

A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl_2) altera a reatividade vascular da aorta de ratos - Papel das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides da via da ciclooxygenase

Franck Maciel Peçanha

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

**Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Maio de 2009**

A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl₂) altera a reatividade vascular da aorta de ratos - Papel das espécies reativas de oxigênio e dos prostanóides da via da ciclooxigenase

Franck Maciel Peçanha

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

Aprovada em 07 /05 /2009 por:

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador - UFES

Prof^a. Dr^a. Mercedes Salaices Sánchez – Co-orientadora - UAM

Prof^a. Dr^a. Francielli Weber Santos Cibin – UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon - UFES

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira - UFES

Coordenador do PPGCF: _____

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Maio de 2009

“Que seria de nós se não sonhássemos?”

*“Nada é para sempre, dizemos, mas há momentos que parecem ficar suspensos,
pairando sobre o fluir inexorável do tempo.”*

José Saramago

Peçanha, Franck Maciel Peçanha, 1972.

A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl₂) altera a reatividade vascular da aorta de ratos - Papel das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides da via da ciclooxigenase. [Vitória] 2009.

XXI, 149p., 29,7 cm (UFES, PhD., Ciências Fisiológicas, 2009)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Cloreto de Mercúrio 2. COX 3. Estresse oxidativo 4. Disfunção endotelial

Aos meus pais, Mauricio e Neide, a quem devo meu passado, presente e futuro. E a Giulia com quem vivo o presente e prometo o meu futuro.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

I INTRODUÇÃO

1 História do Mercúrio	19
1.1 Características do metal	28
1.2 Uso do mercúrio	28
1.3 Ciclo do Mercúrio	30
1.4 Formas de exposição ao mercúrio	32
1.5 Efeito tóxico do mercúrio	36
1.5.1 Efeito do mercúrio sobre o SNC	36
1.5.2 Efeito do mercúrio sobre o Sistema Renal	38
1.5.3 Efeito do mercúrio sobre o Sistema Cardiovascular	38
1.5.4 Outros sistemas	40
1.6 Tônus Vascular	41
1.6.1 Endotélio Vascular	42
1.6.1.1 Óxido nítrico	43
1.6.1.2 Via da Ciclooxygenase	00
1.6.1.3 Sistema Renina-Angiotensina	00
1.6.1.4 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo	00
1.6.1.5 Outros fatores	00
1.6.1.5.1 Endotelina	00
1.6.1.5.2 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)	00
1.7 Justificativa	00

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral	47
---------------------------	-----------

2.2 Objetivos específicos	47
----------------------------------	-----------

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais	48
3.2 Desenvolvimento do modelo experimental	48
3.2.1 Modelo experimental	50
3.2.2 Dosagem do cloreto de mercúrio plasmático	51
3.3 Análise do comportamento da pressão arterial sistólica	51
3.4 Estudo da reatividade vascular da aorta	51
3.4.1 Método de estudo da reatividade vascular da aorta	52
3.4.2 Protocolos experimentais	54
3.4.2.1 Período de estabilização, resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio e teste de integridade funcional do endotélio	56
3.4.2.2 Avaliação da resposta vascular à fenilefrina	57
3.4.2.2.1 Análise da modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina	57
3.4.2.2.2 Efeito do bloqueio da via do óxido nítrico, com L-NAME, sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	58
3.4.2.2.3 Análise da participação da via da angiotensina e das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina	59
3.4.2.2.4 Análise da participação dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina	59
3.4.2.3 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente e não-dependente do endotélio	60
3.4.2.3.1 Avaliação da resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio	60
3.4.2.3.2 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio	60

3.4.2.3.3	Análise da participação das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta vasodilatadora à acetilcolina	61
3.5	Estudo da expressão protéica	61
3.5.1	Western Blot para detecção da eNOS, SOD e receptor AT ₁	62
3.5.1.1	Preparação do tecido e quantificação das proteínas	63
3.5.1.2	Eletroforese e transferência das amostras	63
3.5.1.3	Incubação dos anticorpos	64
3.5.1.4	Detecção das proteínas	
3.6	Expressão de RNAm por PCR em tempo real (RT-PCR)	
3.7	Imunofluorescência	
3.8	Medida da produção de Prostaglandina E ₂ e Tromboxano A ₂	
3.9	Quantificação da produção de ânion superóxido	
3.10	Determinação da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA)	
3.11	Estudo das propriedades estruturais de segmentos de aorta torácica de ratos	
3.11.1	Microscopia Confocal	
3.11.1.1	Análise morfométrica dos componentes celulares da parede vascular	
3.12	Expressão dos resultados e análise estatística	
3.13	Fármacos e reagentes utilizados	
IV	RESULTADOS	67
4.1	Níveis de cloreto de mercúrio plasmático	67
4.2	Avaliação do comportamento da pressão arterial sistólica	67
4.3	Consumo de bebida, ração e valores de massa corporal	67

4.4 Respostas vasculares ao KCl e a fenilefrina em artéria aorta	68
4.5. Participação do endotélio na resposta contrátil a fenilefrina	70
4.6 Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico sobre a resposta vascular a fenilefrina	71
4.7 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS)	71
4.8 Participação das espécies reativas ao oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina	71
4.9 Produção de ânion superóxido	72
4.10 Expressão protéica das três isoformas da superóxido dismutase (SOD): MnSOD, CuZnSOD e EC-SOD	73
4.11 Participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina	74
4.13 Quantificação da liberação de prostanóides derivados da COX-2	77
4.14 Análise da participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina	79
4.15 Atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA)	81
4.16. Expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT₁	84
4.17 Respostas vasculares a acetilcolina e ao DEA-NO	85
4.17.1 Participação das espécies reativas ao oxigênio na resposta vascular a acetilcolina	86
4.17.2 Participação dos prostanóides da via da COX na resposta vascular a acetilcolina	89
4.18 Análise das propriedades estruturais dos segmentos de aorta torácica	91
	93
	93
	93
	94
	94
	95

