ainda utilizado na medicina como medicamento; o cinábrio ( $\text{HgS}$ ), que é a forma mais comumente encontrada na natureza, tem cor

avermelhada e é empregado como pigmento para tintas; e o fulminato de mercúrio  $\text{Hg}(\text{CNO})_2$ , um detonador presente em explosivos (Nascimento & Chasin, 2001).

Os compostos orgânicos de mercúrio são ainda mais perigosos, por sua alta toxicidade e afinidade com o sistema nervoso central (SNC). O mercúrio se liga a pelo menos um átomo de carbono e a ânions diversos, formando compostos  $\text{RHgR}'$  ou  $\text{RHgX}$ . O R e R' são, normalmente, radicais alquila, fenila, propila e metoxietila. Os ânions X podem ser cloretos, sulfatos e nitratos. Os diversos compostos organomercuriais tem aparência e odores distintos, dependentes dos radicais ligados ao mercúrio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) (Ferrer, 2003; Nascimento & Chasin, 2001).

O  $\text{Hg}^{2+}$  vem sendo utilizado comercialmente e na medicina por séculos. No passado, comumente constituía muitas medicações e hoje, ainda, é o principal conservante empregado em vacinas. Mesmo com o conhecimento da sua toxicidade, permanece sendo utilizado em equipamentos hospitalares, como termômetros e esfigmomanômetros e, comercialmente, em lâmpadas fluorescentes e baterias. Desta forma, o seu uso leva a exposição tanto ocupacional como acidental (Clarkson *et al.*, 2003).

Muitos organomercuriais foram utilizados como praguicidas (eventualmente, de forma desaconselhada, ainda são empregados), outros seguem tendo aplicação médica como anti-séptico (como o sal sódico do ácido o-(etilmercúrio), conhecido comercialmente como Merthiolate) e também já houve a era dos diuréticos mercuriais (Azevedo, 2003).

### 1.1.1 Ocorrência na natureza

O mercúrio em pequenas e variáveis concentrações encontra-se em todos os meios geológicos: hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera. Entre esses compartimentos há um constante fluxo dos compostos de mercúrio (Figura 1). É a 16ª substância mais abundante do planeta, com reservas estimadas em 30 bilhões de toneladas (Azevedo, 2003).

O cinábrio ou sulfeto de mercúrio é o composto de mercúrio mais abundante na natureza e contém quantidade suficiente de mercúrio para extração mineral do metal (86,2%). Ele possui cor avermelhada e é encontrado em rochas próximas de atividades vulcânicas recentes, em veios ou fraturas minerais e em áreas próximas

de fontes de águas termais. Em Almáden, Espanha, existe a mina mais antiga do mundo, em funcionamento desde 200 a.C.. Esse país é considerado o maior produtor mundial de cinábrio

As fontes naturais mais importantes do mercúrio são provenientes da desgaseificação da crosta terrestre, processo que libera anualmente até 150 mil toneladas, das emissões de vulcões e da evaporação de corpos aquáticos. Devido à erosão e aos ciclos geoquímicos, estima-se que mais de 5 toneladas de Hg são lançadas ao mar todos os anos, e mais da metade da produção das minas é distribuída pelos mares, solo e pela atmosfera. Assim sendo, a crosta terrestre é uma importante fonte de contaminação dos meios aquáticos. Portanto, é muito difícil diferir o quanto do mercúrio presente nos corpos aquáticos é proveniente de fontes naturais e o quanto se deve à contribuição da atividade antropogênica. A figura 1 ilustra o ciclo natural do mercúrio no meio ambiente (Nascimento & Chasin, 2001).

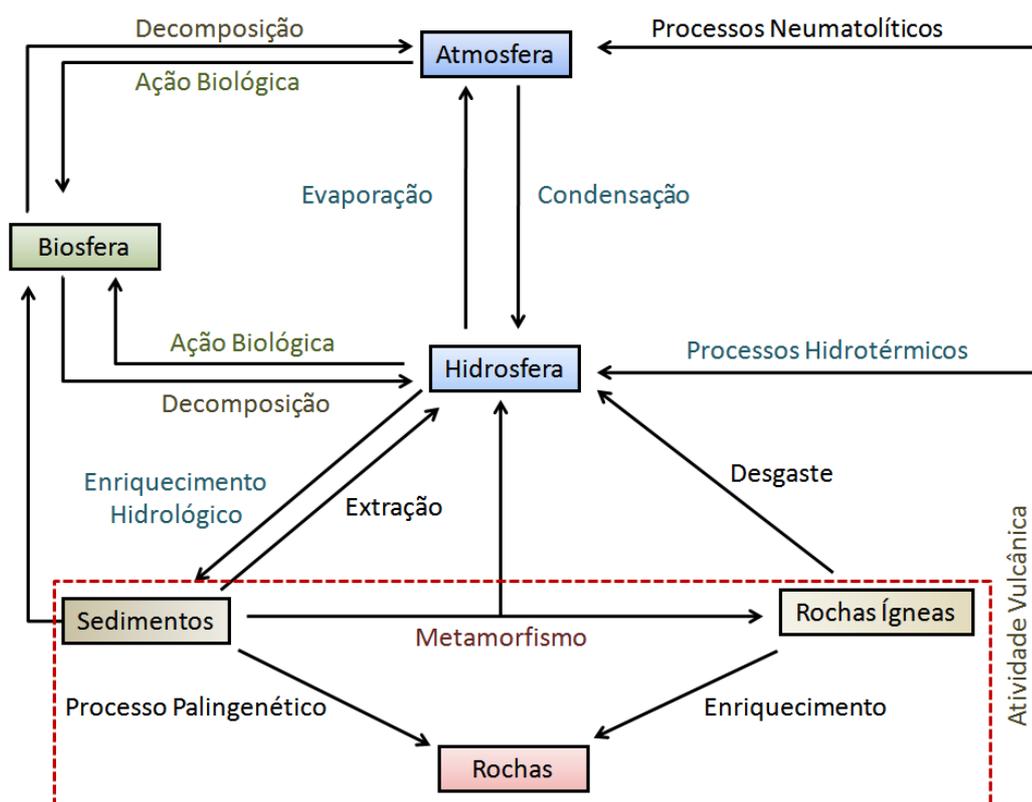


Figura 1: Ciclo do mercúrio no meio ambiente. Modificado de Azevedo, 2003.

Por razões ecotoxicológicas é importante ressaltar a presença do mercúrio em combustíveis fósseis. No carvão foram encontrados de 10 a 300.000 ppb de Hg. O

petróleo e seus gases brutos também possuem considerável quantidade de mercuriais em suspensão (Azevedo, 2003).

### **1.1.2 Propriedades físico-químicas e uso industrial**

As propriedades físico-químicas dos compostos de mercúrio têm íntima relação com os ânions aos que o Hg se liga. O mercúrio elementar é o que apresenta maior volatilidade. O  $\text{HgCH}_3\text{Cl}$  e o  $\text{HgCl}_2$  também podem apresentar-se na forma gasosa. A solubilidade em água dos compostos de mercúrio é muito variada. Esses compostos podem encontrar-se volatizados, na forma de espécies reativas solúveis em água ou como espécies não reativas (Nascimento & Chasin, 2001).

As características apresentadas pelos compostos do mercúrio permitem que eles sejam amplamente utilizados na construção de aparelhos, como interruptores de rede elétrica e termômetros, pois o mercúrio é um bom condutor de eletricidade e registra expansão linear. É empregado também em muitos métodos analíticos, pela sua intensidade de absorção de luz ultravioleta e pelo vapor de mercúrio emitir espectro característico sob a influência de descarga elétrica (Azevedo, 2003). A tabela 2 demonstra a relação entre as forma químicas, suas características e aplicabilidade.

Tabela 2: Relação entre a forma química, propriedades características e aplicações do mercúrio

Forma Química	Propriedades características	Aplicações
Metal	Líquido à temperatura ambiente, expansão volumétrica uniforme em ampla faixa de temperatura, alta tensão superficial, não aderência à superfícies vítreas	Aparelhos de medição de pressão e temperatura: termômetros, manômetros e barômetros
	Baixa resistência elétrica e alta condutividade térmica	Materiais elétricos e eletrônicos, agente resfriante
	Alto potencial de oxidação em relação ao hidrogênio	Operações eletroquímicas: indústrias de cloro e soda
	Facilidade de formação de amálgamas com outros metais	Metalurgia, odontologia, processos extrativos (garimpo)
Compostos orgânicos	Poder de assepsia por oxidação de matéria orgânica	Inseticidas, bactericidas, fungicidas
Compostos inorgânicos	Alta estereoespecificidade	Catálise na indústria de polímeros sintéticos

Modificado de Micaroni *et al.*, 2000

## 1.2 EXPOSIÇÃO POPULACIONAL E OCUPACIONAL

A exposição ocupacional ao mercúrio, normalmente, resulta da exposição ao vapor de mercúrio e mercúrio inorgânico. Dentistas, técnicos de consultórios odontológicos, trabalhadores de indústrias de cloro e soda, mineiros, trabalhadores de indústrias de equipamentos de medição e de lâmpadas fluorescente são os principais indivíduos expostos ocupacionalmente (Mahaffey, 2005; Zavariz & Glina, 1992).

Atualmente, a população em geral está exposta ao mercúrio por 3 principais fontes: o consumo de peixes contaminados, o uso e manipulação de amálgamas dentários e o timerosal contido em vacinas. Cada uma dessas fontes de exposição contém suas características toxicológicas específicas (Clarkson, 2002).

### 1.2.1 Vacinas

O timerosal é um composto organomercurial que desde 1930 vem sendo amplamente utilizado como conservante em drogas biológicas, como vacinas e soros. Os conservantes são compostos que matam ou previnem a proliferação de microorganismos, como bactérias e fungos. Desta forma, eles são utilizados para prevenir o crescimento microbiológico em vacinas que, eventualmente, possam vir a ser contaminadas. Muitas vacinas possuem em um mesmo frasco muitas doses, nesses casos, o risco de contaminação é muito grande devido às múltiplas puncturas, por isso a utilização do timerosal como conservante é imprescindível (FDA, 2008).

O timerosal é metabolizado no corpo humano e degradado em etilmercúrio e tiosalicilato. O etilmercúrio é um organomercurial, assim como o metilmercúrio. A regulamentação da utilização do timerosal baseia-se, então, nos níveis de exposição seguros ao metilmercúrio, devido às poucas pesquisas existentes sobre os riscos específicos desse organomercurial utilizado em vacinas. Entretanto, a diferença química entre esses compostos é um importante determinante das suas toxicidades e vem sendo estudada (Guzzi & La Porta, 2008). Todavia, a FDA considera a exposição ao etil e ao metilmercúrio equivalentes em relação à avaliação de risco (FDA, 2008; Clarkson, 2002).

Geier e Geier em 2003 mostraram forte evidência epidemiológica de ligação entre o conteúdo de timerosal nas vacinas e o aparecimento de desordens neurológicas e cardíacas em crianças. Neste estudo, inicialmente, foi comparada a quantidade de timerosal nas vacinas com a recomendação de ingestão de metilmercúrio na dieta pelo órgão competente norte-americano (FDA- Food and Drug Administration). Em seguida, foi realizada uma comparação da incidência de desordens neurológicas e cardíacas em crianças que recebiam vacinas contendo timerosal e vacinas sem esse conservante. Os autores concluíram que além de a quantidade de timerosal exceder as normas de segurança de ingestão, ele ainda está sendo administrado por via diferente, ou seja, a absorção desse composto por via endovenosa e intramuscular é muito maior do que a absorção por via oral. Devido aos dados mostrando que a concentração de timerosal nas vacinas aumenta a incidência de autismo, desordens na fala e doenças cardíacas, os autores sugerem que o timerosal seja completamente removido de vacinas imediatamente, propondo o uso de frascos contendo uma única dose de vacina, o que tornaria o uso desse perigoso conservante desnecessário.

Baskin e colaboradores em 2003 mostraram em um estudo experimental que, em neurônios humanos corticais, o timerosal, em pequenas concentrações, provocou mudança na permeabilidade da membrana, induziu a quebra do DNA e apoptose após pouco tempo de exposição.

No Brasil, o manual de normas de vacinação do Ministério da Saúde, publicado em junho de 2001, mostra que o timerosal é utilizado em muitas vacinas administradas. Essas vacinas previnem a gripe (vacina contra *influenza*), a raiva (vacina anti-rábica), a infecção por meningococo do sorogrupo b e a hepatite B.

É importante ressaltar que a vacina contra hepatite B, por exemplo, é administrada na criança ao nascer, com um mês de vida e aos seis meses; e a vacina contra gripe é administrada anualmente, pois a imunização contra um subtipo do vírus confere pouca ou nenhuma proteção a outros subtipos. Assim, os indivíduos serão expostos ao timerosal contido nas vacinas inúmeras vezes durante toda a vida. (BRASIL, 2001).

### 1.2.2 Consumo de peixes

Como dito anteriormente, além de fontes naturais de emissão de mercúrio, muitas fontes antropogênicas participam da contaminação ambiental. O descarte de mercúrio pelas indústrias de cloro soda e pela atividade mineradora, como ocorre maciçamente na bacia amazônica, tem importante contribuição na contaminação da hidrosfera. Estima-se que, aproximadamente, 130 toneladas de mercúrio são despejadas por ano só na bacia amazônica (Pfeiffer & Lacerda, 1988). Os microorganismos aquáticos possuem ampla capacidade de converter mercúrio inorgânico em metilmercúrio. Levando à bioacumulação em plânctons, herbívoros e, por fim, em peixes que ocupam o topo da cadeia alimentar (Clarkson, 2002).

Os riscos pertinentes ao consumo de peixes contaminados constituem um grave problema de saúde mundial. Aproximadamente 95% do metilmercúrio, forma de Hg presente em peixes, é absorvido pelo trato gastrointestinal e distribuído por todos os tecidos corporais (Clarkson, 2002).

Estudos mostram altas concentrações de mercúrio no cabelo de membros de famílias ribeirinhas da região amazônica (Boischio & Barbosa, 1993) e correlação positiva entre exposição ao mercúrio e pressão arterial sanguínea (Fillion *et al.*, 2006).

O consumo de peixes é recomendado por diminuir os riscos de doenças coronarianas (Burr *et al.*, 1989). No entanto, devido à contaminação dos peixes por mercúrio, muitos autores ponderam sobre os benefícios desse consumo. Estudos correlacionam o consumo de peixes com aumento da incidência de infarto agudo do miocárdio e arterosclerose (Yoshizawa *et al.*, 2002; Virtanen *et al.*, 2005; König *et al.*, 2005). Os riscos relacionados ao consumo, principalmente sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central, levaram a U.S. EPA (United State Environmental Protection Agency) a restringir o consumo de peixes por crianças e gestantes.

### 1.2.3 Amálgamas dentários

O uso de amálgamas dentários é a maior fonte de exposição ao mercúrio inorgânico da população em geral. Dentistas e técnicos de consultórios odontológicos estão potencialmente expostos (Clarkson, 2002).

Os amálgamas dentários são produzidos pela associação de mercúrio com outros elementos metálicos, como a prata, o cádmio e o latão. Como o mercúrio metálico ou elementar é o mais volátil dos compostos mercuriais, a exposição se dá por inalação de vapor de mercúrio presente na cavidade bucal e no ar dos consultórios odontológicos (Nascimento & Chasin, 2001).

Em pacientes a liberação diária de mercúrio por amálgama é de, aproximadamente, 4 a 5 µg/dia e existe correlação positiva entre o número de amálgamas e a concentração sanguínea de mercúrio. A concentração sanguínea de mercúrio após a retirada da restauração pode alcançar até 5 nmol/L (Halbach, 1995; Sandborgh-Englund *et al.*, 1998; Halbach *et al.*, 2008).

Em trabalhadores, a exposição ao vapor de mercúrio se dá durante a produção, implantação e remoção das amálgamas. Aproximadamente 80% do mercúrio inalado é absorvido pelo trato respiratório, podendo alcançar até 18 nmol/L de sangue (Langworth *et al.*, 1997; Trzcinka-Ochocka *et al.*, 2007).

#### 1.4 EFEITOS BIOLÓGICOS DO MERCÚRIO

O mercúrio elementar e seus compostos orgânicos e inorgânicos podem causar sérios danos aos diversos órgãos e tecidos do organismo humano, tanto após exposição aguda quanto crônica. A alta afinidade com os grupamentos sulfidrílicos (SH) presentes nos diversos sistemas enzimáticos das células é o principal determinante da toxicidade do mercúrio (Nascimento & Chasin, 2001). Os efeitos adversos dependem da forma química do mercúrio, da severidade e do tempo de exposição (Zavariz & Glina, 1992).

O mercúrio elementar e os sais inorgânicos são pouco absorvidos pelo trato digestivo, mas se mantidos em contato com a mucosa intestinal podem provocar ulceração. Os sinais e sintomas que podem aparecer após exposição a sais mercúricos e mercuriosos são: estomatites, sabor metálico na boca, náuseas, vômitos, dores abdominais, anorexia, diarréia, colite, necrose da parede intestinal, hematêmese, salivação excessiva, e até perda dos dentes (Graeme & Pollack, 1998; Berglund & Molin, 1996).

No sistema nervoso central (SNC) os efeitos mais freqüentes da exposição ao mercúrio inorgânico são: irritabilidade, fadiga, mudanças comportamentais, tremores, cefaléia, perda auditiva e cognitiva, disartria, incoordenação motora, alucinações e pode até ocasionar a morte. A exposição ao metilmercúrio leva às situações mais graves. Em crianças, o contato com o Hg promove importantes alterações no desenvolvimento do SNC (Graeme & Pollack, 1998; Nascimento & Chasin, 2001).

A excreção dos mercuriais é realizada principalmente pelos rins, e nesses órgãos são responsáveis por lesão glomerular, injúria tubular, insuficiência renal e apoptose, ou seja, danos morfológicos e funcionais (Zalups, 2000; Carranza-Rosales *et al.*, 2005).

A exposição a compostos de mercúrio exercem efeitos também sobre os pulmões, sistema imunológico, reprodutor e alguns estudos relacionam a exposição ao metal com aumento da incidência de câncer (Gómez *et al.*, 2007; Gleichmann *et al.*, 1989).

### 1.4.1 Efeitos cardiovasculares

Poucos estudos retratam os efeitos cardiovasculares do mercúrio após a exposição crônica a pequenas concentrações. Entretanto, muitos estudos experimentais mostram os efeitos cardiovasculares da exposição aguda a diferentes concentrações do metal.

Estudos mostram diminuição da PAM, FC, aumento do intervalo PR do eletrocardiograma, diminuição da resposta hipotensora e cronotrópica negativa à acetilcolina, elevada incidência de arritmias, pequena redução na pressão sistólica do ventrículo esquerdo, aumento da pressão sistólica do ventrículo direito e da pressão diastólica dos ventrículos esquerdo e direito após infusão endovenosa de 5 mg/kg de HgCl<sub>2</sub> em ratos anestesiados (Massaroni *et al.*, 1995; Rossoni *et al.*, 1999). Porém, a exposição aguda a concentração nanomolar aumentou a PAS, PAD, FC e reatividade pressórica à fenilefrina (Machado *et al.*, 2007). Em artérias caudais de ratos, o HgCl<sub>2</sub> (6 nM) aumenta a resposta contrátil à fenilefrina e a produção local de angiotensina (Wiggers *et al.*, 2008).

Em corações isolados e perfundidos pela técnica de Langendorff, a exposição ao metal promove aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo de corações expostos agudamente a 20 nM de HgCl<sub>2</sub> (Assis *et al.*, 2003) e aumento, dose-dependente (0,1 a 3 μM de HgCl<sub>2</sub>), desse parâmetro em ventrículo direito (Cunha *et al.* 2001). O mercúrio também promove diminuição da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo imediatamente após exposição a 0,5; 1; 2; 10 μM e após 30 minutos de exposição a 20 nM (Massaroni *et al.*, 1995; Assis *et al.* 2003). No entanto, a exposição ao metal não modifica a resposta dos corações ao estiramento, ou seja, esses corações possuem o mecanismo de auto-regulação heterométrica preservado (Massaroni *et al.*, 1995).

Su e Chen (1979) mostraram que o metil-mercúrio promove um efeito bifásico em tecido atrial de ratos. Inicialmente, quando os tecidos atriais estão expostos a pequenas concentrações (0,5 a 2 ppm), ocorre um efeito inotrópico positivo, acompanhado por déficit de contratilidade à medida que a concentração do metal aumenta (2 a 50 ppm). Esses achados funcionais foram acompanhados por alterações estruturais em músculos papilares e em átrios, como dilatação da mitocôndria e do retículo sarcoplasmático (RS). Outros estudos também mostram

como diferentes concentrações de  $\text{HgCl}_2$  influenciam na força contrátil de músculos papilares e tiras de ventrículo direito, alteram a cinética do cálcio ativador; a atividade das proteínas contráteis, o funcionamento do RS, (Brunder *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 1994; Cunha *et al.*, 2001; Assis *et al.*, 2003; Falcochio *et al.*, 2004).