	96
V DISCUSSÃO	98
<i>5.1 Efeitos do tratamento com HgCl₂ na estrutura dos vasos de resistência</i>	100
<i>5.2 Efeito do tratamento com mercúrio sobre a função vascular</i>	103
<i>5.3 Efeito do tratamento com mercúrio no estresse oxidativo plasmático e vascular</i>	109
PERSPECTIVAS	116
VI CONCLUSÕES	117
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

ANEXOS

1 – Informe de Análise Sanguínea

2 – Artigo Publicado: Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008
Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries.

AGRADECIMENTOS

Nestes anos de doutorado procurei aproveitar ao máximo todos os momentos, pois acreditava estar vivendo uma experiência única. Isso fez com que estes anos fossem intensos e de grandes mudanças, pessoais e profissionais. Sou um indivíduo diferente hoje se comparado ao período inicial do doutorado, e acredito ser impossível passar “impune” por tudo isso sem mudar. Posso resumir que durante a realização deste trabalho fiz muita investigação, trabalhei muito, mas também fiz excelentes amigos e vivi momentos que estão “*suspensos, pairando sobre o fluir inexorável do tempo*”. Todos estes momentos são ligados as pessoas que foram muito importantes nesta trajetória e para as quais deixo expressa a minha gratidão.

A minha referência de vida é baseada principalmente nos meus pais, Seu Mauricio e Dona Neide, que ensinaram aos filhos que pensamento positivo, comportamento correto e trabalho árduo faz com que obtenhamos êxito e nos leva a conhecer pessoas especiais. Talvez esta seja a explicação para o fato de ter conhecido e vivido com pessoas tão especiais nestes últimos anos. Amo vocês.

Este doutorado envolveu a realização de sonhos que eu nunca tinha sonhado e a Giulia, além de esposa, foi companheira e participou da realização destes sonhos. Doutorado, doutorado sanduíche, resultados, publicação, viagens, aprovação em concurso... sonhos realizados antes mesmo de serem sonhados. Te amo GiuGiu.

Agradeço também a família Pereira Wiggers da qual tenho o maior orgulho de ser agregado. Ao Prof. Júlio Wiggers e da Dona Laurinha minha gratidão pelo apoio constante.

O Prof. Dalton V. Vassallo, o **CHEFE**, criador de uma corrente do bem que espalha elos por várias universidades do país, tem a capacidade de transmitir calma nos momentos mais difíceis e destreza para potencializar habilidades dos seus orientandos. Nestes últimos anos, discutimos experimentos e resultados, viajamos, comemoramos publicação de artigo e aprovações em concursos. Hoje sinto gratidão por tudo que me proporcionou e saudade das viagens e das comemorações madrileñas.

Uma das ótimas coisas que me aconteceram nos últimos foi a possibilidade realizar o doutorado sanduíche com a Prof^a. Dr^a. Mercedes Salaires Sánchez. La

JEFA es una de estas mujeres respetadas por todo que representa. Para mi Madrid se tornó mucho más bella y agradable después que llegué al L4. Jamás olvidaré el cariño con que fue recibido y también las charlas sobre Zapatero, PSOE, ETA, Lula y el paseo por el Museo del Prado. Jefa, mi gratitud eterna por todo lo que ha echo por mi y por Giulia en nuestra estancia en Madrid.

Casi todos los viernes hay reunión en el L4 y en la primera reunión que participé conocí a Prof^a. Dr^a. Maria Jesús Alonso, una persona encantadora. Con sus preguntas, opiniones y ideas ha contribuido muchísimo en el desarrollo deste trabajo. Gracias por todo Mariaje.

En el laboratorio L4 del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Madrid tuve la oportunidad de conocer otras mujeres fantásticas que también ayudaran en el desarrollo de esta tesis. Siempre as llamé de “las chicas buenas y guapas del L4” y llevo todas en mi corazón. Ana Briones, Yoli, Amada, Marta y Ana García.

Dr^a. Yolanda Álvares, Yoli, é una chica estupenda y inolvidable que es adorada por todos. Con ella he aprendido a montar los experimentos de reactividad en aorta y en mi vida nunca he conocido persona tan optimista y feliz. Yoli ahora hace la mejor “caipirinha” de Valladolid. Trabajar con Yoli fue un placer que no olvidaré jamás.

Dr^a. Ana Maria Briones é una mujer incansable que fue para mi una fonte inesgotable de informaciones y de ayuda. Anabri tu eres una chica encantadora. Gracias.

En Madrid aprendí mucho acerca de la isla de Cuba y Fidel con la Dr^a. Amada Beltrán. Imposible pensar en Amadita y no me acordar de ella cantando Soldadito Marinero y también las canciones de Joaquin Sabina en las 40 principales. Muchas gracias chica buena y guapa.

La Dr^a. Marta Miguel en Brasil seria llamada de “El huracán Marteta” porque habla, trabaja, piensa y hace todo con una velocidad increíble. Creo que sea la única hinchita optimista del Atlético de Madrid. “El huracán Marteta” ahora es una investigadora Ramón y Cajal. Como todas las otras chicas buenas y guapas del L4 ha colaborado en este estudio con muchas ideas y también en la análisis de la actividad de la ECA. Marteta muchas gracias y enhorabuena.

Ana García me presentó a Marea y su rock gitano. Alumna de doctorado de la Prof^a. Dr^a. Mercedes Salaices me ha ayudado en experimentos y también en la adaptación al laboratorio. Gracias Ana.

En los viernes Vicente, alumno de doctorado de la Universidad Rey Juan Carlos II, participaba de la reunión. Vicente, el hombre PCR-RT, me ha ayudado con análisis de expresión génica de la COX. Vicente siempre venía con Angela, otra alumna de allí, para las reuniones y presentación de los resultados. Como estábamos en la misma situación compartíamos las angustias y alegrías del doctorado. A los dos muchas gracias.

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier. Gente boa, ótimo companheiro de viagem, metódico nos experimentos e na arrumação da mala, fã incondicional do programa “La dolce vita” y de “La Pantoja”. Amigo obrigado pelo apoio e pelas dicas que tornou a minha estadia em Madrid muito mais proveitosa.

Com a Prof^a. Dr^a. Luciana V. Rossoni tive o prazer de conviver no mesmo laboratório durante período que apesar de curto foi proveitoso para discussão de resultados e experimentos. Gracias Luciana.

Alessandra Padilha colega de doutorado na UFES e, além disso, companheira de apartamento, festas, viagens e experimentos em Madrid. Vários cafés da manhã no laboratório durante período de estabilização dos experimentos, muitas risadas e graças a Deus, resultados. Alê a experiência foi ótima, aproveitamos bastante. Gracias chica.

A Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon por me aceitar como membro de seu laboratório. Muito obrigado.

A Karina Giuberti e Patrícia Bianchi das quais tenho orgulho de ser amigo. Nestes anos de pós-graduação só compartilhamos ótimos momentos, fossem eles de ira ou alegria. Saudades dos cafés da tarde e das horas de bate-papo.

A Evandro Lebarch, grande amigo, gente boa que sempre colabora quando estamos precisando de ajuda. Obrigado amigo.

Aos amigos do LEMC com os quais tive o prazer de conviver: Casal Eduardo e Fabiana, Altemar, Liliana, Rogério (Darth Vader), Juliana, Luciana, Edna, Aurélia, Fernanda, Lorena, Miriam, Thaís, Gabriel, Kelly, Nelson, Neto e também os colegas de profissão e de laboratório Ruiva Priscila, Núbia e Guilherme. Praticamente toda esta turma foi vítima dos experimentos que realizava com a minha coqueteleira em alguns encontros da turma.

Aos companheiros de apartamento (“Calle Infanta Mercedes”) e de viagens Tiago (Pirro) e o casal Juliana e Daniel (Don y Doña Purpurina) com os quais compartilhei momentos muito engraçados. Valeu pessoal.

A Rockefeller Maciel Peçanha pelo estímulo constante. Otimista nato, gosta tanto de viver que acredita ter muitas vidas. Que fique combinado que seremos irmãos em todas elas.

Aos novos amigos Fábio, Fabiana, Daniela, Francielli, Lucielli, Robson, Cleci, Doutoranda Jaque e Alexandre “Jurerê” com os quais tenho o prazer de trabalhar e compartilhar a realidade da construção da Unipampa – Universidade Federal do Pampa (RS);

Aos funcionários Fonseca e Cláudia pelo essencial apoio técnico.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FAPES/ FUNCITEC (Fundação de Apoio a Pesquisa do ES) pelo apoio financeiro;

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

I INTRODUÇÃO

1 História do Mercúrio	21
1.1 Características do metal	22
1.2 Uso do mercúrio	23
1.3 Ciclo do Mercúrio	24
1.4 Formas de exposição ao mercúrio	26
1.5 Efeito tóxico do mercúrio	29
1.5.1 Efeito do mercúrio sobre o SNC	29
1.5.2 Efeito do mercúrio sobre o Sistema Renal	32
1.5.3 Efeito do mercúrio sobre o Sistema Cardiovascular	33
1.5.4 Outros sistemas	37
1.6 Tônus Vascular	38
1.6.1 Endotélio Vascular	39
1.6.1.1 Óxido nítrico	40
1.6.1.2 Via da Ciclooxigenase (COX)	41
1.6.1.3 Sistema Renina-Angiotensina	43
1.6.1.4 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo	45
1.6.1.5 Outros fatores	48
1.6.1.5.1 Endotelina	48
1.6.1.5.2 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)	49
1.7 Justificativa	50

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral	51
---------------------------	-----------

2.2 Objetivos específicos	51
----------------------------------	-----------

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais	52
3.2 Desenvolvimento do modelo experimental	52
3.2.1 Modelo experimental	52
3.2.2 Dosagem do cloreto de mercúrio plasmático	52
3.3 Análise do comportamento da pressão arterial sistólica	53
3.4 Estudo da reatividade vascular da aorta	53
3.4.1 Método de estudo da reatividade vascular da aorta	53
3.4.2 Protocolos experimentais	54
3.4.2.1 Período de estabilização, resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio e teste de integridade funcional do endotélio	54
3.4.2.2 Avaliação da resposta vascular à fenilefrina	54
3.4.2.2.1 Análise da modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina	56
3.4.2.2.2 Efeito do bloqueio da via do óxido nítrico, com L-NAME, sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	56
3.4.2.2.3 Análise da participação da via da angiotensina e das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina	57
3.4.2.2.4 Análise da participação dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina	57
3.4.2.3 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente e não-dependente do endotélio	57
3.4.2.3.1 Avaliação da resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio	57
3.4.2.3.2 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio	58