As alterações funcionais promovidas pelo mercúrio muitas vezes vêm acompanhadas de alterações em um ou mais processos envolvidos no mecanismo de acoplamento excitação-contração como: 1) inibição a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (Halbach *et al.*, 1989; Anner *et al.*, 1990; Anner *et al.*, 1992; Anner & Moosmayer, 1992); 2) inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase miosínica (Moreira *et al.*, 2003); 3) inibição da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (Hechtenberg & Beyersmann, 1991); e 4) inibição  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -ATPase (Shamoo & MacLennan, 1975).

Ratos que recebiam doses diárias de 0,16mg/kg por 30 dias demonstraram diminuição da capacidade antioxidante plasmática e aumento significativo de radicais livres circulantes (Gutierrez *et al.*, 2006). E aqueles que foram submetidos a exposição crônica a pequena concentração tiveram aumento da produção vascular de ânion superóxido, da expressão da eNOS (isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico) e da concentração plasmática de MDA (malondialdeído) (Wiggers *et al.*, 2008).

Em habitantes da Amazônia, que estão expostos ao mercúrio através do consumo freqüente de peixes, foi observada forte correlação positiva entre concentrações sanguíneas de Hg e pressão arterial sanguínea (Fillion *et al.*, 2006). Outros estudos também correlacionam a exposição ao mercúrio com aumento do risco de ocorrência de infarto do miocárdio e de doenças coronarianas (Yoshizawa *et al.*, 2002; Guallar *et al.*, 2002; Virtanen *et al.*, 2005).

No entanto, poucos são os estudos que mostram as alterações cardiovasculares promovidas pela exposição crônica a pequenas concentrações de mercúrio, como as rotineiramente encontradas em trabalhadores expostos. Observada a carência dessas investigações, o presente estudo visa pesquisar as alterações na contratilidade miocárdica e nos parâmetros arteriais de ratos que foram expostos cronicamente ao  $\text{HgCl}_2$ . Para o melhor entendimento das alterações encontradas no presente estudo e como essas influenciam no funcionamento do músculo cardíaco,

a seguir temos uma breve revisão sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação contração cardíaco e na contratilidade miocárdica.

## 1.5 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO E CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

O mecanismo de acoplamento excitação-contracção cardíaco compreende os processos de ativação elétrica dos miócitos que desencadeiam a contracção do coração. O cálcio é um íon intimamente envolvido na atividade elétrica cardíaca e, por interagir diretamente com os miofilamentos, na contracção muscular (ver revisão em Bers, 2002).

Durante o potencial de ação cardíaco, o cálcio entra na célula via canais ativado por despolarização, contribuindo para a formação do platô do potencial de ação. O influxo de cálcio promove liberação de cálcio dos estoques intracelulares, sendo essa liberação denominada liberação de cálcio induzida por cálcio. A  $[Ca^{2+}]_i$  resulta da combinação do influxo de cálcio pelo sarcolema e a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (o principal reservatório intracelular de cálcio) e é o íon que, por ligação direta aos miofilamentos, será o responsável pela gênese da força e encurtamento muscular (Bers, 2002).

No interior da célula miocárdica, o cálcio se liga à troponina C. Essa interação faz com que a tropomiosina deixe de bloquear o sítio de ligação entre actina e miosina. A actina apresenta sítios ativos que são capazes de interagir com a miosina, pra tal a atividade ATPásica da miosina é ativada, quebrando ATP em ADP e Pi e liberando energia necessária para o deslizamento dos miofilamentos, ocasionando a contracção muscular. Então, a afinidade do cálcio à troponina C modula a força de contracção miocárdica e será discutida mais adiante (Vassallo *et al.*, 2008).

Para que ocorra o relaxamento do músculo cardíaco é necessário que o cálcio se desligue da troponina C e seja removido para o meio extracelular e para os compartimentos intracelulares que estocam cálcio. O transporte de cálcio para fora do citosol envolve quatro vias: a bomba de cálcio do RS, o trocador  $Na^+/Ca^{++}$ , a bomba de cálcio do sarcolema e o uniporte de cálcio mitocondrial. Alterações nos mecanismo de extrusão de cálcio também podem modificar a contratilidade, visto que interferem na concentração intracelular de cálcio (Bers, 2002).

Os mecanismos envolvidos na entrada, liberação e extrusão de cálcio; e a participação desse íon no potencial de ação e contracção miocárdica estão ilustrados na figura 2.

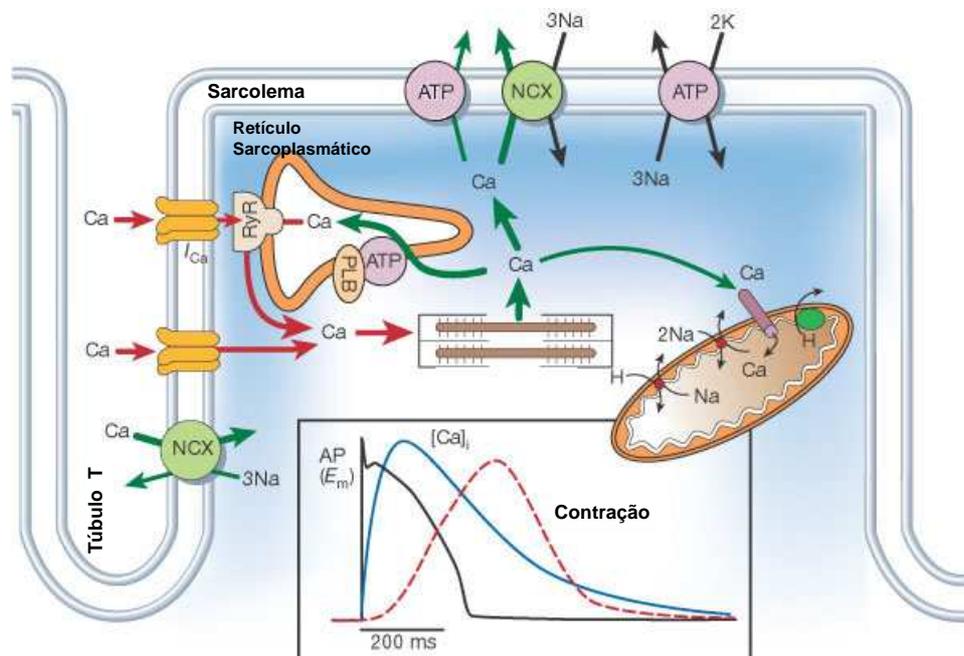


Figura 2: Entrada e extrusão do cálcio no miócito cardíaco e participação do cálcio no potencial de ação miocárdico. Modificado de Bers, 2002.

### 1.5.1 Fatores que afetam a contratilidade miocárdica

#### 1.5.1.1 Influência da $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase e da troca sódio-cálcio

A função da NKA é retirar o  $Na^{+}$  para fora da célula ao mesmo tempo que o  $K^{+}$  é transportado para o meio intracelular. O seu funcionamento é dependente das concentrações intra e extracelulares desses dois íons. A inibição da NKA ocasiona aumento da  $[Na^{+}]_i$ , visto que diminui sua extrusão. O aumento da concentração intracelular de Na promove diminuição da troca  $Na^{+}/Ca^{++}$ , conseqüente aumento da concentração intracelular de cálcio e efeito inotrópico positivo (Blaustein, 1988).

A troca  $Na^{+}/Ca^{++}$  funciona com a estequiometria de 3:1, ou seja, três íons  $Na^{+}$  entram para o meio intracelular à medida que um íon cálcio é retirado do interior da célula. O aumento da  $[Na^{+}]_i$  por inibição da NKA diminui a atividade do trocador, aumento a  $[Ca^{2+}]_i$ , por ligação do  $Na^{+}$  aos sítios intracelulares do trocador (Bers & Guo, 2005)

### 1.5.1.2 Estimulação $\beta$ -adrenérgica

A ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos está relacionada a efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos na célula miocárdica. A ligação de agonistas aos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ativa a proteína ligada ao GTP (Gs) que estimula a adenilato ciclase (AC) a produzir AMPc, que, então, ativa a proteína cinase dependente de AMPc (PKA). Essa cinase fosforila diversas proteínas relacionadas ao acoplamento excitação-contração (Bers, 2002).

O efeito lusitrópico da PKA é mediado pela fosforilação da troponina I, diminuindo a afinidade da troponina C ao cálcio, e do fosfolambam, que deixa de inibir a bomba de cálcio do RS. A PKA também fosforila os canais de cálcio do sarcolema e os receptores de rianodina, aumentando a concentração intracelular de cálcio e promovendo efeito inotrópico positivo (Bers, 2002).

Os mecanismos intracelulares envolvidos na ativação  $\beta$ -adrenérgica e as ações da PKA estão ilustrados na figura 3.

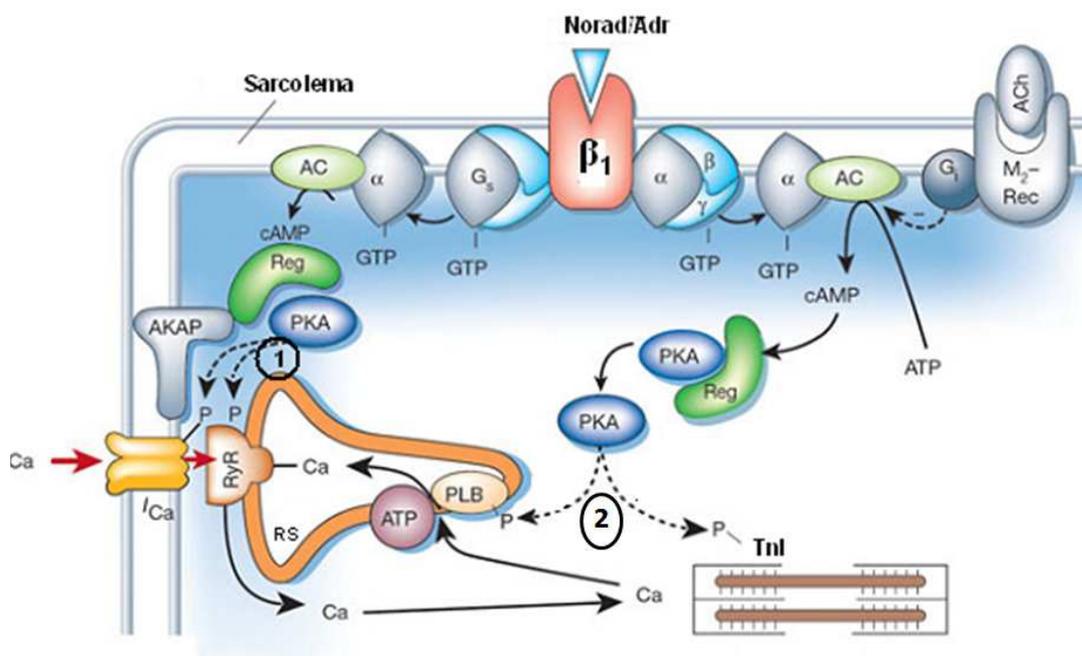


Figura 3: Ativação  $\beta$ -adrenérgica no miócito cardíaco. 1) Fosforilação dos canais de cálcio do sarcolema e dos receptores de rianodina, responsáveis pelo aumento do cálcio intracelular e efeito inotrópico positivo; 2) Fosforilação do fosfolambam e da troponina I, promovendo efeito lusitrópico positivo. ATP- trifosfato de adenosina; PLB- fosfolambam; TnI- troponina I; RyR- receptor de rianodina. Modificado de Bers, 2002

### 1.5.1.3 Responsividade miofibrilar ao cálcio

Alterações na responsividade ao cálcio podem ocorrer por modificação da afinidade da troponina C ao cálcio e pela fosforilação da cadeia leve fosforilável da miosina (MPLC) ou da isoenzima da miosina (Kobayashi & Solaro, 2005).

Muitas são as alterações fisiológicas e fisiopatológicas capazes de diminuir a afinidade da troponina C ao cálcio. Entre elas podemos enfatizar: a hipóxia, a anóxia, acidose, aumento intracelular do fosfato inorgânico e aumento das atividades das proteínas cinases. O mecanismo de Frank-Starling é um mecanismo de auto-regulação heterométrica que aumenta a afinidade dos miofilamentos ao cálcio (Bers, 2002).

### 1.5.1.5 Mudança no pH intracelular

Em condições fisiológicas, o transporte transmembrana mantém o pH intracelular em torno de 7. Algumas condições patológicas e farmacológicas são capazes de alterar o pH intracelular, como: o uso de glicosídeos cardiotônicos (como os digitálicos, que inibem a NKA) e a acidose que ocorre no infarto agudo do miocárdio (Vassallo *et al.*, 2008).

A acidose diminui o número de pontes cruzadas entre actina e miosina geradas e diminui a força produzida pelas pontes que se formaram. Determinando menor eficiência das células miocárdicas, visto que menos força é gerada com o mesmo gasto energético (Williams *et al.*, 1974).

### 1.5.1.6 Estiramento

O mecanismo de auto-regulação heterométrica do coração é mais comumente conhecido como lei de Frank-Starling, que é a modulação da força de contração pelo estiramento do sarcômeros, proporcionando ao coração gênese de força suficiente para bombear mais sangue em resposta ao aumento do retorno venoso e da pressão diastólica final do ventrículo (Konhilas *et al.*, 2002).

O estiramento promove melhor interação entre os miofilamentos e compressão lateral dos filamentos transversos, aumentando a interação actomiosínica. Também, existem propostas que o efeito inotrópico promovido pelo estiramento pode ser

devido a maior liberação mioplasmática de cálcio e a alteração da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (Schneider *et al.*, 2006).

#### 1.5.1.7 Óxido nítrico

O óxido nítrico modula o estado inotrópico cardíaco, seja positiva ou negativamente, dependendo da concentração de NO, da sua taxa de liberação e da presença de estimulação  $\beta$ -adrenérgica (Layland *et al.*, 2002).

O óxido nítrico (NO) liga-se a guanililciclase, levando à formação de GMPc. O GMPc ativa proteínas cinases dependentes de GMPc (PKG), iniciando uma gama de resposta intracelulares (Isoldi e Castrucci, 2008). Em cardiomiócitos, a PKG fosforila a troponina I, diminuindo a afinidade da troponina C ao cálcio. A redução da sensibilidade dos miofilamentos também resulta da acidificação citosólica induzida pela alteração da função do trocador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  via GMPc (Layland *et al.*, 2002). A PKG também é capaz de suprimir o aumento da corrente de cálcio ocasionado pela fosforilação dos canais de cálcio do tipo L pela PKA formada, por exemplo, após uma ativação simpática (Layland *et al.*, 2002).

Já se sabe que a exposição aguda e a altas concentrações de mercúrio causa alterações importantes no aparelho cardiovascular (Su & Chen, 1979; Massaroni *et al.*, 1995; Rossoni *et al.*, 1999; Cunha *et al.* 2001). No entanto, ainda são escassos na literatura estudos que demonstram os efeitos cardiovasculares de uma exposição crônica e a concentrações nanomolares, possíveis de serem encontradas em indivíduos expostos ocupacionalmente.

## ***OBJETIVOS***

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição por 30 dias à 20 nM de HgCl<sub>2</sub> nos parâmetros cardiovasculares de ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com HgCl<sub>2</sub> sobre o ganho de peso corporal e peso das câmaras ventriculares.
- Comparar os parâmetros cardiovasculares *in vivo* de ratos expostos por 30 dias a 20 nM de HgCl<sub>2</sub> com ratos expostos a salina.
- Estudar a função ventricular esquerda de corações isolados dos ratos expostos à 20 nM de HgCl<sub>2</sub> e salina frente a intervenções heterométricas e homeométricas.
- Investigar os efeitos do tratamento crônico com HgCl<sub>2</sub> sobre o inotropismo cardíaco, parâmetros temporais, atividade do retículo sarcoplasmático, permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio e responsividade das proteínas contráteis em músculos papilares isolados de ventrículo esquerdo de ratos.
- Analisar as alterações nas atividades enzimáticas da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e ATPase miosinica promovidas pelo tratamento crônico com baixa concentração de HgCl<sub>2</sub> em corações de ratos.

***MATERIAIS E  
MÉTODOS***

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com idade aproximada de três meses e pesando entre 250 e 300 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração, sob controle da temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os experimentos foram realizados conforme as normas de legislação e ética para a prática Didático-Científico da vivisseção de animais de acordo com a Lei n.º 6.638, de 08 de maio de 1979. Os protocolos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA/EMESCAM).

### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos, de mesmo tamanho, denominados: Controle e Mercúrio.

O grupo Controle recebia, diariamente, injeções intramusculares de salina (NaCl 0.9% - 0,1 mL/300g de rato) durante um período de 30 dias.

Os ratos pertencentes ao grupo Mercúrio recebiam, no primeiro dia do tratamento, uma injeção intramuscular contendo quantidade suficiente de solução de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), dissolvido em salina, para atingir a concentração plasmática de 20 nM (4,34  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Nos dias subseqüentes, levando em consideração que a meia-vida do  $\text{HgCl}_2$  é 37 dias (Azevedo, 2003), os ratos recebiam doses diárias de reforço (0,07  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) contendo somente a quantidade que eles excretariam em um dia, segundo protocolo experimental desenvolvido por Wiggers *et al.* (2008).

Para realização dos protocolos experimentais três tratamentos crônicos foram realizados. Os ratos pertencentes ao primeiro tratamento (n=24) foram utilizados para aquisição dos parâmetros hemodinâmicos, dos seus pesos corporais e para realização da técnica de músculos isolados (papilar). Durante a realização dos experimentos, três ratos morreram em durante o uso do anestésico. Dois pertencentes ao grupo Controle e um ao grupo Mercúrio.

Os ratos que pertenciam ao segundo tratamento (n=26) foram utilizados para realização da preparação de coração isolado e pesagem dos ventrículos direito e esquerdo dos corações. Sendo seis corações do grupo Controle e seis do grupo Mercúrio.

O terceiro tratamento (n=48) foi realizado para retirada de corações, que foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a  $-20^\circ\text{C}$ , para utilização em mensurações bioquímicas das atividades específicas da  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase miosínica (CAM) e  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase (NKA).

### 3.3 AVALIAÇÃO PONDERAL

No início e no fim do tratamento os ratos dos grupos Controle e Mercúrio foram pesados para avaliação do ganho ponderal.

Os corações dos ratos de ambos os grupos, após realização dos protocolos em corações isolados, tiveram seus ventrículos direito e esquerdo separados e posteriormente pesados. O procedimento de dissecação dos ventrículos foi realizado pelo mesmo pesquisador, com cuidado na equidade da conduta.

### 3.4 AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR *in vivo*

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretana (1,2 g/ Kg) e submetidos à cirurgia de cateterização da veia jugular e artéria carótida direitas para mensuração dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. As canulações foram realizadas com um cateter de polietileno (PE 50, Clay-Adams) preenchido com salina heparinizada (100 UI/ml).

As pressões foram mensuradas através de um transdutor de pressão (TSD 104A-Biopac conectado a um pré-amplificador Funbec MP-100) e registradas em um microcomputador por um sistema de aquisição de dados (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA). Os dados de frequência cardíaca foram obtidos indireta e concomitantemente a partir dos registros de pressão. Para a aquisição dos dados foi utilizada taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo. As derivadas temporais (dP/dt) máxima e mínima foram obtidas *offline* dos registros de ondas de pressão intraventricular.

Após período de estabilização de 20 minutos foram avaliadas, em ratos dos grupos Controle e Mercúrio, por registro contínuo:

- 1) Pressões arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM); e frequência cardíaca (FC).
- 2) Foram avaliados os seguintes parâmetros, em ambos os ventrículos: pressão sistólica intraventricular, pressão diastólica final (PDf), primeira derivada temporal da pressão positiva (dP/dt máx) e negativa (dP/dt min). Para realização dessas medidas foram cateterizados os ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE), pela introdução do cateter através da veia jugular direita (VD) e através da artéria carótida direita (VE).

A figura 4 demonstra registros típicos, obtidos de ratos *in vivo*, dos parâmetros hemodinâmicos.