3.4.2.3.3 Análise da participação das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta vasodilatadora à acetilcolina	58
3.5 Estudo da expressão protéica	58
3.5.1 Western Blot para detecção da eNOS, SOD e receptor AT₁	58
3.5.1.1 Preparação do tecido e quantificação das proteínas	58
3.5.1.2 Eletroforese e transferência das amostras	59
3.5.1.3 Incubação dos anticorpos	60
3.5.1.4 Detecção das proteínas	60
3.6 Expressão de RNAm por PCR em tempo real (RT-PCR)	61
3.7 Imunofluorescência	62
3.8 Medida da produção de Prostaglandina E₂ e Tromboxano A₂	63
3.9 Quantificação da produção de ânion superóxido	64
3.10 Determinação da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA)	64
3.11 Estudo das propriedades estruturais de segmentos de aorta torácica de ratos	65
3.11.1 Microscopia Confocal	65
3.11.1.1 Análise morfométrica dos componentes celulares da parede vascular	65
3.12 Expressão dos resultados e análise estatística	66
3.13 Fármacos e reagentes utilizados	68

IV RESULTADOS

4.1 Níveis de mercúrio plasmático	71
4.2 Avaliação do comportamento da pressão arterial sistólica	71
4.3 Consumo de bebida, ração e valores de massa corporal	72

4.4 Respostas vasculares ao KCl e a fenilefrina em artéria aorta	72
4.5. Participação do endotélio na resposta contrátil a fenilefrina	73
4.6 Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico sobre a resposta vascular a fenilefrina	75
4.7 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS)	77
4.8 Participação das espécies reativas ao oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina	78
4.9 Produção de ânion superóxido	81
4.10 Expressão protéica das três isoformas da superóxido dismutase (SOD): MnSOD, CuZnSOD e EC-SOD	83
4.11 Participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina	85
4.12 Expressão gênica da COX-2	90
4.13 Expressão de COX-2 por Imunofluorescência	90
4.14 Quantificação da liberação de prostanóides derivados da COX-2	91
4.15 Análise da participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina	92
4.16 Atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA)	94
4.17 Expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT₁	95
4.18 Respostas vasculares a acetilcolina e ao DEA-NO	95
4.18.1 Participação das espécies reativas ao oxigênio na resposta vascular a acetilcolina	96
4.18.2 Participação dos prostanóides da via da COX na resposta vascular a acetilcolina	97
4.19 Análise das propriedades estruturais dos segmentos de aorta torácica	99
V DISCUSSÃO	
5.1 Modelo experimental	101
5.2 Comportamento da pressão sistólica	101

5.3 Efeito do mercúrio sobre a resposta vascular a fenilefrina	103
5.4 Participação do endotélio na resposta a fenilefrina e a acetilcolina	103
5.5 Participação das espécies reativas do oxigênio na reatividade vascular	106
5.6 Participação da COX-2 e dos prostanóides derivados desta via na resposta vascular a fenilefrina	110
5.7 Participação do sistema renina-angiotensina na resposta a fenilefrina	114
5.8 Efeito da exposição ao mercúrio sobre a estrutura da artéria	115
5.9 Atualidades e perspectivas futuras	116
<i>VI CONCLUSÕES</i>	118
<i>VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	119

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Valores do consumo médio de ração (g), água (ml) e valores médios do peso corporal (g) no início e ao término da exposição crônica ao HgCl ₂ .	72
Tabela 2: Valores de pD ₂ e resposta máxima (R _{máx} , % de contração) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.	75
Tabela 3: Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100 µM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.	77
Tabela 4: Efeito do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (0.3 Mm) , do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) e da Catalase (1000 U/ml), “scavenger” do peróxido de hidrogênio sobre os valores de pD ₂ e resposta máxima (R _{máx} , % de contração) a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.	81
Tabela 5: Efeito do inibidor não-específico da COX, indometacina (1 µM), do inibidor específico da COX-2, NS 398 (1 µM), do antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1 µM), do antagonista do receptor EP ₁ , SC 19,220 (10 µM) e do inibidor da sintase do TXA ₂ , furegrelato (10 µM), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.	89
Tabela 6: Efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Captopril (0.1 mM) e do antagonista do receptor AT ₁ , Losartan (10 mM) sobre os valores de pD ₂ e resposta máxima (R _{máx} , % de contração) obtidos através das curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.	94

Tabela 7: Valores de pD_2 e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, % de contração) obtidos através das curvas concentração-resposta à DEA-NO e acetilcolina; efeito da Apocinina, SOD e Indometacina sobre a curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de artéria aorta de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: A) Esquema representativo do banho de órgãos onde foram realizados os experimentos de reatividade vascular em segmentos de artéria aorta torácica; B) Representação dos registros dos experimentos de reatividade vascular ao KCl (75 mM), teste de integridade do endotélio e contração a fenilefrina; C) Resposta vascular a acetilcolina.	55
Figura 2: Esquema representativo do processo de imunoensaio.	63
Figura 3: Secções ópticas obtidas por meio de microscopia confocal mostrando diferentes componentes da parede vascular de anéis de aorta torácica de ratos fixadas com paraformaldeído (4%) e coradas em azul com o corante Hoechst 33342. As imagens foram capturadas com objetiva de 40x.	66
Figura 4: Comportamento dos valores da pressão arterial sistólica (PAS) medidos por meio da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Controle e Mercúrio, durante quatro semanas.	71
Figura 5: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.	73
Figura 6: Efeito da retirada mecânica do endotélio sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C).	74
Figura 7: Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100 µM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C).	76