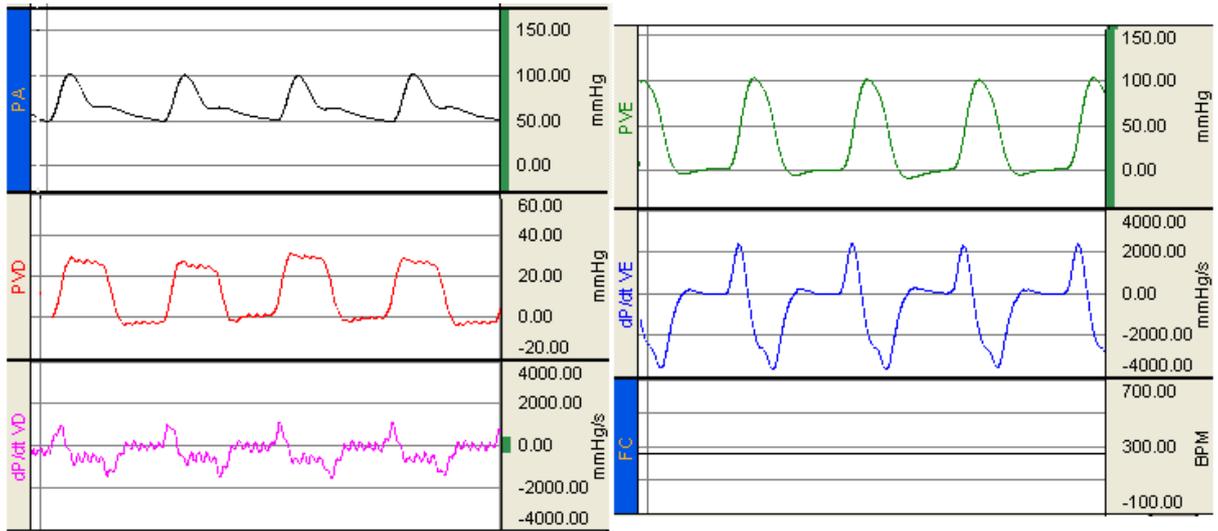


Figura 4: Registros típicos dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. Pressão arterial (PA); Pressão do ventrículo direito (PVD); Derivadas temporais do ventrículo direito (dP/dt VD); Pressão do ventrículo esquerdo (PVE); Derivadas temporais do ventrículo esquerdo (dP/dt VE); Frequência cardíaca (FC).

### 3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDÍACOS EM CORAÇÕES ISOLADOS

Após o término do tratamento crônico, os animais receberam injeções intraperitoneais de uretana sódica (1,2 g / kg) para indução anestésica, e de heparina sódica (40 U) para evitar a formação de coágulos sanguíneos durante a manipulação dos corações. Depois de anestesiados, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, o tórax aberto e o coração exposto. As artérias derivadas do arco aórtico foram amarradas com fio de algodão. O coração foi retirado e perfundido retrogradamente através da aorta com solução *Krebs-Henseleit* (em mM): NaCl=120, KCl=5.4, MgCl<sub>2</sub>=1.2, CaCl<sub>2</sub>=1.25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=2, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=1.2, NaHCO<sub>3</sub>=24, glicose=11; pH 7,4 e 34° C e gaseificada com mistura carbogênica (5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>) através do coto aórtico com fluxo constante de 10 mL/min, de acordo com a técnica de Langendorff (Langendorff, 1898; Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007). Um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador Funbec MP-100) ligado ao sistema de perfusão foi utilizado para medida e acompanhamento da pressão de perfusão coronariana (PPC). A pressão coronariana é igual ao produto da resistência coronariana pelo fluxo. Como o fluxo é mantido constante, mudanças na pressão coronariana retratam alterações na resistência da circulação coronariana.

O átrio direito (AD) foi retirado visando a remoção do nódulo sinoatrial, e a frequência de estimulação elétrica foi fixada em 200 bpm através de dois eletrodos (Ag/AgCl) colocados em contato com o meio contendo a solução nutritiva previamente citada. Os pulsos elétricos eram retangulares, com intensidade de 10 V e com duração de 10 a 12 ms. O átrio esquerdo foi aberto e um balão de látex inflável com água, conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador Funbec MP-100) foi introduzido na cavidade ventricular esquerda para controle da pressão diastólica isovolumétrica (PD) e mensuração da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e suas derivadas temporais positiva e negativa (dP/dt máx e min). O transdutor era mantido conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems: Inc; CA) e esses registrados em computador pelo *software* Biopac Student Lab utilizando taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo. As derivadas de pressão foram obtidas indiretamente, através das ondas de pressão isovolumétricas dos ventrículos esquerdos, após o término dos experimentos pelo mesmo *software*

(filtro digital Blackman -61dB com frequência de corte de 250 Hz e taxa de amostragem de 5000/s).

A PD foi fixada em 5 mmHg, através da inflação do balão de látex contido na cavidade ventricular, e as preparações mantidas por um período de estabilização de 20 minutos. Após esse período foram realizadas as mensurações de PPC, PSIVE e derivadas temporais (figura 5); e iniciados os protocolos experimentais em corações de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Em todos os momentos o fluxo foi mantido constante (10 ml/min) e foram medidas a PPC, a PSIVE e suas derivadas temporais.

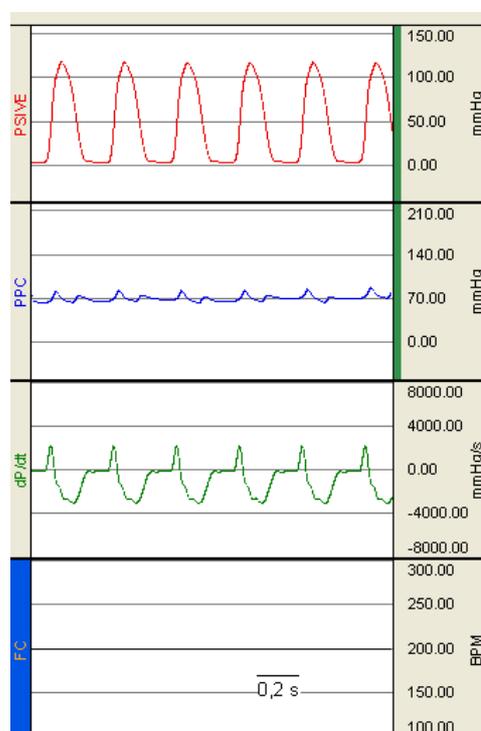


Figura 5: Registros típicos obtidos de uma preparação de coração isolado perfundido com fluxo constante de 10 mL/min com solução nutritora de Krebs, demonstrando a pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE); a pressão de perfusão coronariana (PPC); derivada temporal de pressão (dP/dt) e frequência cardíaca (FC).

### 3.5.1 Protocolos experimentais

#### 3.5.1.1 Intervenção Heterométrica

Neste protocolo foi avaliada a resposta ao aumento da PD. A PD era incrementada por inflação do balão de látex localizado na cavidade ventricular esquerda (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mmHg). Essa manobra é conhecida como curva de função ventricular ou curva de Frank-Starling (Stefanon *et al.*, 1990).

#### 3.5.1.2 Intervenções Homeométricas

Foi mensurada a resposta  $\beta$ -adrenérgica, realizada com a injeção *in bolus* (0.1 mL) do agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol ( $10^{-5}$  M). A resposta  $\beta$ -adrenérgica foi medida como incremento da pressão sistólica isovolumétrica desenvolvida, e das derivadas temporais imediatamente após a injeção de isoproterenol. Para realização deste protocolo os corações isolados foram perfundidos com solução nutritora na qual a concentração de cálcio era 0,625 mM (Vassallo *et al.*, 1994). A figura 6 ilustra a PSIVE, as derivadas temporais e a FC antes e após a injeção *in bolus* de isoproterenol.

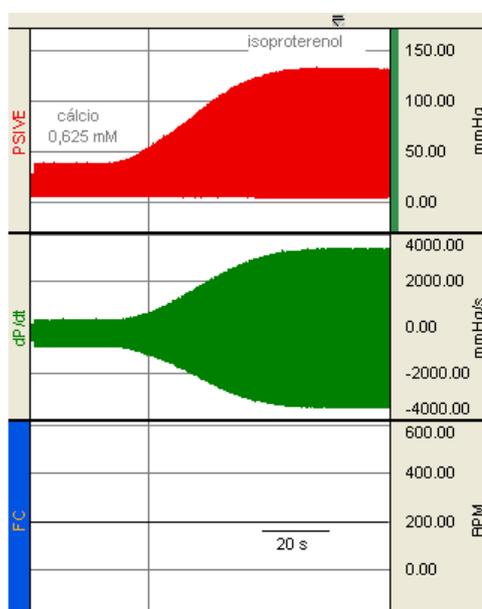


Figura 6: Registros típicos da resposta homeométrica ao isoproterenol. Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE); derivada máxima de pressão positiva e negativa (dP/dt) e frequência cardíaca (FC).

### 3.6 MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS

Após a mensuração dos parâmetros hemodinâmicos, os ratos foram sacrificados, submetidos à toracotomia, os corações removidos e perfundidos retrogradamente através do coto aórtico com solução nutritiva para permitir adequada seleção e dissecação dos músculos papilares da parede anterior e posterior do ventrículo esquerdo (VE). Os músculos papilares removidos eram fixados por argolas, e então presos em uma extremidade fixa e outra ligada a um transdutor de força, dentro de câmaras de vidro com volume de 20 ml contendo solução de *Krebs-Henseleit* gaseificada com mistura carbogênica (5% de O<sub>2</sub> e 95% de CO<sub>2</sub>). Para evitar a possibilidade de hipóxia, os experimentos eram realizados sob baixa temperatura (26° C) como previamente descrito (Vassallo e Paes de Carvalho, 1979).

Os músculos papilares do VE eram estirados até L<sub>max</sub> (comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima) e estimulados eletricamente por pulsos retangulares (uma e meia vezes o limiar, duração de 12 ms) através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo. A frequência de estimulação padrão era de 0,5 Hz. A força desenvolvida foi medida através de transdutor de força isométrica (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA) acoplado a um amplificador (DA100C Byopac Systems, Inc; CA) e registrados em sistema de aquisição de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA) com taxa de amostragem de 500 amostras/segundo. A força de contração isométrica desenvolvida foi corrigida pelo peso dos músculos (Controle: 4,75 ± 0,44 mg, n=22; Mercúrio: 4,98 ± 0,68 mg, n=22). Após um período de 60 minutos de estabilização iniciou-se o protocolo experimental.

#### 3.6.1 Protocolos experimentais

##### 3.6.1.1 Força de contração isométrica e parâmetros temporais

Após o período de estabilização foram medidas a força isométrica desenvolvida e os parâmetros temporais (TA- tempo de ativação; TR- tempo de relaxamento) em músculos papilares de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Os resultados de força isométrica estão expressos em gramas por miligramas de peso do músculo. Os tempos de ativação e relaxamento são os tempos despendidos, respectivamente, do

início da contração até o pico máximo de força e do pico máximo até o período de relaxamento isométrico (Vassallo *et al.*, 2008). A figura 7 representa registros típicos de contrações isométricas e a figura 8 o pico e parâmetros temporais dessas contrações.

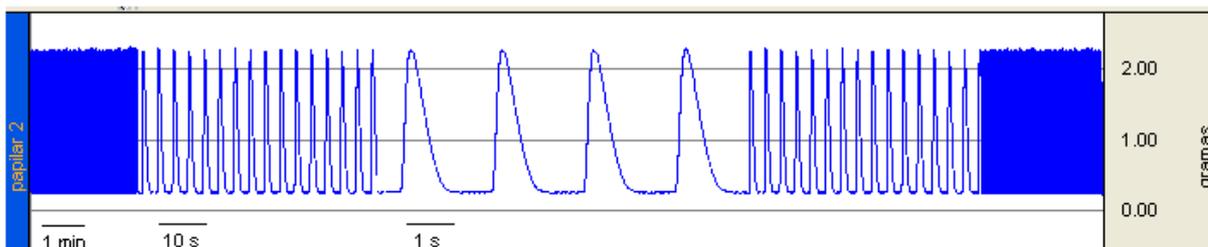


Figura 7: Registro típico de contrações isométricas desenvolvidas por músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos nutridos com solução Krebs.



Figura 8: Registro típico evidenciando os parâmetros temporais da contração isométrica de músculos papilares de VE de ratos.

### 3.6.1.2 Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos

A potenciação relativa foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração antes da pausa, objetivando avaliar a atividade do retículo sarcoplasmático (RS) (Vassallo e Mill, 1987; Leite *et al.*, 1991; Mill *et al.*, 1992) em músculos papilares dos grupos Controle e Mercúrio. A figura 9 representa registros típicos das contrações isométricas de músculos papilares de VE da ratos obtidas antes e após pausas de 15, 30 e 60 segundos na estimulação elétrica.

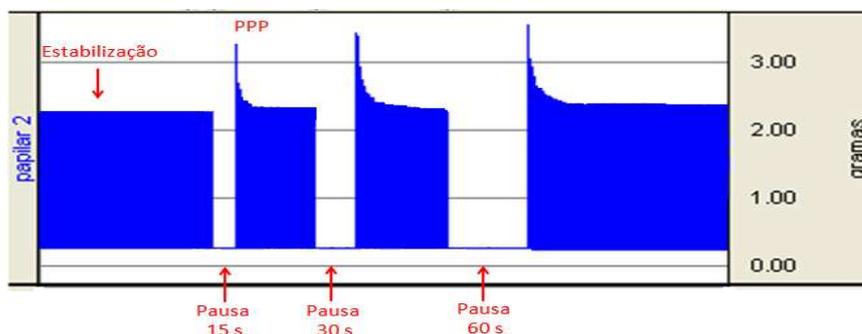


Figura 9: Registros típicos de contrações isométricas após estabilização e potenciações pós-pausas (PPP) obtidas após pausas de 15, 30 e 60 s em músculos papilares de VE de ratos.

### 6.1.3 Variação da freqüência de estimulação elétrica

Foram realizadas alterações na freqüência de estimulação elétrica (0,1; 0,2; 0,5; 0,75 e 1,0 Hz) e mensuradas as forças isométricas desenvolvidas pelos músculos papilares, após estabilização em cada freqüência (figura 10) (Mill *et. al.*, 1994).

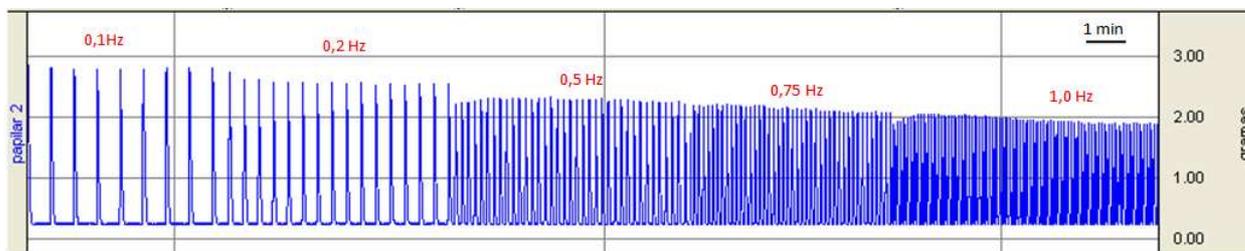


Figura 10: Registros típicos de contrações isométricas desenvolvidas por músculos papilares de VE de ratos em diferentes freqüências de estimulação elétrica.

### 3.6.1.4 Força desenvolvida durante contrações tetânicas

Após 30 minutos de exposição à solução nutritora *Krebs-Henseleit* contendo 5 mM de cafeína as contrações tetânicas foram obtidas pela estimulação elétrica numa freqüência de 10 Hz, e duração de 15 segundos, como descrita previamente (LEITE *et al.*, 1995). As contrações tetânicas seguem o padrão mostrado na figura 11. Para fins experimentais utilizamos a força desenvolvida nos picos e platôs dessas contrações características. Essa manobra é utilizada com a finalidade de investigar os efeitos do tratamento crônico com  $HgCl_2$  nas proteínas contráteis.

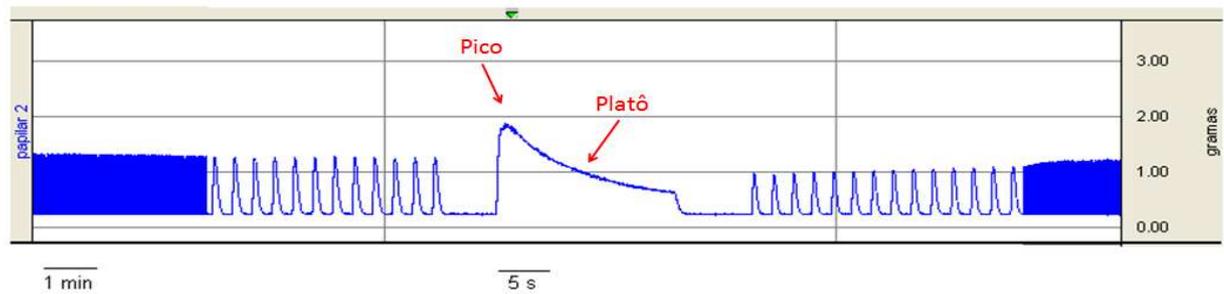


Figura 11. Registro típico de uma contração tetânica, indicando o pico e platô dessas contrações características.

### 3.6.1.5 Força desenvolvida após repouso de 10 minutos

Os músculos foram repetidamente lavados com solução Krebs Henseleit, porém sem conter sais de cálcio (“Ca free”) em sua composição e contendo 10 mM de cafeína, até as contrações serem abolidas. A cafeína depleta os estoques intracelulares de cálcio por se ligar aos receptores de rianodina (Bassani *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1995) e a exposição a solução sem cálcio na sua composição facilita a extrusão de cálcio pelo sarcolema (Vassallo *et al.*, 2008). Então o estímulo elétrico era cessado por 10 minutos. Segundos antes de a estimulação ser reiniciada, as preparações eram reperfundidas com solução *Krebs-Henseleit* normal. Desta forma, a contração após a pausa de 10 minutos é dependente do cálcio proveniente do meio extracelular, visto que os estoques intracelulares foram depletados.

Os dados de força após pausa de 10 minutos são representados como razão entre a força desenvolvida após o estímulo ser reiniciado e a força desenvolvida imediatamente antes de o músculo ser exposto à solução Krebs-Henseleit “Ca-free”.

### 3.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA

#### 3.7.1 $\text{Ca}^{2+}$ - ATPase miosínica

Possíveis alterações induzidas pelo tratamento crônico por 30 dias com mercúrio na atividade da ATPase miosínica foram analisadas em conformidade com protocolo previamente descrito (Claude & Swynghedauw, 1975 e Cappelli *et al.*, 1989). A miosina foi preparada a partir de ventrículos esquerdos homogeneizados e tratados com tampão fosfato (0,3 M KCl, 0,2 M tampão fosfato  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ , pH 6,5) (Bremel & Weber, 1975). Após precipitação da miosina e resíduos musculares por diluição (15 vezes com água), os resíduos musculares eram separados por filtração utilizando-se gaze. O sobrenadante contendo a miosina era centrifugado a 33.000 g por 40 minutos. Após decantação do sobrenadante, o precipitado era novamente dissolvido em 0,6 M KCl e, conseqüentemente, a miosina era diluída sob alta força iônica (1 ml de água era adicionado para cada grama de tecido para produzir nova precipitação). O material era novamente centrifugado a 33.000 g por 40 minutos e o resíduo muscular era separado por filtração. O material era mais uma vez dissolvido, agora, em 14 ml de água por grama de tecido centrifugado. O precipitado era dissolvido em 5 mM HEPES, pH 7, e 0,6 M KCl mais 50 %, v/v, de glicerol e estocado a  $-20^\circ\text{C}$ . Para o uso da miosina estocada, esta era diluída em água (1:12) e centrifugada a 3.000 g por 15 minutos. O precipitado era ressuspenso em 50 mM HEPES, pH 7, e 0,6 M KCl, e centrifugado a 3.000 g novamente. O sobrenadante era utilizado.

A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase miosínica era avaliada pela determinação da liberação de fosfato ( $\text{P}_i$ ) a partir do ATP 1 mM na presença de HEPES 50 mM, pH 7, KCl 0,6 M,  $\text{CaCl}_2$  5mM ou EGTA no corações dos ratos do grupo controle e do grupo mercúrio num volume final de 200  $\mu\text{l}$ . O nucleotídeo foi adicionado ao meio da reação e pré-incubado por 5 minutos a  $30^\circ\text{C}$ . A reação era iniciada através da adição de fração da enzima (3 a 5  $\mu\text{g}$  proteína) ao meio de reação por 10 minutos. O tempo de incubação e a concentração de proteína foram escolhidos no sentido de assegurar a linearidade da reação. A reação foi interrompida através da adição de 200  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético a 10%. Os controles com a adição de preparação de enzima, após a adição de ácido tricloroacético, foram utilizados para corrigir a hidrólise não enzimática do substrato. Todas as amostras foram realizadas em duplicata. A atividade da enzima foi calculada como a diferença entre a atividade observada na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e na presença de 10 mM EGTA. O fosfato

inorgânico foi determinado pelo método de Chan *et al.*, 1986. A atividade específica foi expressa como nmol P<sub>i</sub> liberado por minuto por mg de proteína. A proteína foi determinada pelo método *Coomassie Blue* de acordo com Bradford, 1976, usando-se albumina como padrão.