Figura 8: Resultados da expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (n = 12) e Mercúrio (n = 12). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da eNOS e da α -actina. Células endoteliais humanas foram utilizadas como controle positivo (imagem não mostrada). 78

Figura 9: Efeito do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (0.3 mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). 79

Figura 10: Efeito do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. 80

Figura 11: Efeito da catalase (1000 U/ml), “scavenger” do peróxido de hidrogênio sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. 80

Figura 12: Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de artéria aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio quando excluída ou na presença da camada adventícia (C). 82

Figura 13: Resultados da expressão protéica das três isoformas da superóxido dismutase (SOD), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão das isoformas da SOD e da α -actina. A. CuZnSOD, B. MnSOD. C. EC-SOD. Extrato de tecido cerebral de rato foi utilizado como controle positivo para CuZn-SOD e Mn-SOD, e extrato de tecido pulmonar de rato foi o controle positivo para EC-SOD. 84

- Figura 14:** Efeito do inibidor não-específico da COX, indometacina (1 μM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). **86**
- Figura 15:** Efeito do inibidor específico da COX-2, o NS 398 (1 μM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). **87**
- Figura 16:** Efeito do antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1 μM), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). **87**
- Figura 17:** Efeito do antagonista do receptor EP₁, SC 19,220 (10 μM), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). **88**
- Figura 18:** Efeito inibidor da sintase do TXA₂, furegrelato (10 μM), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). **88**
- Figura 19:** Resultados da análise da expressão do RNAm da COX-2, por meio da técnica de PCR-RT, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. **90**
- Figura 20:** Imagens representam a expressão da COX-2, por imunofluorescência, na camada adventícia (A) e em células endoteliais (B) de segmentos de aorta de animais do grupo Mercúrio. **90**
- Figura 21:** Efeito da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a liberação de 13,14-dihidro-15-ceto PGE₂ (A) e TXB₂ (B) em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. As medidas foram realizadas nas condições: Controle, Controle + NS398, Mercúrio e Mercúrio + NS398. **92**

- Figura 22:** Efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Captopril (0,1 mM) e do antagonista do receptor AT₁, Losartan (10 mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. **93**
- Figura 23:** Atividade da ECA (mU/ml) no plasma de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. **94**
- Figura 24:** Resultados da expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT₁, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT₁ e da α -actina. **95**
- Figura 25:** Curva concentração-resposta à acetilcolina (A) e ao doador de óxido nítrico, DEA-NO (B) em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio pré-contraídas com fenilefrina. **96**
- Figura 26:** Efeito do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (0,3 mM) (A) e efeito do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) (B) sobre a curva concentração-resposta à acetilcolina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos do grupo Mercúrio pré-contraídas com fenilefrina. **97**
- Figura 27:** Efeito do inibidor não-específico da COX, indometacina (1 μ M) sobre a curva concentração-resposta à acetilcolina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos do grupo Mercúrio pré-contraídas com fenilefrina. **98**

RESUMO

A exposição ao mercúrio é relacionada a alterações no sistema nervoso central e renal. Nos últimos anos associa-se também ao maior risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares, porém não estão totalmente esclarecidos os mecanismos pelos quais este metal exerce efeito tóxico sobre este sistema. Neste estudo foi desenvolvido um modelo experimental de exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl_2) e avaliado o efeito desta exposição sobre a pressão arterial sistólica (PAS), a participação de produtos derivados do endotélio, prostanóides derivados da via da ciclooxigenase-2 (COX-2), espécies reativas do oxigênio (EROs) e do sistema renina-angiotensina na reatividade vascular de artérias de condutância. Experimentos em segmentos de artéria aorta de ratos Wistar de 3 meses de idade tratados diariamente, por 30 dias, com HgCl_2 (1ª dose: 4,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, doses seguintes: 0,07 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$, i.m) ou veículo. Os experimentos de reatividade vascular foram realizados em banho de órgãos, a espectrometria de absorção atômica para determinação da concentração sanguínea de mercúrio, PCR-RT e *Western Blot* para verificar a expressão gênica e protéica, microscopia confocal na análise os níveis de ânion superóxido, propriedades estruturais e localização da COX nas artérias, kits comerciais para medida de produção de prostanóides derivados da via da COX-2, determinação da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) pelo método fluorimétrico e pletismografia de cauda para medida da PAS. Ao final do tratamento os ratos expostos ao mercúrio apresentavam níveis sanguíneos de mercúrio de $7,97 \pm 0,59 \text{ ng/ml}$. Não houve alteração na PAS, mas houve aumento da resposta contrátil a fenilefrina, e redução da resposta vasodilatadora a acetilcolina, sem alterar o relaxamento induzido pelo doador de óxido nítrico, DEA-NO. A participação do endotélio na modulação da resposta a fenilefrina foi reduzida e prostanóides vasoconstritores derivados da via da COX-2, EROs e o sistema renina-angiotensina participam do incremento desta resposta. Maior produção de EROs, aumento da atividade plasmática da ECA, incremento da expressão gênica do RNAm para COX-2 e maior produção dos prostanóides vasoconstritores (PGE_2 e TXA_2) derivados da COX-2 foram observados em animais expostos ao mercúrio e reforçam a hipótese de maior participação destas vias na alteração da resposta vascular a fenilefrina. Na presença da superóxido dismutase (SOD) ocorreu melhora da resposta vasodilatadora a acetilcolina nos ratos do grupo Mercúrio, indicando que a disfunção endotelial parece ser provocada pela maior produção de EROs. A SOD extracelular (EC-SOD) teve expressão aumentada pela exposição ao mercúrio.

Estes resultados sugerem que neste novo modelo experimental de exposição crônica a baixas concentrações de HgCl_2 há disfunção endotelial devido a redução da biodisponibilidade do NO induzida pelo aumento do estresse oxidativo, além de aumento da resposta contrátil a fenilefrina com maior participação do sistema renina-angiotensina, EROs e de prostanóides vasoconstritores derivados da via da COX-2 nesta resposta. Estes resultados ajudam a esclarecer os mecanismos pelos quais o mercúrio, em baixas doses, exerce efeito tóxico sobre o sistema cardiovascular e pode ser considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Mercury exposure produces toxic effects in central nervous system and kidneys. Recently these toxic effects were associated to cardiovascular events but the underlying mechanisms are not well explored. The main purpose of this study was to investigate if mercury exposure at low doses alters vasoconstrictor prostanoids production from cyclooxygenase-2 (COX-2) and its contribution to phenylephrine vasoconstrictor responses and acetylcholine vasodilator responses. For this were developed an experimental model of exposure to low doses of mercury chloride (HgCl₂) and evaluated the effect of this exposure on systolic blood pressure (SBP), the participation of products derived from the endothelium, prostanoids derived from the cyclooxygenase-2 (COX-2), reactive oxygen species (ROS) and the renin-angiotensin system in vascular reactivity in conductance arteries. Aortic segments from 3-month old Wistar rats daily treated with HgCl₂ (1st dose 4.6 µg/kg, subsequent dose 0.07 µg/kg/day, *i.m*) or vehicle for 30 days were used. The vascular reactivity experiments were performed in an organ bath, the atomic absorption spectrometry for determination of blood concentration of mercury, RT-PCR and Western blot to verify the gene and protein expression, confocal microscopy analyzed levels of superoxide anion and structure of arteries. A commercial kit used to determine the production of prostanoids derived from COX-2 pathway. The activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) was measured by fluorometry method and SBP by tail plethysmography. Blood levels of mercury at the end of treatment were 7.97 ± 0.59 ng/ml. Mercury treatment did not affect systolic blood pressure, but increased phenylephrine contractile responses, reduced acetylcholine-induced vasodilatation and did not change the vasodilatation by the nitric oxide donor, DEA-NO, in aortic rings. The contractile prostanoids derived from COX-2 pathway, reactive oxygen species (ROS) and increased plasmatic ACE activity were related to these responses. Increased production of EROS, increased plasma ACE activity, increased gene expression of mRNA for COX-2 and increased production of contractile prostanoids (PGE₂ and TXA₂) derived from COX-2 were observed in animals exposed to mercury and reinforce the hypothesis of a greater involvement of these pathways in the alteration of vascular response to phenylephrine. In the presence of superoxide dismutase (SOD) the vasodilator response to acetylcholine was improved in rats of the mercury group, indicating that endothelial dysfunction appears to be responsible for the increased production of EROS. The extracellular SOD (EC-SOD) expression was increased by exposure to mercury.

These results suggest that this new experimental model of chronic exposure at low concentrations of HgCl₂ promotes endothelial dysfunction due to the reduced bioavailability of NO induced by increased oxidative stress, and increase the contractile response to phenylephrine with greater involvement of the renin-angiotensin system, EROS and contractile prostanoids derived from COX-2 pathway in this response. These results help to clarify the mechanisms by which mercury at low doses exerts toxic effects on the cardiovascular system and can be considered a risk factor for development of cardiovascular disease.

I INTRODUÇÃO

1 História do Mercúrio

O mercúrio tem como símbolo o Hg e origem na palavra *Hidrargiro*, do grego *Hydro* (água) e *árgyros* (prata). Por ser líquido o mercúrio só foi classificado como metal e teve suas propriedades físico-químicas descritas a partir do século XVIII, sendo Antoine Laurent Lavoisier o primeiro a reconhecê-lo como elemento químico (Azevedo, 2003).

O fato de somente no século XVIII terem sido descritas as propriedades físico-químicas do mercúrio pode gerar a falsa idéia que este metal só passou a ser utilizado recentemente, no entanto, o mercúrio é utilizado há mais de 2.500 anos. O homem pré-histórico utilizava o cinábrio (principal minério do mercúrio – sulfeto de mercúrio), devido a sua coloração vermelho-dourada, para desenhar nas paredes das cavernas e em pinturas faciais. Posteriormente o mercúrio passou a ser utilizado na amalgamação, alquimia, fotografia e também no tratamento de algumas doenças. O uso na amalgamação foi iniciado depois que Vitruvius (500 a.C) observou que o mercúrio dissolvia o ouro e poderia ser utilizado para recuperar o ouro das roupas, e durante séculos os alquimistas utilizaram o mercúrio na tentativa de transformar chumbo em ouro (Graeme & Pollock, 1998).