### 3.7.2 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase

O material enzimático utilizado para avaliar possíveis efeitos provocados pelo tratamento crônico com 20 nM de cloreto de mercúrio na atividade da bomba de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> foi obtido, essencialmente, como previamente descrito (Velema & Zaagsma, 1981), com as seguintes modificações:

Cada ventrículo foi homogeneizado em 4 ml de solução Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM (pH 7.0) , usando um homogeneizador de tecidos, por 4 períodos de 7 segundos com intervalos de 15 segundos de descanso.

O homogeneizado era centrifugado a 8.800 rpm por 20 minutos e, em seguida, o precipitado era descartado. Ao sobrenadante era adicionado volume equivalente de solução de Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM (pH 7.0) e em seguida era centrifugado novamente a 10.000 rpm por 1 hora.

O precipitado era ressuspensionado, na mesma solução que foi homogeneizado, em um volume que proporcionasse uma quantidade de 0,5 mg/ml de proteína.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A atividade enzimática determinada pela diferença de atividade de hidrólise de ATP (concentração final 3,0 mM) entre um meio que continha MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM, NaCl 125 mM, KCl 20 mM e Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e um meio idêntico a esse, exceto que continha ouabaína na concentração final de 5 mM.

Assim pode-se definir como atividade Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> – ATPásica aquela porção da atividade ATPásica total inibida pela ouabaína.

As frações (10 a 50 µg de proteína) eram pré-incubadas por 5 minutos a 37 °C e a reação iniciada pela adição de ATP. O tempo de reação era de 15 minutos. A reação foi interrompida através da adição de ácido tricloroacético (concentração final 5%). O fosfato liberado foi determinado pelo método descrito por Moreira *et al.* (2003).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A avaliação foi feita por análise de variância (ANOVA), uma ou duas vias, não randomizada; quando encontrada diferença estatística o teste *post hoc* de Fisher LSD era empregado. Para comparação de médias foi empregado o teste *t* de Student não pareado. Foram considerados estatisticamente significantes valores de  $p < 0,05$ .

Para realização da análise dos dados por ANOVA duas vias, seguida de *post hoc* de Fisher LSD foi utilizado o programa GB-STAT 6.5 for Windows (Dynamic Microsystem INC., Silver Spring, MD, USA). Para as demais análises estatísticas e plotagem de todos os gráficos foi empregado o GraphPad Prisma 4.0 (San Diego, CA, USA).

### 3.9 FÁRMACOS E REAGENTES

Cloreto de sódio - NaCl (Vetec)

Cloreto de magnésio Hexahidratado -  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (Merck)

Cloreto de potássio - KCl (Merck)

Cloreto de cálcio dihidratado -  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Merck)

Bicarbonato de sódio -  $NaHCO_3$  (Merck)

Sulfato de sódio -  $Na_2SO_4$  (Merck)

Fosfato de sódio monobásico -  $NaH_2PO_4$  (Merck)

Cafeína (B. Herzog)

L-Isoproterenol (Sigma)

Heparina sódica (Roche)

Uretana sódica (Sigma)

Cloreto de mercúrio (Sigma)

Glicose (Vetec)

$KH_2PO_4$  (Merck)

HEPES (Sigma)

Glicerol (Reagen)

EGTA (sigma)

Ácido tricloroacético (Merck)

Albumina (Sigma)

Tris-HCl (Sigma)

EDTA (Sigma)

Álcool polivinílico (Merck)

Molibdato de amônio (Nuclear)

Ácido clorídrico – HCl (Merck)

***RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO PONDERAL

Com o objetivo de avaliar o ganho de peso corporal dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio, foi realizada a pesagem desses animais imediatamente antes do início do tratamento e ao fim de 30 dias de tratamento. Como apresentado na tabela 3 e figura 12 os ratos, ao início do tratamento, possuíam a mesma média de peso corporal, e o tratamento com mercúrio ou salina não interferiu no ganho de peso destes ratos após 30 dias de tratamento.

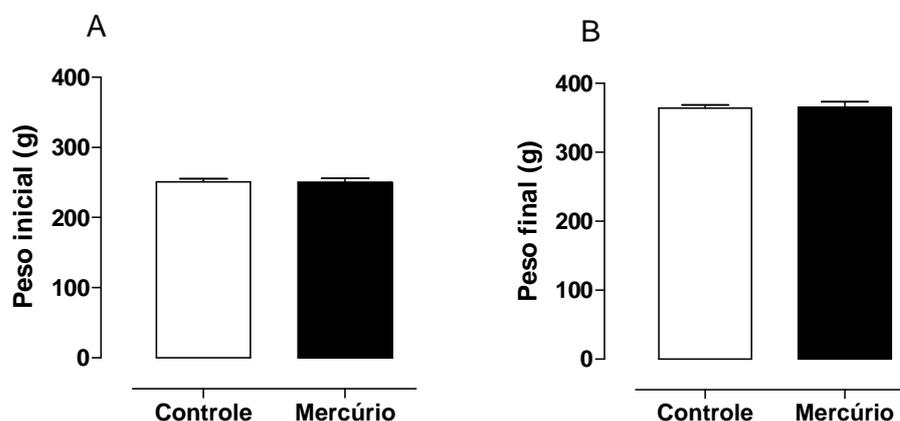


Figura 12: Avaliação do ganho ponderal nos grupos Controle (n=12) e Mercúrio (n=12). A- Peso corporal dos ratos ao início do tratamento. B- Peso corporal dos ratos ao término do tratamento. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM.  $p > 0,05$ , Teste *t* de Student não pareado.

Ao fim da realização dos protocolos em corações isolados, esses órgãos foram cuidadosamente dissecados e seus ventrículos direito e esquerdo separados. Como demonstrado na figura 13 e tabela 3, não houve diferença entre os pesos absolutos de ambos os ventrículos quando comparados corações de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. O mesmo foi encontrado quando os pesos dos ventrículos foram corrigidos pelo peso corporal de cada rato.

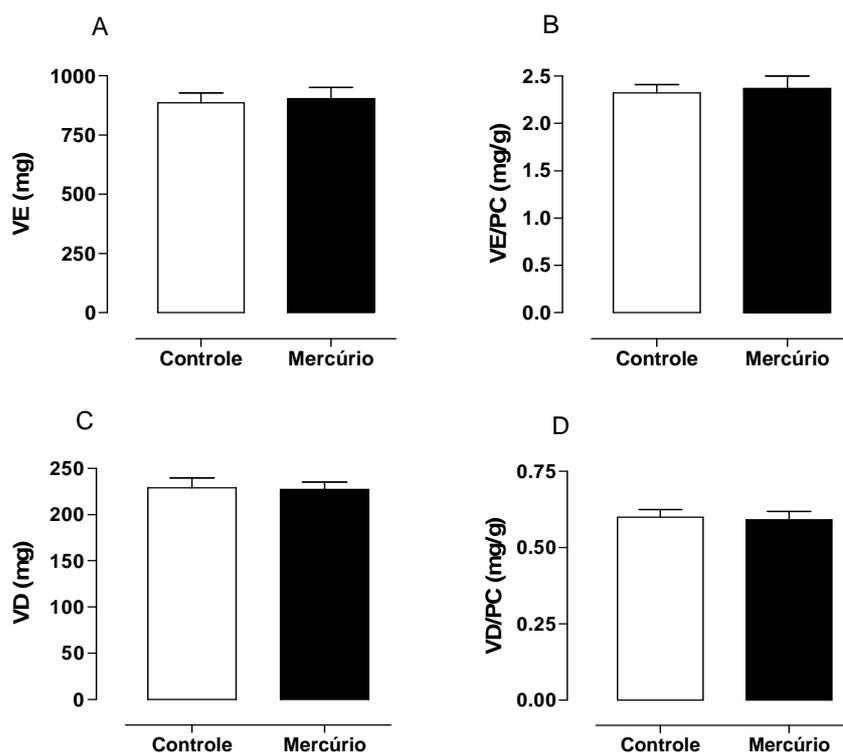


Figura 13: Avaliação ponderal das câmaras cardíacas em ratos dos grupos Controle (n=13) e Mercúrio (n=13). A- Peso do ventrículo esquerdo (VE); B- Razão do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal dos ratos (VE/PC); C- Peso do ventrículo direito (VD); D- Razão do peso do ventrículo direito pelo peso corporal dos ratos (VD/PC). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM.  $p > 0,05$ , Teste  $t$  de Student não pareado.

Tabela 3: Dados da avaliação ponderal dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

	Controle	n	Mercúrio	n	p
PC inicial (g)	251 ± 4	12	251 ± 5	12	0,94
PC final (g)	364 ± 5	12	365 ± 8	12	0,89
VE (g)	886 ± 42	13	904 ± 47	13	0,78
VE/PC (mg/g)	2,3 ± 0,1	13	2,4 ± 0,1	13	0,75
VD (g)	229 ± 11	13	227,3 ± 8	13	0,89
VD/PC (mg/g)	0,6 ± 0,02	13	0,6 ± 0,03	13	0,80

Peso corporal inicial (PC inicial); Peso corporal final (PC final); Peso dos pulmões (PP); peso dos rins (PR); Peso do fígado (PF); Peso ventricular esquerdo (VE); Relação peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal (VE/PC); Peso ventricular direito (VD); Relação peso do ventrículo direito pelo peso corporal (VD/PC). Teste *t* de Student não pareado.

#### 4.2 AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR *in vivo*

Todos os dados da avaliação cardiovascular *in vivo* estão representados na tabela 4 e também nas figuras 14, 15 e 16. Como demonstrado na figura 14, não houve diferença nas PAM, PAD, PAS e FC, entre os grupos tratados com salina e HgCl<sub>2</sub>. Quando avaliada a cavidade ventricular esquerda (figura 15), a única alteração encontrada nos ventrículos de ratos pertencentes ao grupo Mercúrio quando comparados aos ratos do grupo Controle foi aumento da PDfVE ( $p=0,005$ ). Os demais parâmetros ventriculares esquerdos (PSVE, dP/dt máx VE e dP/dt min VE) e também todos os parâmetros da cavidade ventricular direita (dP/dt min VD, dP/dt Max VD, PDfVD e PSVD), como representado na figura 16, são estatisticamente semelhantes entre os grupos.

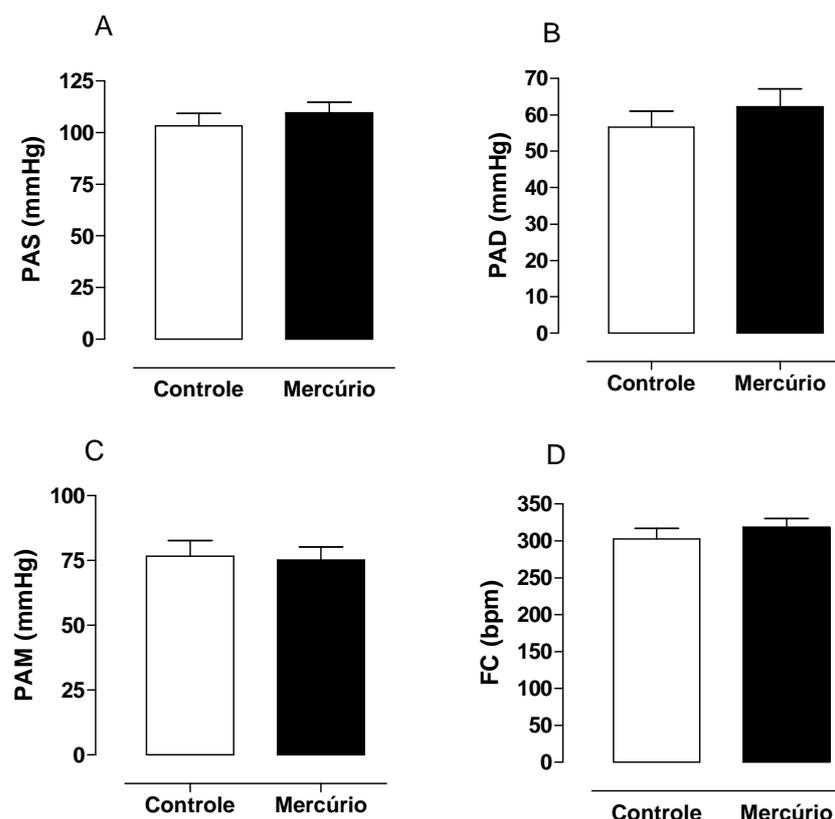


Figura 14: Avaliação hemodinâmica *in vivo* dos ratos dos grupos Controle (n=10) e Mercúrio (n=11). A- Pressão arterial sistólica (PAS); B- Pressão arterial diastólica (PAD); C- Pressão arterial média (PAM); D- Frequência cardíaca (FC). Dados expressos como Média ± EPM.  $p > 0,05$ , Teste *t* de Student não pareado.

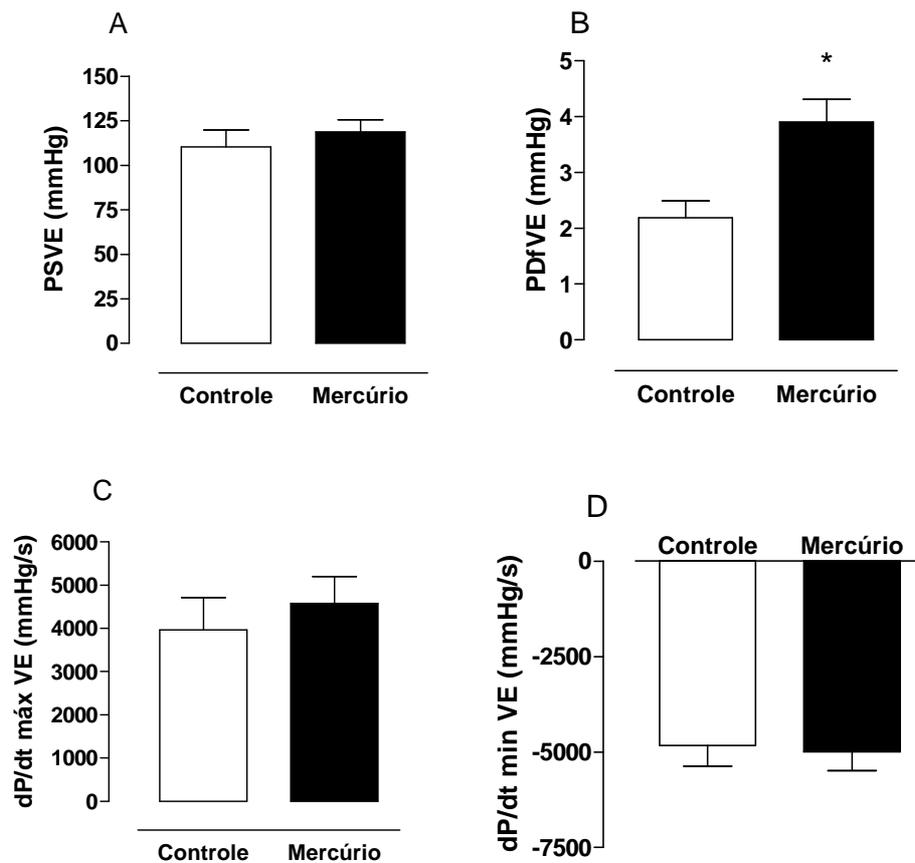


Figura 15: Avaliação dos parâmetros do ventrículo esquerdo *in vivo* dos ratos dos grupos Controle (n=8) e Mercúrio (n=10). A- Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); B- Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE); C- Derivada de pressão por derivada de tempo máxima do ventrículo esquerdo (dP/dt máx VE); D- Derivada de pressão por derivada de tempo mínima do ventrículo esquerdo (dP/dt min VE). Dados expressos como Média ± EPM. Teste *t* de Student não pareado. \**p* <0,05 vs Controle.

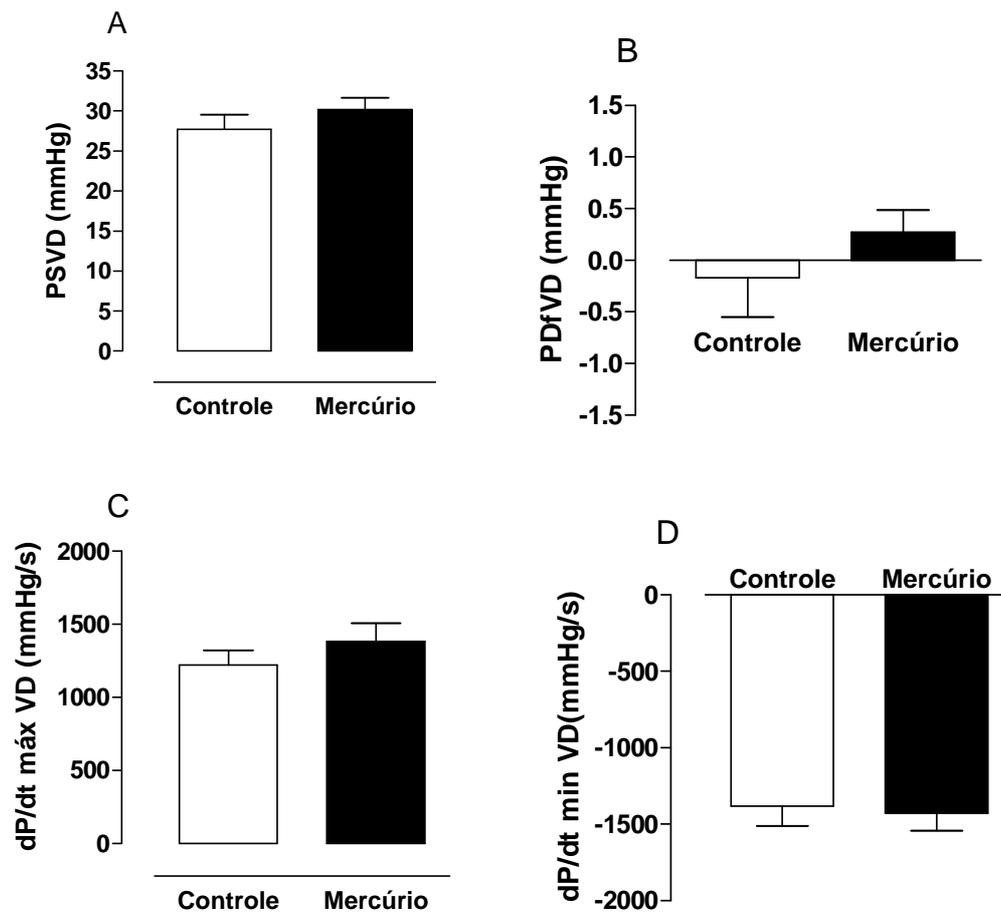


Figura 16: Avaliação dos parâmetros do ventrículo direito *in vivo* dos ratos dos grupos Controle (n=10) e Mercúrio (n=10). A- Pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD); B- Pressão diastólica final do ventrículo direito (PDfVD); C- Derivada de pressão por derivada de tempo máxima do ventrículo direito (dP/dt máx VD); D- Derivada de pressão por derivada de tempo mínima do ventrículo direito (dP/dt min VD). Dados expressos como Média ± EPM.  $p > 0,05$ , Teste *t* de Student não pareado.

Tabela 4: Dados da avaliação cardiovascular *in vivo* dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

	Controle	n	Mercúrio	n	p
FC (bpm)	303 ± 14	10	319 ± 12	11	0,40
PAS (mmHg)	103 ± 6	10	110 ± 5	11	0,43
PAD (mmHg)	57 ± 4	10	62 ± 5	11	0,41
PAM (mmHg)	77 ± 6	10	75 ± 5	11	0,86
PSVE (mmHg)	110 ± 9	8	119 ± 7	10	0,47
PDfVE (mmHg)	2,2 ± 0,3	8	3,9 ± 0,4*	10	<0,01
dP/dt máx VE (mmHg/s)	3972 ± 740	8	4579 ± 617	10	0,53
dP/dt min VE (mmHg/s)	4827 ± 547	8	4995 ± 495	10	0,82
PSVD (mmHg)	27,7 ± 1,9	10	30,2 ± 1,4	10	0,30
PDfVD (mmHg)	-0,2 ± 0,4	10	0,3 ± 0,2	10	0,31
dP/dt máx VD (mmHg/s)	1221 ± 102	10	1382 ± 126	10	0,33
dP/dt min VD (mmHg/s)	1382 ± 130	10	1429 ± 115	10	0,79

Frequência cardíaca (FC); Pressão arterial sistólica (PAS); Pressão arterial diastólica (PAD); Pressão arterial média (PAM); Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE); Derivada máxima de pressão positiva (dP/dt Max VE) e negativa (dP/dt min VE) do ventrículo esquerdo; Pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD); Pressão diastólica final do ventrículo direito (PDfVD); Derivada de pressão por derivada de tempo máxima (dP/dt máx VD) e mínima (dP/dt min VD) do ventrículo direito. Teste *t* de Student não pareado. \*p <0,05 vs Controle.