Várias civilizações utilizaram o mercúrio no tratamento de doenças nos olhos, ouvidos, pulmões, intestinos, no tratamento da sífilis e para estimular contrações uterinas durante o parto. Além disso, foi utilizado como anti-séptico, cosmético e afrodisíaco. (Yamada *et al.*, 1997; Azevedo, 2003).

Posteriormente várias medidas contra a exposição ao mercúrio foram adotadas e um dos exemplos ocorreu na antiga Iugoslávia onde trabalhadores de minas de mercúrio tiveram a carga horária de trabalho reduzida de 14 para 6 horas/dia e na Itália uma fábrica de cloreto de mercúrio (HgCl₂) que provocou a intoxicação de várias pessoas foi acionada judicialmente pela comunidade (Azevedo, 2003).

A intoxicação crônica pelo mercúrio, provoca uma das mais antigas doenças ocupacionais, chamada de Hidrargismo ou Mercurialismo. Os efeitos neurológicos da intoxicação por metilmercúrio, foram descritos pela primeira vez na década de 40, a partir da autópsia de indivíduos que trabalhavam com fungicidas contendo mercúrio

que evidenciou lesão neuronal difusa e atrofia cerebral (Swensson & Ulfvarsson, 1963).

No entanto, foi necessária a ocorrência de catástrofes para que fosse despertado na comunidade científica maior interesse para estudo dos efeitos tóxicos do mercúrio. Dentre os maiores acidentes podem ser destacados os ocorridos no Japão e Iraque. O acidente no Japão (1953) ocorreu em decorrência do despejo na baía de Minamata de dejetos industriais contendo grande quantidade de mercúrio que causou contaminação dos peixes e desencadeou o aparecimento de várias manifestações neurológicas na população local que era grande consumidora de peixe. Dentre as manifestações destacam-se: retardo mental, paralisia cerebral, neuropatia periférica e cegueira. A partir de então estas alterações associadas a intoxicação por mercúrio passaram a ser chamadas de Doença de Minamata (Gochfeld, 2003). Outra catástrofe ocorreu no Iraque (1971) onde aproximadamente 500 pessoas morreram envenenadas após consumirem pão feito com trigo contaminado por mercúrio devido à utilização de fungicidas contendo mercúrio orgânico nas lavouras de trigo (Bakir *et al.*, 1973). Acidentes como estes associados ao fato de que ainda hoje em países como Brasil (Passos & Mergler, 2008), Eslovênia (Zadnik & Pompe-Kirn, 2007), Indonésia e Filipinas (Appleton *et al.*, 1999) ainda utilizarem o mercúrio para a extração do ouro e submeterem garimpeiros e a população que vive próxima aos rios a intoxicação por mercúrio, tornam essencial o desenvolvimento de pesquisas nesta área da toxicologia não só para conhecimento dos efeitos tóxicos, mas também para a descoberta de possíveis tratamentos a serem utilizados em casos de intoxicação por este metal.

1.1 Características do metal

Uma das características mais conhecidas do mercúrio é de ser encontrado no estado líquido tanto em temperatura ambiente como a 0°C. Na tabela periódica de classificação dos elementos pertence ao grupo 12, possui número atômico 80 e massa atômica de 200,59 u sendo considerado metal de transição que possui isótopos naturais (202, 200, 201, 198, 204 e 196) e radioativos (203 e 197).

O mercúrio pode se apresentar na forma elementar (Hg^0 – mercúrio metálico) e também nas formas oxidadas onde o átomo perdeu um ou dois elétrons, são elas: 1+ (Hg_2^{+2} – íon mercuroso) e 2+ (Hg^{2+} - íon mercúrico). Estas diferentes formas de mercúrio podem sofrer especiação e dar origem aos principais grupos,

que são: mercúrio elementar, mercúrio orgânico e inorgânico. Quando o mercúrio se combina com o cloro, enxofre ou oxigênio são formados os compostos inorgânicos que também são chamados de sais de mercúrio, entretanto quando o metal se liga de forma covalente com o carbono ele dá origem aos compostos de mercúrio orgânico também chamados de organometálicos (UNEP, 2002).

Dentre os compostos inorgânicos de mercúrio podemos destacar o HgCl_2 que é altamente tóxico e corrosivo; o cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2); o sulfeto de mercúrio (HgS) que possui coloração vermelha e devido a isso é utilizado como pigmento de tintas e o fulminato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{CNO})_2$) utilizado como detonador em explosivos (HSDB, 2004).

Os compostos organometálicos tem aparências distintas e o odor varia de acordo com o radical alquila ao qual está ligado (NIOSH, 2007). Utiliza-se a expressão metilmercúrio para designar os compostos monometilmercuriais e muitas vezes estes compostos não são totalmente conhecidos e sabe-se somente que contém o cátion metilmercúrio (CH_3Hg^+). Alguns destes compostos foram usados como pesticidas e tiveram aplicação médica como anti-séptico e diurético. Dentre os diuréticos organomercuriais os fármacos comercialmente mais conhecidos são: Neidrina, Mercuidrina, Tiomerin, Novasurol e Neptal. Os antissépticos organomercuriais mais conhecidos são: Merthiolate, Bacteran, Thimerosal, Timerosal, Tiomersal, Mercúrio cromo e Phemernite. Vários pesticidas organomercuriais como o Abavit, Acetato etilmercúrico, Aretan, Ceresan, Clerit foram utilizados na agricultura (WHO, 1990).