### 4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDÍACOS EM CORAÇÕES ISOLADOS

Após estabilização da preparação de corações isolados a PSIVE, dP/dt máx e min foram mensuradas em ventrículos esquerdos de ratos dos grupos Mercúrio e Controle. Houve diminuição de todos os parâmetros analisados no momento da estabilização, como demonstrado na figura 17. A PSIVE de ratos do grupo Mercúrio foi cerca de 15% menor que a desenvolvida por ventrículos de ratos do grupo Controle ( $p=0,036$ ). As derivadas temporais também sofreram significativa diminuição. As dP/dt max e min sofreram redução de, respectivamente, 29 e 19%.

A pressão de perfusão coronariana (PPC) foi semelhante entre os grupos e manteve-se inalterada no decorrer dos protocolos realizados (figuras 17-D, 18-D e 19-D).

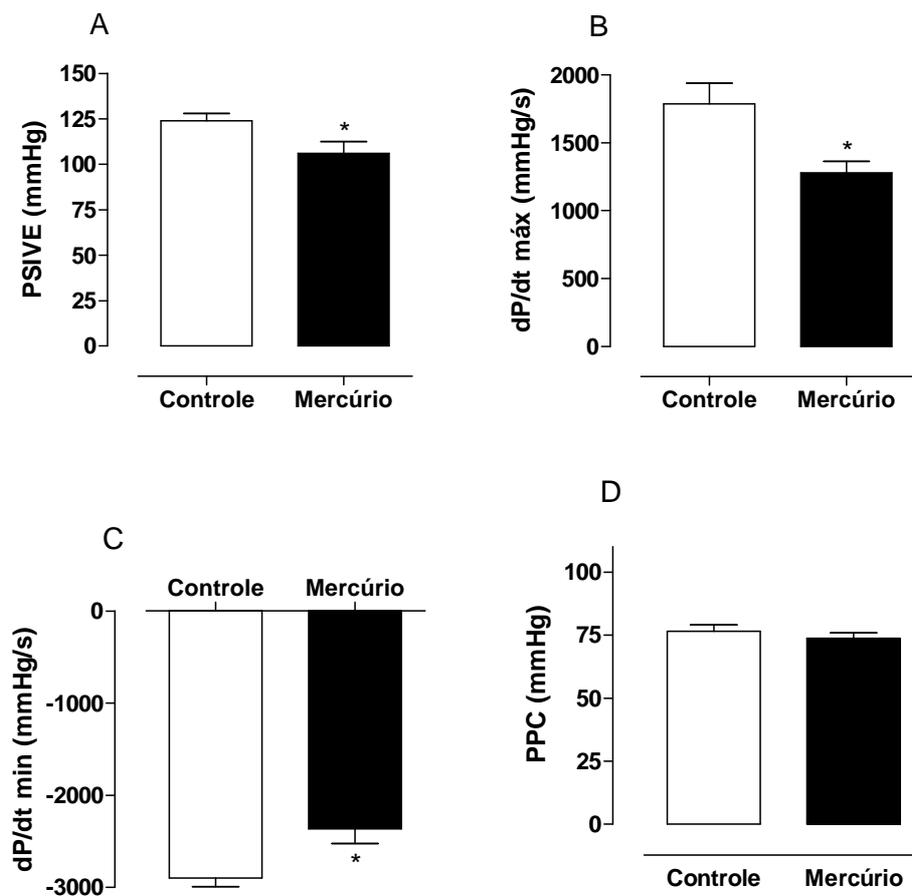


Figura 17: Valores de pressão sistólica isovolumétrica, derivadas temporais e pressão de perfusão coronariana de corações isolados de ratos do grupo Controle (n=7) e do grupo Mercúrio (n=7) após estabilização. A- Pressão sistólica isovolumétrica do Ventrículo esquerdo (PSIVE); B- Derivada de pressão por derivada de tempo máxima (dP/dt máx); C- Derivada de pressão por derivada de tempo mínima (dP/dt min); D- Pressão de perfusão coronariana. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste *t* de Student não pareado. \*p < 0,05 vs Controle.

#### 4.3.1 Intervenção Heterométrica

Por meio da inflação do balão de látex contido do interior da cavidade ventricular esquerda era possível incrementar a PDIVE e avaliar como os parâmetros cardíacos reagiam ao estiramento da parede ventricular. Como esperado, o aumento da PDIVE promove aumento da PSIVE em ambos os grupos. Porém, em todos os valores de PDIVE, exceto na pressão diastólica 5 mmHg, as PSIVE desenvolvidas pelos ventrículos de ratos do grupo Mercúrio são menores que as desenvolvidas por ventrículos de ratos do grupo Controle (figura 18). Quando o desenvolvimento de pressão é plotado em função do tempo também é encontrada diferença significativa, demonstrado por diminuição das dP/dt máx e min em todos os valores de PDIVE.

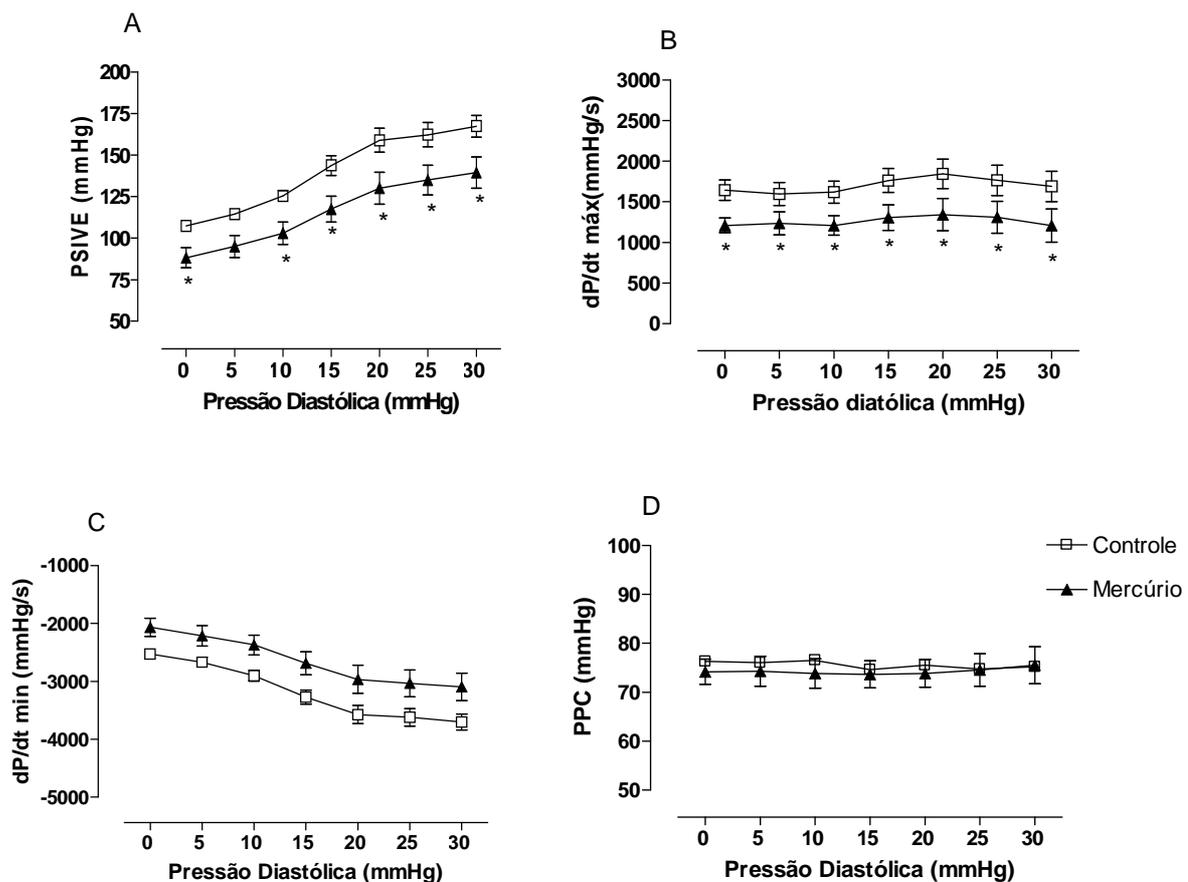


Figura 18: Valores de pressão sistólica isovolumétrica, derivadas temporais e pressão de perfusão coronariana de corações isolados de ratos dos grupos Controle (n=7) e Mercúrio (n=7) em diferentes pressões diastólicas. A- Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE); B- Derivada de pressão por derivada de tempo máxima (dP/dt máx); C- Derivada de pressão por derivada de tempo mínima (dP/dt min). D- Pressão de perfusão coronariana. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de Fisher LSD. \*p<0,05 vs Controle.

#### 4.3.2 Intervenção Homeométrica: Resposta $\beta$ -adrenérgica

Na resposta homeométrica ao isoproterenol, como demonstrado na figura 19, os corações de ratos dos grupos Mercúrio e Controle comportaram-se de forma distinta. O incremento da PSIVE após injeção *in bolus* de agonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos foi, aproximadamente, 27 % menor em corações de ratos do grupo mercúrio quando comparados com ratos do grupo Controle. No desenvolvimento de pressão em função do tempo, uma diferença significativa foi encontrada na dP/dt máx, entretanto a dP/dt min é estatisticamente similar entre os grupos.

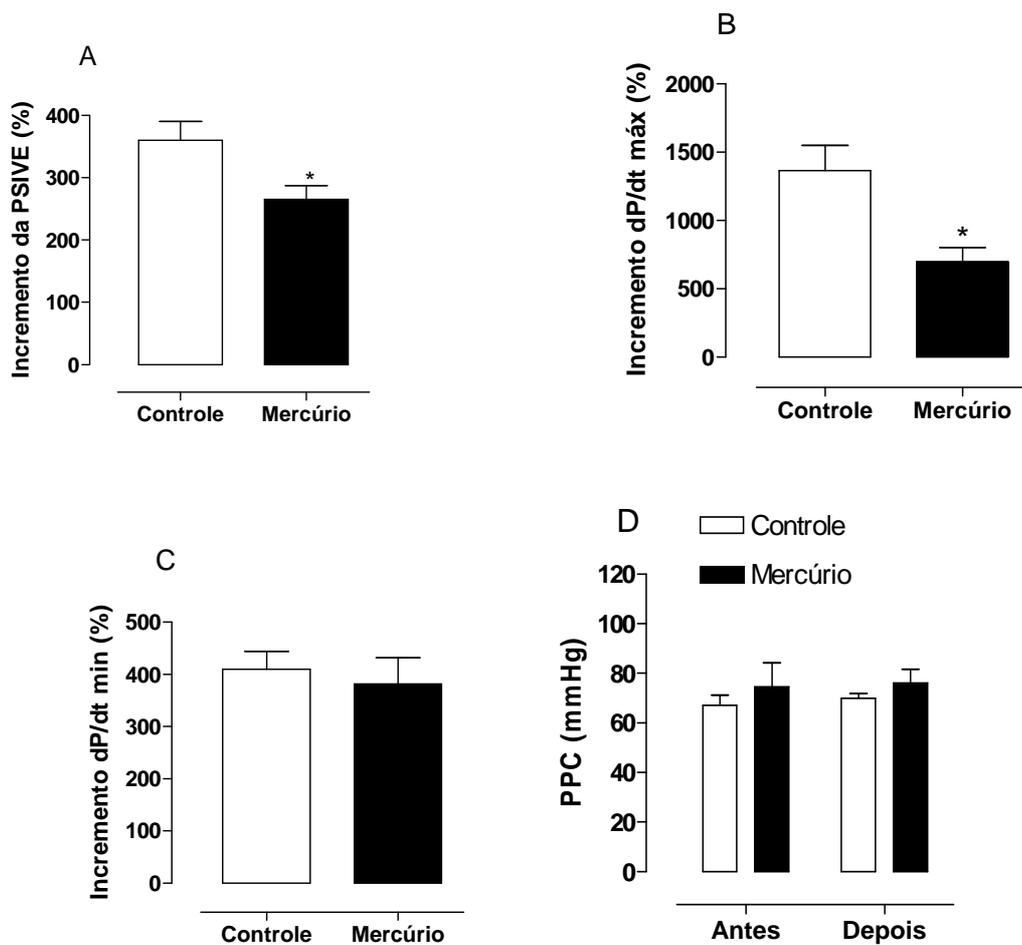


Figura 19: Resposta à estimulação  $\beta$ -adrenérgica (isoproterenol  $10^{-5}$  M) em corações isolados de ratos dos grupos Controle (n=7) e Mercúrio (n=7). A- Incremento da pressão sistólica isovolumétrica do Ventrículo esquerdo (PSIVE); B- Incremento da derivada de pressão por derivada de tempo máxima (dP/dt máx); C- Incremento da derivada de pressão por derivada de tempo mínima (dP/dt min); D- Pressão de perfusão coronariana antes a após injeção *in bolus* de isoproterenol. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste *t* de Student não pareado. \* $p < 0,05$  vs Controle.

#### 4.4 MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS

##### 4.4.1 Força de contração isométrica e parâmetros temporais

O tratamento com  $\text{HgCl}_2$  durante 30 dias não alterou a força isométrica desenvolvida por músculos papilares do ventrículo esquerdo dos ratos, quando comparados aos ratos expostos durante 30 dias à salina. A figura 20 demonstra que as forças desenvolvidas corrigidas pelos pesos dos papilares são estatisticamente iguais em ambos os grupos (Controle:  $0,55 \pm 0,04$  g/mg e Mercúrio:  $0,58 \pm 0,05$  g/mg).

A exposição crônica a esse metal pesado, nestas concentrações usadas, também não foi capaz de influenciar os parâmetros temporais da contração isométrica de músculos papilares de VE de ratos do grupo Mercúrio quando comparado ao grupo Controle. Tanto o tempo de ativação quanto o tempo de relaxamento foram iguais entre os grupos (figura 21)

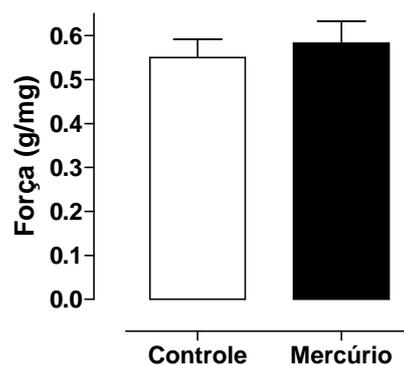


Figura 20: Força isométrica desenvolvida pelos músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle (n=22) e Mercúrio (n=22). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM.  $p > 0,05$ , Teste  $t$  de Student não pareado.

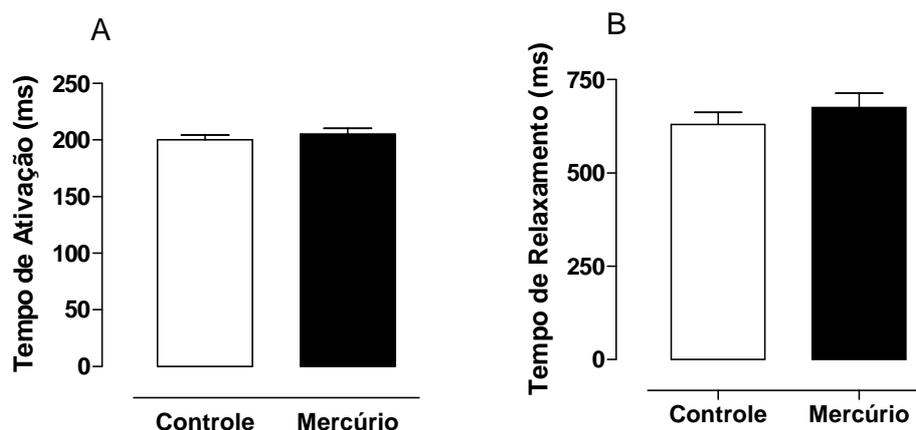


Figura 21: Parâmetros temporais em músculos papilares de VE de ratos dos grupos Controle (n=22) e Mercúrio (n=22). A- Tempo de ativação; B- tempo de relaxamento. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM.  $p > 0,05$ , Teste  $t$  de Student não pareado.

#### 4.4.2 Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos

A potenciação pós-pausa (PPP) foi utilizada para avaliar um possível efeito do tratamento com  $\text{HgCl}_2$  sobre a atividade do RS. O tratamento durante 30 dias com  $\text{HgCl}_2$  não alterou o funcionamento do RS, visto que os valores de PPP de 15, 30 e 60 segundos de músculos provenientes de ratos do grupo Mercúrio são semelhantes aos dos músculos de ratos do grupo Controle, como demonstrado na figura 22.

#### 4.4.3 Força desenvolvida em diferentes freqüências de estimulação elétrica

O aumento na freqüência de estimulação elétrica reduziu discretamente a força de contração em músculos papilares de ambos os grupos, como era esperado, já que no miocárdio de rato o aumento de freqüência, nas freqüências estudadas, reduz a força de contração. Todavia, como mostrado na figura 23, os diferentes tratamentos ( $\text{HgCl}_2$  e salina) não alteraram a forma como os músculo reagem aos incrementos da freqüência de estimulação elétrica. Em todas as freqüências estudadas a força desenvolvida pelos músculos foi estatisticamente semelhante entre os grupos.

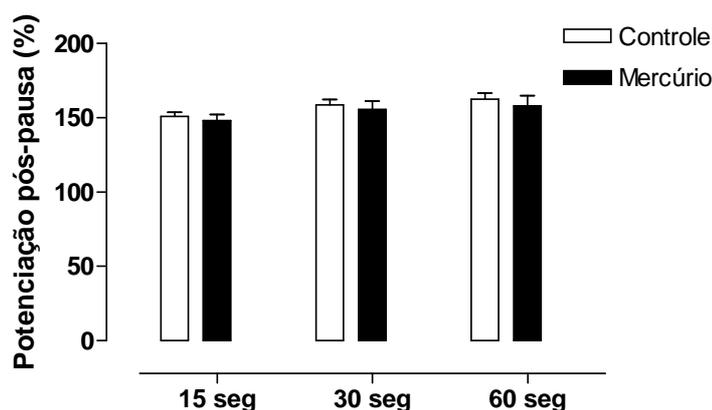


Figura 22: Potenciação relativa das contrações após pausas na estimulação elétrica (PPP) de 15, 30 e 60 segundos, em músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle (n=22) e Mercúrio (n=22).  $p > 0,05$ , Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. ANOVA uma via.

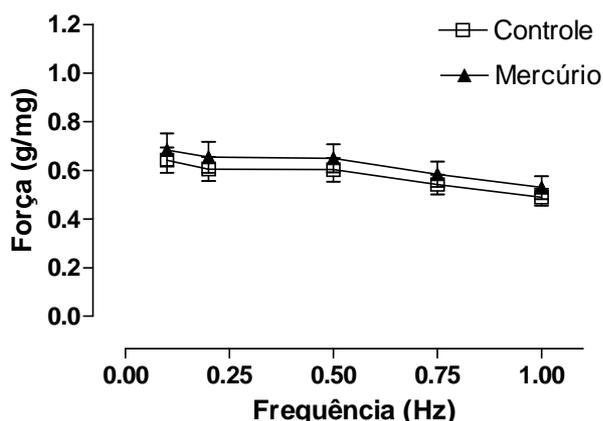


Figura 23: Força desenvolvida, em diferentes freqüências de estimulação elétrica, por músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle (n=22) e Mercúrio (n=22). Os dados estão expressos em Média  $\pm$  EPM.  $p > 0,05$ . ANOVA duas vias.

#### 4.4.4 Força desenvolvida durante contrações tetânicas

O efeito do tratamento crônico com  $\text{HgCl}_2$  sobre as proteínas contráteis cardíacas foi indiretamente avaliado através de contrações tetânicas induzidas por aumento na freqüência de estimulação elétrica e presença de cafeína. Nas contrações tetânicas ocorre desenvolvimento de uma rápida elevação da força (pico da contração tetânica), seguida por uma pequena queda e conseqüente formação de um platô. As contrações tetânicas foram obtidas em músculos papilares de ventrículo esquerdo

de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. A figura 24 mostra que o desenvolvimento de força tanto no pico da contração tetânica como no platô dessas contrações foi estatisticamente semelhante entre os grupos estudados.

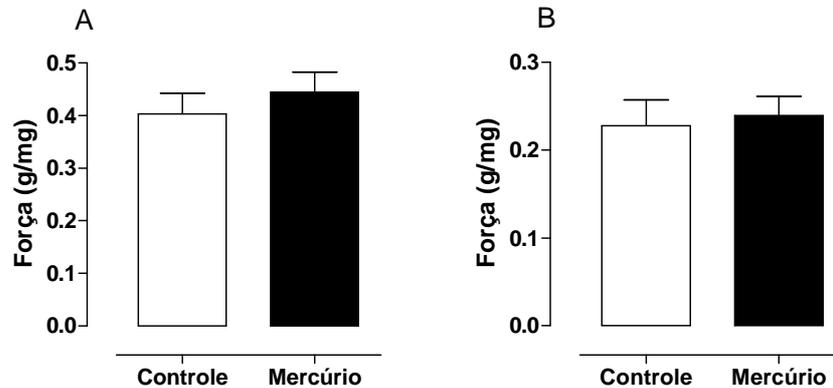


Figura 24: Força desenvolvida em contrações tetânicas por músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle (n=22) e Mercúrio (n=22). A- Força desenvolvida no pico das contrações tetânicas e B- Força desenvolvida nos platôs das contrações tetânicas. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM.  $p > 0,05$ , Teste  $t$  de Student não pareado.

#### 4.4.5 Força desenvolvida após repouso de 10 minutos

Esse protocolo experimental foi utilizado para avaliar o efeito da exposição por 30 dias a 20 nM de  $\text{HgCl}_2$  sobre a permeabilidade da membrana sarcoplasmática ao cálcio. A figura 25 evidencia que a permeabilidade a esse íon não foi prejudicada pelo tratamento com  $\text{HgCl}_2$ . As forças desenvolvidas após exposição à solução livre de cálcio, a fim de promover a depleção dos estoques de cálcio intracelulares, e pausas de 10 minutos não foram diferentes entre os grupos Controle e Mercúrio.

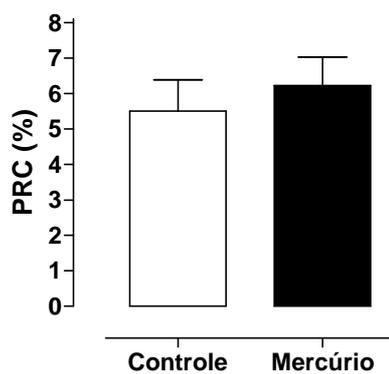


Figura 25: Potenciação relativa das contrações após pausas na estimulação elétrica (PRC) de 10 min na presença de cafeína e solução nutritora Krebs Henseleit livre de cálcio, em músculos papilares de ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Controle (n=22) e Mercúrio (n=22). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM.  $p > 0,05$ , Teste *t* de Student não pareado.

## 4.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

### 4.5.1 $\text{Ca}^{2+}$ ATPase miosínica

A atividade específica da enzima ATPase miosínica foi afetada pelo tratamento crônico com  $\text{HgCl}_2$ . Considerando a atividade enzimática encontrada em corações dos ratos Controle como 100%, houve um aumento de 17% na atividade desta enzima em ratos do grupo mercúrio. A figura 26 mostra a alteração promovida pelo tratamento crônico com mercúrio na atividade da ATPase miosínica.

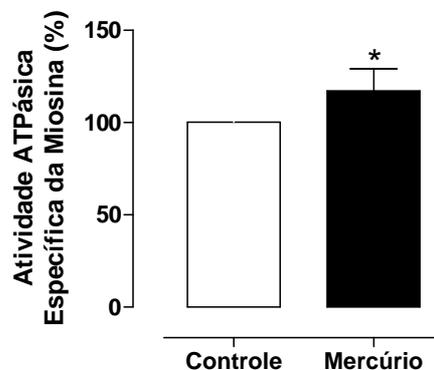


Figura 26: Atividade específica da enzima ATPase miosínica de corações de ratos dos grupos Controle (n=5) e Mercúrio (n=11). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. Teste *t* de Student não pareado. \**p* < 0,05 vs Controle. 100% do controle = 257,7  $\pm$  26,4 nmol Pi/min/mg de proteína.

### 4.5.2 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

A exposição crônica a 20 nM de  $\text{HgCl}_2$  durante 30 dias foi capaz de inibir a atividade da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ . Houve redução de, aproximadamente, 50 % na atividade específica desta enzima em corações de ratos do grupo exposto ao mercúrio quando comparado com ratos expostos somente à salina, como demonstrado na figura 27.

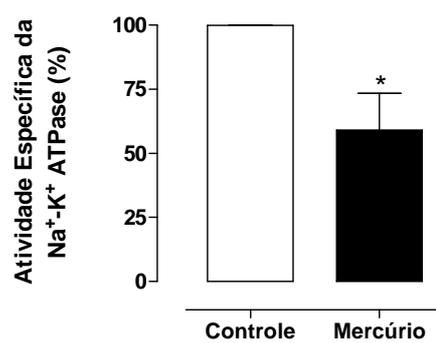


Figura 27: Atividade enzimática específica da sódio-potássio ATPase. Dados expressos em Média ± EPM. Teste *t* de Student não pareado. \**p* <0,05 vs Controle. Controle: 59,81 ± 4,49 nmol Pi/min/mg (n=6) e Mercúrio 35,27 ± 8,65 nmol Pi/min/mg (n=6).

***DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o tratamento crônico por 30 dias com doses pequenas de  $\text{HgCl}_2$  foi capaz de produzir aumento da PDfVE *in vivo*, porém sem alterar os demais parâmetros hemodinâmicos das câmaras ventriculares, os parâmetros arteriais e a frequência cardíaca.

A avaliação dos corações isolados mostrou que o tratamento crônico com mercúrio alterou a contratilidade. Houve diminuição da PSIVE, das derivadas temporais e da resposta inotrópica promovida por injeção *in bolus* de isoproterenol. O mecanismo de auto-regulação heterométrica do coração foi preservado, entretanto, a pressão desenvolvida por corações do grupo Mercúrio foi menor na maioria das pressões diastólicas estudadas.

No entanto, quando músculos papilares foram avaliados, nenhuma alteração inotrópica, nos parâmetros temporais, na atividade do retículo sarcoplasmático, na atividade das proteínas contráteis e no influxo de cálcio transsarcolemal foi encontrada.

O Mercúrio ainda promoveu alterações enzimáticas no músculo cardíaco. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase miosínica mostrou-se aumentada em corações do grupo Mercúrio. E a exposição crônica por 30 dias à concentração nanomolar de mercúrio foi capaz de inibir a atividade da NKA sarcolemal. Devido à grande participação destas enzimas no mecanismo de acoplamento excitação-contração, essas alterações, possivelmente, têm forte e estreita relação com os dados funcionais obtidos no presente estudo. Além disso, o tratamento crônico não alterou o peso corporal dos ratos e o peso das câmaras ventriculares.

Embora já se tenha comprovado correlação entre pequenas concentrações de Hg no plasma e doença cardiovasculares, ainda são escassos na literatura trabalhos que demonstrem as alterações cardiovasculares promovidas pelo mercúrio em concentrações muito baixas administradas cronicamente. Entretanto, é grande o número de estudos envolvendo a exposição aguda (Su & Chen, 1979; Oliveira *et al.*, 1994; Massaroni *et al.*, 1992; Massaroni *et al.*, 1995; Rossoni *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2001; Assis *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2003; Falcochio *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2007; Wiggers *et al.*, 2008).

## 5.1 AVALIAÇÃO PONDERAL

### 5.1.1 Peso corporal

Os ratos do grupo Mercúrio deste presente estudo recebiam uma dose inicial de 4,34  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  com a finalidade de alcançar a concentração plasmática de 20 nM e doses diárias que continham somente o que o organismo do animal excretaria por dia (0,07  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Wiggers *et al.*, 2008). Esse tratamento por 30 dias não foi capaz de alterar o ganho de peso corporal dos ratos. Tanto o peso ao início do tratamento, quanto o peso ao fim do tratamento, são semelhantes em ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Semanalmente, os ratos também foram pesados e, em nenhum momento, a avaliação demonstrou diferenças de ganho ponderal entre os grupos (dados não mostrados).

Corroborando com os resultados encontrados, Oliveira e colaboradores em 1992 mostraram que ratos no período de lactação que recebiam doses diárias de 0,1 a 2,5 mg/Kg de  $\text{HgCl}_2$  por 19 dias não apresentaram alteração do peso corporal quando comparados com ratos que recebiam salina. O peso só foi alterado quando os ratos eram expostos a doses diárias de 5 mg/Kg, mostrando que a influência do  $\text{HgCl}_2$  no ganho de peso corporal é dose-dependente (Bartolome *et al.*, 1984). No mesmo ano, outro estudo demonstrou que ratos Wistar que recebiam de 50 a 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $\text{HgCl}_2$  na água de beber não tiveram o seu peso corporal e a aparência modificados ao fim de 350 dias de exposição (Carmignani *et al.*, 1992).

### 5.1.2 Peso dos ventrículos

Após o fim do tratamento, os corações dos ratos dos grupos Mercúrio e Controle eram utilizados para realização dos protocolos em corações isolados e, imediatamente depois, tinham seus ventrículos separados e pesados. Observou-se que o tratamento com  $\text{HgCl}_2$  por 30 dias não foi capaz de promover alterações no peso dos ventrículos (VE e VD) e também não foi detectada diferença quando o peso dos ventrículos era corrigido pelo peso corporal dos ratos (VE/PC e VD/PC).

Trabalhos na literatura mostram que tanto o mercúrio orgânico como o inorgânico são capazes de alterar o peso do coração, entretanto, em todos os estudos, as concentrações às quais os animais foram expostos são maiores (1 a 5mg/Kg de metilmercúrio e 0,5 a 2,5 mg/Kg de  $\text{HgCl}_2$ ) (Bartolome *et al.*, 1982; Bartolome *et al.*,

1984) que a utilizada em nosso trabalho (4,34 µg/Kg). Ratos que recebiam doses diárias de metil-mercúrio por 21 dias (1; 2,5 e 5 mg/Kg), iniciando-se o tratamento no primeiro dia após o nascimento, tiveram rápido crescimento e desenvolvimento tecidual dos corações, acompanhado por hipertrofia cardíaca quando adultos (Bartolome *et al.*, 1982). Já o HgCl<sub>2</sub> (0,5; 1 e 2,5 mg/Kg) provocou aumento inicial do peso do coração com subsequente diminuição a valores menores que de ratos controle (Bartolome *et al.*, 1984).

## 5.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Visto que os dados funcionais obtidos no presente estudo têm estreita relação com as alterações bioquímicas promovidas pelo tratamento crônico com  $\text{HgCl}_2$ , consideramos importante que a discussão sobre as alterações das atividades específicas da NKA e ATPase miosínica fossem descritas anteriormente aos dados funcionais.

### 5.2.1 $\text{Ca}^{2+}$ ATPase miosínica

O mercúrio é um inibidor não competitivo da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase miosínica, e os efeitos tóxicos são dependentes da reação do mercúrio com grupamentos SH (Vassallo *et al.*, 1999; Moreira *et al.* 2003). Baixa concentração de  $\text{HgCl}_2$  (50 nM), menor que concentrações que produzem efeito inotrópico negativo em músculos papilares ( $> 1\mu\text{M}$ ), já é capaz de reduzir a atividade específica da ATPase miosínica (Moreira *et al.* 2003). No entanto, ratos que ficaram expostos a pequenas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  por 30 dias tiveram a atividade específica da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase miosínica aumentada.

É provável que a concentração de  $\text{HgCl}_2$  estudada não seja capaz de reduzir a atividade ATPásica da miosina, visto que, o efeito do mercúrio sobre esse enzima é dose-dependente. Moreira *et al.* em 2003 mostraram que 50 nM do metal diminuiu, aproximadamente, 20% da atividade da enzima e a exposição a 400 nM reduziu a atividade em mais de 80%. E ainda, é provável que a resposta que encontramos possa resultar de mecanismo adaptativo celular, contrapondo-se a uma inibição inicial.

Neste estudo foi encontrado efeito inotrópico negativo em corações isolados, então, o aumento encontrado na atividade específica da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase miosínica pode ser uma resposta compensatória para restabelecer o inotropismo cardíaco. O aumento dessa atividade enzimática pode contribuir para manter o estado contrátil de músculos papilares de VE de ratos do grupo Mercúrio. E esse aumento, juntamente com mecanismos neuro-humorais, pode estar envolvido na manutenção das PSVE e PSVD em ratos anestesiados.

### 5.2.2 Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - ATPase

A NKA é uma bomba crucial para a manutenção do gradiente transsarcolemal de Na<sup>+</sup> e, indiretamente, para regulação da concentração intracelular de outros íons (Kaplan, 1985). A inibição da bomba leva ao aumento da [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> e, através da redução da atividade do trocador Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>, ao aumento de cálcio intracelular (Blaustein, 1988).

Sabe-se que muitos cardiotônicos esteróides (ouabaína, digoxina) têm como mecanismo de ação a inibição da NKA, levando ao aumento da [Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub> (Langer, 1977). Entretanto, existem diferenças entre a inibição da NKA pela ouabaína e pelo HgCl<sub>2</sub>. Os cardiotônicos interagem com um receptor extracelular específico e o alvo do mercúrio são grupamentos sulfidrilícos (SH) localizados, predominantemente, num domínio intracelular de proteína. Trabalhos demonstram que o mercúrio é capaz de bloquear as NKA renais sensíveis e resistentes à ouabaína (Anner & Moosmayer, 1992). E cabe ressaltar que o mercúrio, mesmo utilizado agudamente, é capaz de aumentar a atividade de outras enzimas, como a ECA (enzima conversora de angiotensina) e colinesterase (Wiggers *et al.*, 2008; Rossoni *et al.*, 1999).

Já está amplamente descrito na literatura que o mercúrio causa inibição da NKA (Nechay & Saunders, 1978; Henderson *et al.*, 1979; Ziegelhöffer *et al.*, 1983; Klonne & Johnson, 1988; Halbach *et al.*, 1989; Anner *et al.*, 1990; Chetty *et al.*, 1990; Anner *et al.*, 1992; Anner & Moosmayer, 1992; Wang & Horisberger, 1996; Chuu *et al.*, 2001). Os resultados encontrados nas mensurações bioquímicas realizadas após a exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub> durante 30 dias corroboram com esses estudos.

A inibição da NKA promovida pela exposição ao mercúrio pode ser responsável pelo aumento da PDfVE encontrada na avaliação cardiovascular *in vivo* (Watanabe *et al.*, 1987; Patmore *et al.*, 1989) e também, devido a uma sobrecarga de cálcio, ao efeito inotrópico negativo encontrado em corações isolados (Khatte *et al.*, 1989). A inibição da NKA ocasiona um efeito semelhante ao uso de digitálicos no coração, aumentando a concentração intracelular de sódio e, então, reduzindo a atividade do trocador Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> (Blaustein, 1988). Esse mecanismo acarreta um aumento da concentração intracelular de cálcio e, em conseqüência, incremento da força de

contração. Ou, caso o aumento leve à sobrecarga de cálcio, haverá déficit na força de contração.

### 5.3 AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR *in vivo*

A exposição crônica por 30 dias ao  $\text{HgCl}_2$  não alterou a PAS, PAD, PAM e FC, diferente do que aconteceu com ratos anestesiados expostos agudamente a concentrações mais elevadas de mercúrio. Estudos prévios no nosso laboratório mostram, após infusão endovenosa de 5 mg/kg de  $\text{HgCl}_2$  em ratos anestesiados, diminuição da PAM, FC, aumento do intervalo PR do eletrocardiograma, aumento da resposta hipotensora e cronotrópica negativa à acetilcolina e elevada incidência de arritmias (Massaroni *et al.*, 1995; Rossoni *et al.*, 1999). No entanto, a exposição aguda a concentração nanomolar aumentou a PAS, PAD, FC e reatividade pressórica à fenilefrina (Machado *et al.*, 2007). Ratos anestesiados que receberam uma dose de 50 mg/kg de  $\text{Hg}^{2+}$  morreram no primeiro minuto após o início da infusão e animais expostos a 0,5 mg/kg não apresentaram nenhuma alteração hemodinâmica (Massaroni *et al.*, 1995).

Outro estudo sugere que o  $\text{Hg}^{2+}$  age nas terminações nervosas produzindo liberação de neurotransmissores autonômicos parassimpáticos (Kostial & Landeka, 1975). As atividades catecolaminérgicas e colinérgicas também foram avaliadas com o uso, respectivamente, de propranolol e atropina. A atropina produziu uma aparente proteção, por bloquear mudanças na FC, PAM e intervalo PR (Massaroni *et al.*, 1995; Rossoni *et al.*, 1999). Esses achados sugerem que o mercúrio, agudamente, possa induzir um incremento na atividade autonômica em ratos anestesiados. Machado *et al.* (2007) mostraram que o uso de hexametônio, um bloqueador ganglionar, exacerbou os efeitos promovidos por infusão endovenosa de 680 ng/Kg de mercúrio, sugerindo que os efeitos promovidos pelo mercúrio podem ser modulados por reflexos autonômicos.

Então, é possível que mecanismos de regulação neuro-humorais da pressão arterial e contratilidade miocárdica estejam agindo nos ratos do grupo Mercúrio a fim de manter os parâmetros cardiovasculares em níveis iguais aos dos ratos do grupo Controle.

A exposição crônica ao  $\text{HgCl}_2$  não alterou a PSVE e PSVD quando comparado com ratos expostos a salina pelo mesmo período. Rossoni e colaboradores em 1999 mostraram que uma injeção *in bolus* por via endovenosa de 5 mg/kg de  $\text{HgCl}_2$  promove uma pequena redução na PSVE e aumento da PSVD após,

respectivamente, 30 e 40 minutos de exposição. Então, a exposição crônica a uma concentração muito baixa não foi capaz de promover alterações na pressão sistólica dos ventrículos. Também, mecanismos neuro-humorais podem estar envolvidos na manutenção do estado contrátil dos ventrículos, como uma maior ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Jakob *et al.*, 1988). Tal fato explicaria porque em corações isolados, nos quais não há modulação autonômica reflexa, foi encontrado déficit de contratilidade.

Corroborando com a alteração na PDfVE encontrada neste estudo, trabalhos na literatura mostraram aumento da PDfVE após administração endovenosa de 5 mg/kg de  $\text{HgCl}_2$  em ratos (Rossoni *et al.*, 1999). Desta forma, a exposição crônica a uma pequena concentração também é capaz de aumentar a PDfVE assim como uma dose *in bolus* de  $\text{HgCl}_2$ , que origina uma concentração sanguínea cerca de 1000 vezes maior que a encontrada nos ratos expostos cronicamente.

Esse aumento pode ser explicado pela inibição da NKA induzida pela exposição crônica ao  $\text{Hg}^{2+}$ . Quando a NKA é inibida por um longo período de tempo ocorre, inicialmente, aumento da pressão desenvolvida pelos ventrículos, acompanhada por diminuição, devido à sobrecarga de cálcio. Sabe-se também que durante a sobrecarga de cálcio o efeito inotrópico negativo é acompanhado por aumento da tensão basal do músculo cardíaco (Vassale & Lin, 1979; Pilate & Paradise, 1984; Wier & Hess, 1984; Valdeolmillos & Eisner, 1985; Vassalle & Lin, 2004). Então, de forma indireta e tempo-dependente, a inibição da bomba promove “déficit” de relaxamento do músculo cardíaco e aumento da pressão ao fim da diástole.

A exposição aguda a 20 nM de  $\text{HgCl}_2$  também foi capaz de promover incremento da pressão diastólica (PD) em corações isolados perfundidos pela técnica de Langendorff (Langendorff, 1898; Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007). A perfusão com solução contendo 20 nM de  $\text{HgCl}_2$  aumentou progressivamente a PD em função do tempo. Após uma hora de exposição a PD havia aumentado cerca de 50%, e ao decorrer duas horas a PD encontrava-se 150% maior que antes da exposição ao metal ( Assis *et al.*, 2003). No VD também houve aumento dose-dependente (0,1 a 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$ ) da pressão diastólica isovolumétrica (Cunha *et al.* 2001). Após exposição crônica não ocorreu aumento da PD em corações isolados, pois na avaliação realizada em nosso trabalho, a PD era fixada por inflação do balão de látex e a diferença existente na PDfVE, encontrada na avaliação cardiovascular *in*

*vivo*, provavelmente foi mascarada por definição da PD. Quando agudamente, a PD era fixada e, então, se iniciava a perfusão com solução contendo HgCl<sub>2</sub>, o que possibilitava a observação de alterações neste parâmetro.

#### 5.4 AVALIAÇÃO EM CORAÇÕES ISOLADOS

Após o período de estabilização das preparações de corações isolados foram medidas a PSIVE, derivadas temporais e PPC. Os corações de ratos do grupo Mercúrio tiveram sua PSIVE e suas derivadas temporais reduzidas, porém sem alteração da PPC. É provável que a inibição da NKA seja o fator determinante do efeito inotrópico negativo encontrado nesta preparação. A inibição induzida pela exposição crônica pode estar levando à sobrecarga de cálcio, que é altamente nociva para as células miocárdicas.

Situação similar ocorre quando a NKA é inibida por concentrações tóxicas de ouabaína (1  $\mu\text{M}$ ) levando à disfunção mecânica do miocárdio e a alterações mitocondriais em corações isolados de cobaias (Khatter *et al.*, 1989). A ouabaína produziu um aumento transiente na força contrátil e posteriormente levou a um declínio na função mecânica do VE. Mitocôndrias isoladas desses corações perfundidos com ouabaína mostraram maior recaptção de cálcio, redução da fosforilação oxidativa e da taxa de geração de ATP. Esses achados foram revertidos pelo uso de bloqueadores de canais de cálcio, sugerindo que são dependentes da sobrecarga de cálcio induzida pela inibição da NKA pela ouabaína (Khatter *et al.*, 1989). Sabe-se também que a toxicidade mecânica produzida pelo uso de digitálicos é acompanhada por lesões ultraestruturais como: hipercontratura de sarcômeros e rompimento miofibrilar (Pilate & Paradise, 1984). Desta forma, a inibição crônica da NKA em corações de ratos expostos cronicamente ao  $\text{HgCl}_2$  pode ser a responsável pelo efeito inotrópico negativo.

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, estudos realizados em nosso laboratório mostraram diminuição da PSIVE imediatamente após exposição a 0,5; 1; 2; 10  $\mu\text{M}$  e após 30 minutos de exposição a 20 nM (Massaroni *et al.*, 1995; Assis *et al.* 2003).

Podemos especular que a expressão aumentada da eNOS, como a encontrada em artérias mesentéricas de ratos submetidos ao mesmo tratamento realizado nos ratos do nosso estudo (Wiggers *et al.*, 2008), também poderia estar presente nas artérias coronarianas. O aumento da expressão da isoforma endotelial da sintase do NO promoveria aumento da produção local de NO que, no músculo cardíaco promove efeito inotrópico negativo (ver revisão em Shah & MacCarthy, 2000). Como, em

corações isolados, não temos a participação de mecanismos neuro-humorais na manutenção do inotropismo, se tornou evidente nessa preparação a depressão do inotropismo possivelmente promovida pelo NO. Corroborando com essa hipótese, em músculos papilares isolados, nos quais a nutrição não é realizada via leito coronariano, não encontramos prejuízo na força contrátil.

#### **5.4.1 Intervenção Heterométrica: Curva de função ventricular**

Os corações de ratos do grupo Mercúrio mantiveram a resposta inotrópica positiva induzida pelo estiramento (Stefanon *et al.*, 1990; Vassallo & Mill, 1982; Vassallo & Tucci, 1978), no entanto, a PSIVE e derivadas temporais foram menores em quase todas as PD estudadas. O tratamento crônico não alterou a responsividade dos miofilamentos ao estiramento, e os menores valores observados de PSIVE e derivadas temporais são consequência da diminuição já observada após o período de estabilização.

Apoiando nossos achados, a perfusão de corações isolados com solução contendo concentrações crescentes de mercúrio (0,1 a 10  $\mu\text{M}$ ) não alterou a resposta ao estiramento, mas a PSIVE foi menor nos corações perfundidos com solução nutritora contendo  $\text{Hg}^{2+}$ . Os autores especulam que esses resultados podem ser devidos a sobrecarga de cálcio promovida pela inibição da NKA e da bomba de cálcio do RS, reduzindo a PSIVE em todas as concentrações de mercúrio estudadas (Massaroni *et al.*, 1995).

#### **5.4.2 Intervenção Homeométrica: Resposta $\beta$ -adrenérgica**

Foi observado na avaliação de corações isolados que o tratamento crônico com  $\text{HgCl}_2$  promoveu efeito inotrópico negativo, entretanto essas alterações não foram encontradas quando os parâmetros hemodinâmicos eram avaliados *in vivo*. Possivelmente, por participação de fatores neuro-humorais na manutenção do inotropismo cardíaco.

Uma maior atividade autônoma simpática pode ser um dos principais mecanismos envolvidos na manutenção do inotropismo cardíaco encontrada na avaliação cardiovascular *in vivo*. Os agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos ( $\beta_1$ )

ativam a proteína Gs (estimulatória) ligada ao GTP. Ao ser estimulada, a proteína Gs desencadeia a ação da adenilato ciclase (AC). Assim, aumenta-se a produção intracelular do segundo mensageiro AMPc, que ativa a proteína cinase A (PKA) que, dentre outras ações, fosforila canais de cálcio do sarcolema e receptores de rianodina, levando a um efeito inotrópico positivo (Bers, 2002; Jakob *et al.*, 1988). A ativação aumentada e mantida durante os 30 dias de exposição ao HgCl<sub>2</sub> possivelmente promove uma dessensibilização dos receptores  $\beta_1$  (Lefkowitz & Hoffman, 1982; Watanabe *et al.*, 1982; Harden, 1983) evidenciada pela diminuição da resposta  $\beta$ -adrenérgica ao isoproterenol encontrada nos corações isolados de ratos do grupo Mercúrio.

## 5.5 AVALIAÇÃO CARDÍACA EM MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS

Ao contrário do que foi encontrado nos experimentos com corações isolados, nos quais houve diminuição do estado inotrópico dos corações de ratos do grupo Mercúrio, não foi detectada alteração de inotropismo, da atividade do RS, da responsividade das proteínas contráteis e alteração do influxo de cálcio pelo sarcolema em músculos papilares de VE desses ratos.

A força isométrica dos músculos papilares foi expressa pela razão da força, em gramas, pelo peso do músculo, em miligramas, já que o peso dos papilares influencia a força desenvolvida pelos mesmos. A nutrição dos miócitos nesta preparação se dá por difusão, assim, a espessura dos músculos é um fator determinante da sua nutrição (Paradise *et al.*, 1981; Leite *et al.*, 1995). Não foi encontrada diferença entre os pesos dos músculos papilares dos ratos dos grupos Controle e Mercúrio (Controle:  $4,75 \pm 0,44$  mg,  $n=22$ ; Mercúrio:  $4,98 \pm 0,68$  mg,  $n=22$ ). Então, os resultados encontrados não sofrem influência de nutrição diferenciada entre os grupos.

### 5.5.1 Força de contração isométrica e parâmetros temporais

Uma série de informações pode ser obtida de registros de contrações isométricas, referentes às variações da amplitude da contração e de seus parâmetros temporais. A amplitude da contração traduz a quantidade de força desenvolvida pelo músculo e os parâmetros temporais fornecem informações sobre a cinética de ativação e relaxamento da contração muscular. O tempo de ativação é o tempo despendido do início da contração até seu pico máximo e traduz a cinética dos processos envolvidos na ativação da contração, ou seja, processos que aumentam a concentração e a cinética de entrada de cálcio no mioplasma. Já o tempo de relaxamento é medido do pico máximo até o término da contração e reflete a cinética dos processos envolvidos no relaxamento ou diminuição do cálcio mioplasmático. (Vassallo *et al.*, 2008)

Desta forma, visto que o tratamento crônico não alterou a força isométrica desenvolvida por músculos papilares de ratos, podemos sugerir que esse metal pesado não interferiu na capacidade do músculo papilar isolado em gerar força,

mesmo que em corações isolados o tratamento crônico tenha promovido efeito inotrópico negativo.

As diferenças encontradas nas preparações de corações isolados e músculos papilares podem estar relacionadas à forma de nutrição dos miócitos. Em músculos papilares, a solução nutritiva chega às células musculares por difusão. Já em corações isolados a perfusão é feita via capilares, visto que a circulação coronariana encontra-se preservada nesta montagem. Desta forma, como a circulação coronariana exerce forte influência sobre os parâmetros contráteis (Tucci *et al.*, 1980; Koomen *et al.*, 1980), o mercúrio poderia estar exercendo efeito sobre a resistência coronariana. No entanto, não foi encontrada diferença na PPC e, como o fluxo é constante, podemos sugerir que não houve alteração na resistência deste leito vascular.

É possível que a exposição crônica por 30 dias ao  $\text{HgCl}_2$  promova a liberação de substâncias produzidas no leito coronariano que alterariam a condição contrátil dos corações mantendo os mesmos valores da resistência coronariana. Como especulado anteriormente, uma maior expressão da eNOS, com conseqüente aumento da produção de NO (Wiggers *et al.*, 2008) levaria a um “déficit” de contratilidade em corações isolado. E, como em músculos isolados não temos o leito coronariano preservado, não teríamos produção de NO nessa preparação e o efeito inotrópico negativo promovido por essa substância.

Alguns estudos já obtiveram resultados contraditórios em músculos papilares e corações isolados expostos agudamente a uma mesma concentração ( $1\mu\text{M}$ ) de  $\text{Hg}^{2+}$ . Em músculos papilares houve efeito inotrópico positivo (Oliveira *et al.*, 1994) e, em corações isolados, efeito inotrópico negativo (Massaroni *et al.*, 1995). Indicando que existem mecanismos que podem influenciar na resposta inotrópica diferenciada encontrada nessas preparações.

Estudos prévios mostraram que a exposição aguda ao  $\text{Hg}^{2+}$  promove um efeito bifásico na capacidade de músculos papilares de VE e tecido atrial esquerdo em gerar força (Su & Chen, 1979; Halbach *et al.*, 1989; Oliveira *et al.*, 1994; Falcochio, 2004). Em concentrações menores ( $1$  e  $2,5\mu\text{M}$ ), o mercúrio promove efeito inotrópico positivo, evidenciado por aumento da força desenvolvida e aumento da  $dF/dt$  em músculos papilares de VE; já em concentrações maiores ( $5$  e  $10\mu\text{M}$ ;  $0,5$  a

15 ppm) a exposição aguda promoveu efeito inotrópico negativo (Oliveira, 1994; Su & Chen, 1979). Também em átrios esquerdos isolados ocorre, inicialmente, aumento da força desenvolvida e uma diminuição de força, tempo-dependente, em exposições agudas a 0,5; 2 e 5 ppm de mercúrio orgânico (Su & Chen, 1979). Os autores sugeriram que os efeitos depressivos na contratilidade promovidos pelo mercúrio se devem à inibição da NKA (levando à sobrecarga de cálcio), ATPase miosínica,  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -ATPase e bomba de  $\text{Ca}^{++}$  do RS (SERCA).

Experimentos utilizando tiras de VD foram realizados por esse tecido possuir menor concentração de NKA sarcolemal (Wang *et al.*, 1996), que é fortemente inibida pelo mercúrio, que o VE. Os resultados mostraram diminuição da força isométrica desenvolvida quando expostas por 2 horas a 5 nM de  $\text{HgCl}_2$ , diferente do efeito inotrópico positivo promovido, agudamente, por baixas concentrações em músculos papilares. Assim, em baixas concentrações, o aumento da força de contração se deve à inibição da  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase e conseqüente aumento do cálcio mioplasmático (Assis *et al.*, 2003). Além disso, na ausência dessa inibição outras alterações podem ser responsáveis pelo efeito inotrópico negativo, como a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase miosínica (Moreira *et al.*, 2003).

Entretanto, estudos não mostram os efeitos na função contrátil de músculos papilares de ratos expostos cronicamente a concentrações pequenas como a utilizada neste estudo. É possível que, cronicamente, o aumento do cálcio mioplasmático por inibição da NKA leve a uma injúria promovida por sobrecarga de cálcio (como a que ocorre em altas concentrações de mercúrio); e que o aumento da atividade específica da ATPase miosínica compense o efeito promovido pela inibição da NKA sarcolemal, e os resultados não mostrem alteração do estado contrátil dos músculos papilares.

Os processos que levam ao aumento do cálcio mioplasmático do repouso até o pico máximo da contração são dependentes de abertura de canais de cálcio do sarcolema e liberação de cálcio pelo RS e, em contrapartida, o relaxamento é dependente do desligamento do cálcio da troponina C, recaptação de cálcio pelo RS e extrusão de cálcio pelo sarcolema (Bers, 2002).

Como o tratamento crônico com  $\text{HgCl}_2$  não alterou os tempos de ativação e de relaxamento, podemos sugerir que não houve alteração na cinética do cálcio

ativador e nos processos de relaxamento. Esses dados em conjunto com a ausência de alteração nas PPP, na força isométrica desenvolvida e na PRC sugerem que não houve alteração na liberação, na recaptção de cálcio pelo RS, no influxo e efluxo de cálcio pelo sarcolema. O tratamento crônico não alterou os processos que levam ao aumento e diminuição do cálcio mioplasmático.

Assis e colaboradores, em 2003, mostraram que 5 nM de mercúrio diminui o tempo de ativação após 50 minutos de exposição e que após 100 minutos os tempos de ativação de tiras de VD expostas ao mercúrio voltam a se igualar aos de tiras de VD não expostas. Possivelmente, essa redução se deve ao aumento da liberação de cálcio pelo RS. Essas alterações se mantêm somente por um curto período de tempo, corroborando com os nossos resultados obtidos após exposição crônica por 30 dias. E em tiras de VD expostas a altas concentrações (1 e 2,5  $\mu\text{M}$ ) houve diminuição das derivadas temporais de força ( $dF/dt$ ) (Cunha *et al.*, 2001).

Outro trabalho mostrou que em todas as concentrações (1 a 10  $\mu\text{M}$ ), os tempos de ativação e as potenciações obtidas após pausas foram prejudicados, sugerindo redução da recaptção de cálcio pelo RS. A fim de elucidar esse mecanismo foram utilizados também músculos papilares de rãs que possuem um RS pouco desenvolvido. Nenhuma alteração na contratilidade foi encontrada. Então, os resultados encontrados nos músculos papilares de ratos são, provavelmente, dependentes de ações do  $\text{Hg}^{2+}$  no RS. Esse metal também altera a tensão desenvolvida em contrações tetânicas após exposição a 5  $\mu\text{M}$ , sugerindo uma depressão da maquinaria contrátil em altas concentrações (Oliveira, 1994).

### **5.5.2 Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos**

As contrações obtidas após pausas são mostradas como razão das contrações potencializadas pelas obtidas no período de estabilização anterior à pausa. O estado inotrópico das contrações estabilizadas influencia as PPP (Vassallo & Mill, 1988; Mill *et al.*, 1992). Diferentes tempos de pausas foram avaliados (15, 30 e 60 s), pois as PPP de músculos papilares de ratos também são dependentes da duração da pausa (Abreu *et al.*, 1987; Vassallo *et al.*, 1990).

As contrações obtidas após pausas têm maior dependência da liberação de cálcio pelos seus estoques intracelulares do que pelo influxo de cálcio pelo sarcolema.

Desta forma, as mensurações das PPP visam avaliar a atividade do RS, tanto a magnitude de liberação de cálcio ativador quanto, juntamente com os dados obtidos de tempo de relaxamento, a capacidade de recaptar cálcio (Wussling *et al.*, 1980; Wussling *et al.*, 1986; Leite *et al.*, 1988; Leite *et al.*, 1991; Mill *et al.*, 1992; Mill *et al.*, 1994).

Estudos mostram que o HgCl<sub>2</sub>, agudamente e em altas concentrações, é capaz de bloquear a liberação de cálcio induzida por cálcio pelo RS e inibir a bomba de cálcio do RS (SERCA) (Brunder *et al.*, 1988). Estudo prévio em nosso laboratório, utilizando músculos papilares, mostrou que as PPP obtidas após pausas de 15, 30 e 60 s diminuíram após 10 minutos de exposição a concentrações crescentes de mercúrio (1, 2, 5 e 10 µM) (Oliveira *et al.*, 1994).

Em nosso trabalho, não houve alteração das PPP em músculos papilares de VE de ratos do grupo Mercúrio em comparação aos do grupo Controle. Então, podemos sugerir que a exposição crônica a 20 nM de HgCl<sub>2</sub> não alterou o funcionamento do RS. Corroborando com esses resultados, foi observado que o tempo de relaxamento também não foi influenciado pelo tratamento com HgCl<sub>2</sub>.

### **5.5.3 Força desenvolvida em diferentes freqüências de estimulação elétrica**

Em ratos, a bomba de cálcio do RS é a principal responsável pela queda da concentração de cálcio ( $10^{-8}$  M) intracelular após a contração (92%) e o trocador Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> (7%), bomba de Ca<sup>++</sup> sarcolemal e uniporte mitocondrial de cálcio possuem pouca participação na extrusão de cálcio (1%) (Nayler & Dunnet, 1975; Mill *et al.*, 1994; Bers, 2002). Então, a observação da força desenvolvida em diferentes freqüências de estimulação elétrica em músculos papilares visa avaliar se os mecanismos de extrusão de cálcio estão preservados em músculos papilares de VE de ratos do grupo Mercúrio.

Como nenhuma alteração no desenvolvimento de força foi encontrada nas diferentes freqüências de estimulação elétrica, podemos sugerir que os miócitos de ratos expostos por 30 dias possuem os mecanismos de extrusão de cálcio preservados.

#### 5.5.4 Força desenvolvida durante contrações tetânicas

O músculo cardíaco possui um potencial de ação (PA) longo, isso previne que o miócito sofra uma re-estimulação e tetanização. Portanto, o tétano não pode ser obtido em condições normais, nas quais é impossível a fusão das contrações. Por esse motivo, foi utilizada a cafeína, que depleta os estoques de cálcio do RS por ligar-se aos receptores de rianodina (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994) e aumento da frequência de estimulação elétrica (10 Hz) para se produzir a ativação máxima da maquinaria contrátil em músculos papilares (Leite *et al.*, 1995).

Em miocárdio de ratos, as contrações tetânicas obtidas após tratamento com cafeína são menores que as contrações em condição estabilizada. Isto sugere que a ativação da maquinaria contrátil nas contrações tetânicas é dependente da entrada de cálcio pelo sarcolema (Leite *et al.*, 1995) e a manutenção da contração é dependente da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio.

As contrações tetânicas obtidas em preparações de músculos isolados de ratos expostos por 30 dias a 20 nM de HgCl<sub>2</sub> não apresentaram alterações nos picos e nos platôs dessas contrações características. Isso sugere que o mercúrio, nessa concentração, não influencia a entrada de cálcio pelo sarcolema e a sensibilidade dos miofilamentos. Podemos relacionar que a inexistência de alterações nas contrações tetânicas devem-se também ao aumento da atividade específica ATPásica da miosina encontrada nesses ratos expostos cronicamente ao HgCl<sub>2</sub>.

No entanto, quando tiras de VD foram expostas a concentrações crescentes de mercúrio (0,1 a 1 µM) e expostas agudamente (por 2 horas) a uma concentração baixíssima (5 nM) houve redução do pico das contrações tetânicas (Cunha *et al.*, 2001; Assis *et al.*, 2003).

#### 5.5.5 Força desenvolvida após repouso de 10 minutos

Em conjunto com a força desenvolvida durante o pico das contrações tetânicas, as contrações obtidas após pausa na estimulação elétrica, tratamento com cafeína e exposição à solução sem cálcio visam avaliar o influxo de cálcio pelo sarcolema.

No músculo cardíaco de ratos, a extrusão de cálcio para o meio extracelular é dependente do transporte de cálcio para estoques intracelulares e da extrusão

através do sarcolema. A cafeína depleta os estoques intracelulares de cálcio por se ligar aos receptores de rianodina (Bassani *et al.*, 1992; Bassani *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1995) e a exposição a solução sem cálcio na sua composição facilita a extrusão de cálcio pelo sarcolema (Vassallo *et al.*, 2008). Diferente do que ocorre nas PPP, que são dependentes da liberação de cálcio pelo RS e são potencializadas pela duração da pausa (Abreu *et al.*, 1987), as contrações desenvolvidas após repouso são dependentes, principalmente, do influxo de cálcio pelo sarcolema. O tratamento crônico não alterou a força desenvolvida das contrações obtidas após repouso de 10 minutos.

**CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

O principal achado deste estudo é que a exposição crônica a baixa concentração de mercúrio, próxima às encontradas em indivíduos que removeram amálgamas dentários e que foram expostos a vapor de mercúrio, foi capaz de promover “déficit” de relaxamento em VE de corações de ratos anestesiados, efeito inotrópico negativo em corações isolados, aumento da atividade ATPásica da miosina e inibição da NKA. No entanto, não alterou a contratilidade de músculos papilares isolados.

Em ratos anestesiados, a exposição crônica a baixa concentração promoveu alteração diastólica do ventrículo esquerdo. No entanto, não alterou os demais parâmetros ventriculares, arteriais e cronotrópico.

Em corações isolados perfundidos pela técnica de Langendorff, a pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo foi menor em corações de ratos expostos ao cloreto de mercúrio quando comparado com corações de ratos expostos à salina. No grupo Mercúrio, também houve diminuição das derivadas temporais e da resposta à estimulação  $\beta$ -adrenérgica. Já em músculos papilares isolados do ventrículo esquerdo de ratos não houve alteração do inotropismo, do funcionamento do retículo sarcoplasmático, do influxo transsarcolemal de cálcio e da responsividade miofibrilar.

A análise bioquímica revelou que a exposição crônica ao Hg foi capaz de inibir a atividade da NKA e aumentar a atividade específica da ATPase-miosínica.

Sugerimos, então, que as alterações funcionais encontradas têm estreita relação com as alterações bioquímicas. O aumento da atividade da NKA teria participação no aumento da PDfVE em ratos anestesiados e no efeito inotrópico negativo em corações isolados, possivelmente, pelos efeitos nocivos promovidos pela sobrecarga de cálcio. E, possivelmente, a atividade específica da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase miosínica aumentou como mecanismo compensatório ao “déficit” de contratilidade.

Poucos são os estudos que demonstram as alterações cardiovasculares promovidas pela exposição crônica a pequenas concentrações de mercúrio. Desta forma, nosso trabalho foi muito importante por demonstrar que o mercúrio em baixas concentrações e cronicamente foi capaz de alterar o relaxamento ventricular *in vivo* e o funcionamento adequado de corações isolados, antes de serem observadas alterações arteriais e nos diversos parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados.

Então, antes mesmo de serem observadas alterações em parâmetros mais facilmente mensuráveis, como PAM, PAS, PAD e FC, o mercúrio promove importante “déficit” de contratilidade miocárdica em corações isolados. E, *in vivo*, possivelmente, fatores neuro-humorais mantêm o inotropismo cardíaco. É importante ressaltar também que a avaliação cardiovascular foi realizada após 30 dias de exposição, então, não sabemos quais são os efeitos cardiovasculares provocados pela exposição por um período maior, como ocorre em pacientes que possuem amálgamas dentários e indivíduos expostos ocupacionalmente.

## ***REFERÊNCIAS***

## 7 REFERÊNCIAS

[HSDB] HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK. Mercury, elemental. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+7439-97-6>

Abreu GR, Vassallo DV, Mill JG. The Na<sup>+</sup>-Ca<sup>+</sup> Exchange mechanism as a regulator of post rest contraction in cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1987; 20: 817-820.

Alexandre SC. Avaliação de área contaminada por mercúrio total em Descoberto – Minas Gerais. [Master's thesis]. Viçosa: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, UFV; 2006

Anner BM, Moosmayer M, Imesch E. Chelation of mercury by ouabain-sensitive and ouabain-resistant renal Na-K-ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990; 167: 1115-1121.

Anner BM, Moosmayer M, Imesch E. Mercury blocks Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. *American Journal of Physiology* 1992; 262: 830-836.

Anner BM, Moosmayer M. Mercury inhibits Na-K-ATPase primarily at the cytoplasmic side. *American Journal of Physiology* 1992; 262: 843-848.

Assis GPS, Silva CEC, Stefanon I, Vassallo DV. Effects of small concentrations of mercury on the contractile activity of the rat ventricular myocardium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2003; 134: 375-383.

Azevedo FA. *Toxicologia do Mercúrio*. São Carlos: RiMa; 2003. São Paulo: InterTox; 2003.

Bartolome J, Chait EA, Trepanier P, Whitmore WL, Weigel S, Slotkin TA. Organ specificity of neonatal methyl mercury hydroxide poisoning in the rat: effects of ornithine decarboxylase activity in developing tissues. *Toxicology Letters* 1982; 13: 267-276.

Bartolome J, Whitmore WL, Slotkin TA. Effects of neonatal mercuric chloride administration on growth and biochemical development of neuronal and non-neuronal tissues in the rat: comparison with methylmercury. *Toxicology Letters* 1984; 22: 101-111.

Bassani JWN, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Species-dependent differences in cellular mechanisms. *Journal of Physiology* 1994; 476: 279-293.

Bassani RA, Bassani JWN, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  transport reduce  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *Journal of Physiology* 1992; 453: 591-608.

Berglund A, Molin M. Mercury levels in plasma and urine after removal of all amalgam restorations: the effect of using rubber dams. *Dental Materials* 1997; 13: 297-304.

Bers DM, Guo T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1047: 86-98.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415: 198-205

Blaustein MP. Sodium/calcium exchange and the control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1988; 12: 56-68

Boischio AAP, Barbosa A. Exposição ao Mercúrio Orgânico em Populações Ribeirinhas do Alto Madeira, Rondônia, 1991: Resultados Preliminares. *Caderno de Saúde Pública* 1993; 9: 155-160.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.

BRASIL. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Normas de Vacinação*. Brasília. Editora do Ministério da Saúde; 2001.

Bremel RD, Weber A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochemistry Biophysics Acta* 1975; 376: 366-374.

Brunder DG, Dettbarn C, Palade P. Heavy metal-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological Chemistry* 1988; 263: 18785-18792.

Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: Diet and Reinfarction Trial (DART). *Lancet* 1989; 2: 757-61.

Cappelli V; Bottinelli R; Poggesi C; Moggio R; Reggiani C. Shortening velocity and myosin and myofibrillar ATPase activity related to myosin isoenzyme composition during postnatal development in rat myocardium. *Circulation Research* 1989; 65: 446-457.

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. *British Journal of Industrial Medicine* 1992; 49: 226-232.

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: 111-121.

Chan K; Delfert D; Junger KD. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$  activity. *Annual Biochemistry* 1986; 157: 375-380.

Chetty CS, Rajanna B, Rajanna S. Inhibition of rat brain microsomal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and ouabain binding by mercuric chloride. *Toxicology Letters* 1990; 51: 109-116.

Chuu JJ, Liu SH, Lin-Shiau SY. Effects of methyl mercury, mercuric sulfide and cinnabar on active avoidance responses, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities and tissue mercury contents in rats. *Proceedings of the Nacional Science Council, Republic of China, part B* 2001; 25: 128-136.

Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 1731-1737.

Clarkson TW. The Three Modern Faces of Mercury. *Environmental Health Perspectives* 2002; 110 (1): 11-23.

Claude D, Swynghedauw B. A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. *Pflüegers Archives* 1975; 355: 39-47.

Cunha FN, de Assis GPS, Silva CEC, Stefanon I, Pinto VD, Vassallo DV. Effects of mercury on the contractile activity of the right ventricular myocardium. *Archives of environmental Contamination and Toxicology* 2001; 41: 374-380.

Dufol AF. Intoxicación por metales. *ANALES Sis San Navarra* 2003; 26 (1): 141-153.

Falcochio D, de Assis GPS, Stefanon I, Vassallo DV. Small concentrations of Mercury enhances positive inotropic effects in the rat ventricular myocardium. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005; 20: 22-25.

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

Fillion M, Mergler D, Sousa Passos CJ, Larribe F, Lemire M, Guimarães JR. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environmental Health* 2006; 5: 29.

Geier DA, Geier MR. An assessment of the impact of thimerosal on childhood neurodevelopmental disorders. *Pediatric Rehabilitation* 2003; 6: 97-102.

Gleichmann E, Kimber I, Purchase IF. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. A discussion. *Archives of Toxicology* 1989; 63: 257-273.

Gómez MG, Boffetta P, Klink JDC, Español S, Quintana JG, Colin D. Mortalidad por cáncer en los mineros del mercurio *Gaceta Sanitaria* 2007; 21: 210-217

Graeme KA, Pollack CV Jr. Heavy metal toxicity, Part I: arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine* 1998; 16 (1): 45-56.

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. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine* 2002; 347: 1747-1454.

Gutierrez LL, Mazzotti NG, Araújo AS, Klipel RB, Fernandes TR, Llesuy SF, Belló-Klein A. Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006; 39: 767-772.

Guzzi G, La Porta CA. Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxicology* 2008; 244: 1-12.

Halbach S, Kremers L, Willruth H, Mehl A, Welzl G, Wack FX, Hickel R, Greim H. Systemic transfer of mercury from amalgam fillings before and after cessation of emission. *Environmental Research*, 1998, 77: 115-123.

Halbach S, Schönsteiner G, Vierling W. The action of organic mercury compounds on the function of isolated mammalian heart muscle. *European Journal of Pharmacology* 1989; 167: 255-264.

Halbach S, Vogt S, Köhler W, Felgenhauer N, Welzl G, Kremers L, Zilker T, Melchart D. Blood and urine mercury levels in adult amalgam patients of a randomized controlled trial: Interaction of Hg species in erythrocytes. *Environmental Research* 2008; 107: 69-78.

Halbach S, Welzl G, Kremers L, Willruth H, Mehl A, Wack FX, Hickel R, Greim H. Steady-state transfer and depletion kinetics of mercury from amalgam fillings. *The Science of the Total Environment* 2000, 259: 13-21.

Halbach S. Combined estimation of mercury species released from amalgam. *Journal of Dental Research* 1995; 74: 1103-1109.

Harden TK. Agonist-induced desensitization of the beta-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacological Reviews* 1983; 35: 5-32.

Hechtenberg S, Beyersmann D. Inhibition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{(2+)}$ -ATPase activity by cadmium, lead and mercury. *Enzyme* 1991; 45: 109-115.

Henderson GR, Huang WH, Askari A. Transport ATPase--the different modes of inhibition of the enzyme by various mercury compounds. *Biochemical Pharmacology* 1979; 28: 429-433.

Hoffman BB, Lefkowitz RJ. Adrenergic receptors in the heart. *Annual Review of Physiology* 1982; 44: 475-484.

Isoldi MC, Castrucci AML. Sinalização Celular. In: Aires MM, *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p 59-89.

Jakob H, Nawrath H, Rupp J. Adrenoceptor-mediated changes of action potential and force of contraction in human isolated ventricular heart muscle. *British Journal of Pharmacology* 1988; 94: 584-590.

Kaplan JH. Ion movements through the sodium pump. *Annual Review of Physiology* 1985; 47: 535-544.

Khatter JC, Agbanyo M, Navaratnam S, Nero B, Hoeschen RJ. Digitalis cardiotoxicity: cellular calcium overload a possible mechanism. *Basic Research in Cardiology*. 1989; 84: 553-63.

Klonne DR, Johnson DR. Enzyme activity and sulfhydryl status in rat renal cortex following mercuric chloride and dithiothreitol administration. *Toxicology Letters* 1988; 42: 199-205.

Kobayashi T, Solaro RJ. Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annual Review of Physiology* 2005; 67: 39-67.

Konhilas JP, Irving TC, de Tombe PP. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. *Pflugers Archiv* 2002; 44: 305-310.

König A, Bouzan C, Cohen JT, Connor WE, Kris-Etherton PM, Gray GM, Lawrence RS, Savitz DA, Teutsch SM. A quantitative analysis of fish consumption and coronary heart disease mortality. *American Journal of Preventive Medicine* 2005; 29: 335-346.

Koomen JM, Jager LP, van Noordwijk J. Effects of perfusion pressure on coronary flow, myocardial Ca<sup>2+</sup>-washout, and the occurrence of calcium paradox in isolated perfused rat heart ventricles. *Basic Research in Cardiology* 1980; 75: 318-327.

Kostial K, Landeka M. The action of mercury ions on the release of acetylcholine from presynaptic nerve endings. *Experientia* 1975; 31: 834-835.

Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Archiv* 1898; 61: 291-332.

Langer GA. Relationship between myocardial contractility and the effects of digitalis on ionic exchange. *Federation Proceedings* 1977; 36: 2231-2234.

Langworth S, Sällsten G, Barregård L, Cynkier I, Lind ML, Söderman E. Exposure to mercury vapor and impact on health in the dental profession in Sweden. *Journal of Dental Research* 1997; 76 : 1397-1404.

Layland J, Li JM, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *The Journal of Physiology* 2002; 540: 457-67.

Leite CM, Vassallo DV, Mill JG. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1995; 73: 638-643.

Leite CM, Vassallo DV, Mill JG. Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1991; 24: 843-846.

Leite CM, Vassallo DV, Mill JG. The effects of verapamil on potentiated rest contractions in the rat ventricular myocardium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1988; 21: 859-862.

Machado AC, Padilha AS, Wiggers GA, Siman FDM, Stefanon I, Vassallo DV. Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2007; 24: 92-97.

Mahaffey KR. Mercury exposure: medical and public health issues. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2005; 116: 127-154.

Massaroni L, Oliveira EM, Stefanon I, Vassallo DV. Effects of Mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25: 861-864.

Massaroni L, Rossoni LV, Amaral SMC, Stefanon I, Oliveira EM, Vassallo DV. Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of Mercury in anaesthetized rats and in Langendorff perfused rat hearts. *Pharmacological Research* 1995; 32: 27-36.

Micaroni RCC, Bueno MIMS, Jardim WF. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova* 2000, 23: 487-495.

Mill JG, Vassallo DV, Leite CM, Campagnaro P. Influence of the sarcoplasmic reticulum on the inotropic responses of the rat myocardium resulting from changes in rate and rhythm. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1994; 27: 1455-1465.

Mill JG, Vassallo DV, Leite CM. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25: 399-408.

Moreira CM, Oliveira EM, Bonan CD, Sarkis JJF, Vassallo DV. Effects of Mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2003; 135: 269-275.

Nascimento ES, Chasin AAM. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. *Cadernos de Referência Ambiental* 2001; 1: 176 p.

Nayler WG, Dunnet J. A possible explanation for the peculiar contractile behavior displayed by rat heart muscle. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism* 1975; 5: 171-175.

Nechay BR, Saunders JP. Inhibitory characteristics of cadmium, lead, and mercury in human sodium and potassium dependent adenosinetriphosphatase preparations. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology* 1978; 2: 283-290.

Oliveira EM, Rocha JBT. Efeitos do tratamento crônico, durante a lactação, com cloreto de mercúrio sobre o peso corporal e atividade colinésterasica cerebral. *Saúde – CCS- UFSM* 1992; 18: 25-29.

Oliveira EM, Vassallo DV, Sarkis JJF, Mill JG. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1994; 128: 86-91.

Paradise NF, Schmitter JL, Surmitis JM. Criteria for adequate oxygenation of isometric kitten papillary muscle. *American Journal of Physiology* 1981; 241: 348-353.

Patmore L, Duncan GP, Spedding M. The effects of calcium antagonists on calcium overload contractures in embryonic chick myocytes induced by ouabain and veratrine. *British Journal of Pharmacology* 1989; 97: 83-94.

Pfeiffer WC, Lacerda LD. Mercury inputs in the Amazon region. *Environmental Technology Letters* 1988; 9: 325–330.

Pilati CF, Paradise NF. Ouabain-induced mechanical toxicity: aberrations in left ventricular function, calcium concentration, and ultrastructure. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1984; 175: 342-350

Rossoni LV, Amaral SMC, Vassallo PF, França A, Oliveira EM, Varner KJ, Mill JG, Vassallo DV. Effects of Mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999; 32: 989-997.

Sandborgh-Englund G, Elinder CG, Langworth S, Schütz A, Ekstrand J. Mercury in biological fluids after amalgam removal. *Journal of Dental Research* 1998; 77: 615-624.

Schneider NS, Shimayoshi T, Amano A, Matsuda T. Mechanism of the Frank-Starling law--a simulation study with a novel cardiac muscle contraction model that includes titin and troponin I. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2006; 41: 522-536.

Shah AM & MacCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacology & Therapeutics* 2000; 86: 49–86

Shamoo AE, MacLennan DH. Separate effects of mercurial compounds on the ionophoric and hydrolytic functions of the (Ca<sup>++</sup> -Mg<sup>++</sup>)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Membrane Biology* 1975; 25: 65-74.

Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods* 2007; 55: 113-126.

Stefanon I, Vassallo DV, Mill JG. Left ventricular length dependent activation in the isovolumetric rat heart. *Cardiovascular Research* 1990; 24: 254-256.

Su JY, Chen W. The effects of methylmercury on isolated cardiac tissues. *American Journal of Pathology* 1979; 95: 753-764.

Trzcinka-Ochocka M, Gazewski A, Brodzka R. Exposure to mercury vapors in dental workers in Poland. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 2007; 20: 147-153.

Tucci PJ, Spadaro J, Cicogna AC, Bregagnollo EA. Coronary perfusion pressure as a determinant of ventricular performance. *Experientia* 1980; 36: 974-975.

Valdeolmillos M, Eisner DA. The effects of ryanodine on calcium-overload sheep cardiac purkinje fibers. *Circulation Research* 1985; 56: 452-456.

Vassale M, Lin CI. Effects of calcium on strophanthidin-induced electrical and mechanical toxicity in purkinje fibers. *American Journal of Physiology* 1979; 236: 689-697.

Vassalle M, Lin CI. Calcium overload and cardiac function. *Journal of Biomedical Science* 2004; 11: 542-565.

Vassallo DV, Lima EQ, Campagnaro P, Stefanon I, Leite CM, Mill JG. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. *Pharmacological Research* 1994; 29: 251-260.

Vassallo DV, Mill JG, Abreu GR. Control of rest potentiation in ventricular myocardium by the Na-Ca exchange mechanism. *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana* 1990; 40: 129-136.

Vassallo DV, Mill JG. Length-dependent inotropic changes in cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1982; 15: 147-151.

Vassallo DV, Mill JG. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica Pharmacologica latinoamericana* 1988; 38: 87-97.

Vassallo DV, Moreira CM, Oliveira EM, Bertollo DM, Veloso TC. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1999; 156: 113-118.

Vassallo DV, Oliveira EM, Stefanon I. Contratilidade Miocárdica. In: Aires MM, *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p 435-469. 3ª Ed.

Vassallo DV, Paes de Carvalho A. Influence of temperature on isometric contractions of rabbit atria during inotropic interventions. *Acta Physiologica Latinoamericana* 1979; 29: 131-135.

Vassallo DV, Tucci PJF. Intensidade da ação de intervenções inotrópicas em diferentes graus de estiramento da miofibrila; aparente inter-relação entre mecanismo de Frank-Starling e inotropismo cardíaco. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 1978; 31: 155-158.

Velema J., Zaagsma J. Purification and characterization of cardiac sarcolemma and sarcoplasmic reticulum from rat ventricle muscle. *Archives Biochemistry Biophysics* 1981; 212: 678-88.

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. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005; 25: 228-233.

Wang J, Schwinger RH, Frank K, Müller-Ehmsen J, Martin-Vasallo P, Pressley TA, Xiang A, Erdmann E, McDonough AA. Regional expression of sodium pump subunits isoforms and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> exchanger in the human heart. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 98: 1650-1658.

Wang X, Horisberger JD. Mercury binding site on Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase: a cysteine in the first transmembrane segment. *Molecular Pharmacology* 1996; 50: 687-691.

Wang X, Horisberger JD. Mercury binding site on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: a cysteine in the first transmembrane segment. *Molecular Pharmacology* 1996; 50: 687-691.

Watanabe AM, Jones LR, Manalan AS, Besch HR Jr. Cardiac autonomic receptors. Recent concepts from radiolabeled ligand-binding studies. *Circulation Research* 1982; 50: 161-174.

Watanabe H, Ishide N, Takishima T. Twitch contractions during low  $\text{Na}^+$ -induced  $[\text{Ca}^{++}]_i$  overload in rat ventricular muscle. *American Journal of Physiology* 1987; 253: 737-744.

Wier WG, Hess P. Excitation-contraction coupling in cardiac purkinje fibers. Effects of cardiotonics steroids on the intracellular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) transient, membrane potencial, and contraction. *The Journal of general Physiology* 1984; 83: 395-415.

Wiggers GA, Pecanha FM, Briones AM, Perez-Giron JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaices M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2008. doi:10.1152/ajpheart.00430.2008.

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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2008; 147: 252-260.

Williams GJ, Stephens MR, Muir JR. Proceedings: Influence of acidosis on ATP hydrolysis by contractile proteins of cardiac muscle. *British Heart Journal* 1974; 36: 401.

Wussling M, Szymanski G. Simulation by two calcium store models of myocardial dynamic properties: potentiation, staircase, and biphasic tension development. *General Physiology and Biophysics* 1986; 5: 135-152.

Wussling M, Szymanski G. What information contains a rest contraction curve? a theoretical study with experimental results from the rabbit papillary muscle. *Acta Biologica et Medica Germanica* 1980; 39: 871-879.

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. *The New England Journal of Medicine* 2002; 347: 1755-1760.

Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacology Review* 2000; 52: 113-143.

Zavariz C, Glina DMR. Avaliação clínico-neuro-psicológica de trabalhadores expostos a mercúrio metálico em indústria de lâmpadas elétricas. *Revista de saúde Pública* 1992; 26: 356-365.

Zavariz C, Glina DMR. Avaliação clínico-neuro-psicológica de trabalhadores expostos a mercúrio metálico em indústria de lâmpadas elétricas. *Revista de Saúde Pública* 1992; 26: 356-365.

Ziegelhoffer A, Breier A, Dzurba A, Vrbjar N. Selective and reversible inhibition of heart sarcolemmal (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase by p-bromophenyl isothiocyanate. Evidence for a sulfhydryl group in the ATP-binding site of the enzyme. *General Physiology and Biophysics* 1983; 2: 447-456.