1.2 Uso do mercúrio

O mercúrio metálico é muito utilizado na indústria de cloro-álcali onde para cada tonelada de cloro-soda fabricada é lançado no meio ambiente aproximadamente 250 g de Hg o que totaliza o lançamento de dezenas de toneladas de Hg/ano no meio ambiente (Fishbein, 1971). Este tipo de mercúrio também é utilizado na produção de barômetros, esfigmomanômetros, termômetros, na produção de lâmpadas elétricas, na construção de supercondutores e na amalgamação onde é utilizado com a liga de prata-estanho em restaurações dentárias e nos garimpos para amalgamação do ouro e da prata. Estima-se que são utilizados 2 quilos (Kg) de Hg para cada Kg de ouro produzido no Brasil e

aproximadamente 70 toneladas de mercúrio metálico, utilizados no garimpo, são lançados no meio ambiente (Pfeifer *et al.*, 1989; Azevedo, 2003).

Na medicina o mercúrio inorgânico foi utilizado no tratamento da sífilis e também como anti-séptico, purgante e diurético. Também são utilizados como detonadores de explosivos (fulminato de mercúrio) e como corantes na produção de tintas utilizadas na proteção de cascos de navios que em contato com a água do mar libera mercúrio e, por isso, apresenta risco ambiental (WHO, 1991).

No passado vários medicamentos utilizados como diuréticos e anti-sépticos continham compostos organomercuriais (mercúrio orgânico) em sua fórmula. A agência americana “*Food and Drug Administration*” (FDA) estima que aproximadamente 80 Kg / ano de compostos organomercuriais seja utilizado em medicamentos. Os compostos organomercuriais também foram utilizados em desinfetantes e fungicidas (FDA, 2001).

1.3 Ciclo do Mercúrio

O ciclo do mercúrio compreende a emissão, a circulação atmosférica de seus vapores e a precipitação com as chuvas que faz com que o mercúrio retorne as terras e as águas (Boening, 2000). A emissão do mercúrio constitui parte importante do ciclo deste metal na natureza e pode ocorrer de forma natural, por meio de processos naturais ou antropogênica quando sua emissão ocorre como resultado de atividades humanas (EPA, 1997).

A emissão natural é principalmente causada pelos desgastes de materiais geológicos, erupções vulcânicas e também pela volatilização do mercúrio presente no ambiente marítimo e na vegetação tem como fonte o mercúrio que já existia no período pré-industrial, bem como, o mercúrio já mobilizado por atividades humanas (EPA, 1997). A emissão antropogênica deriva principalmente da queima de combustíveis fósseis, das indústrias de cloro-álcali, da mineração e da queima de lixo (Davidson *et al.*, 2006; Lindberg *et al.*, 2007; WHO, 1990). Apesar de terem pequena quantidade de mercúrio em sua composição a utilização em grande escala do carvão (10 a 8,530 ppb de Hg) e do petróleo (20 a 2.000 ppb de Hg) como combustíveis os torna importantes fontes de emissão do mercúrio. O mercúrio emitido tanto de forma natural como antropogênica encontra-se na forma inorgânica principalmente como vapor metálico (Hg^0) (Hansen & Danscher, 1997)

Atualmente devido a diversas atividades humanas e industriais a emissão antropogênica de mercúrio tem causado forte impacto sobre o ciclo global do mercúrio. Estima-se que no período pré-industrial a quantidade de mercúrio presente na atmosfera era de aproximadamente 1/3 da encontrada atualmente e estima-se que atualmente 40 a 75% da emissão anual de mercúrio ocorram pela forma antropogênica (Lindqvist *et al.*, 1991; Horvat *et al.*, 1993; Expert Panel on Mercury Atmosphere Processes, 1994).

Acredita-se que cerca de 200.000 toneladas de mercúrio já foram emitidas desde o ano de 1890 e estima-se que 95% do mercúrio existente encontre-se no solo, 3% nos oceanos e 2% na atmosfera (Expert Panel on Mercury Atmosphere Processes, 1994). A quantidade total de mercúrio em nosso planeta aumentou em até 5 vezes após o início do período industrial (Mason *et al.*, 1994). Análise do solo e da água na Suécia revelou que o nos últimos 20 séculos a concentração de mercúrio aumentou de 3 a 7 vezes (EPA Swedish, 2001). Em estudos semelhantes realizados nos Estados Unidos foram notadas concentrações de mercúrio 3 a 4 vezes maior do que a encontrada no período pré-industrial (EPA, 1997).

A emissão de mercúrio para a atmosfera também pode ser dividida em: a) emissão devido a mobilização de mercúrio da crosta terrestre; b) emissão antropogênica atual pela utilização de combustíveis fósseis; c) emissão antropogênica de mercúrio utilizado em produtos; d) re-emissão de antiga liberação antropogênica do mercúrio (UNEP, 2002).

A deposição do mercúrio está diretamente relacionada a forma do metal. O mercúrio elementar (Hg^0) permanece na atmosfera por aproximadamente um ano sendo posteriormente depositado enquanto formas oxidadas do mercúrio têm deposição que pode variar de algumas horas a meses. Nas nuvens o mercúrio sofre um processo de transformação onde o Hg^0 é transformado em Hg^{2+} que pode rapidamente precipitar com a chuva e a neve ou ser adsorvido por pequenas partículas e posteriormente sofrer um processo de deposição seco ou úmido. Esta transformação do mercúrio serve como base para explicação de que as fontes antropogênicas que emitem Hg^0 para a atmosfera são também responsáveis pela deposição de mercúrio no solo e na água (EPA, 1997).

No solo o mercúrio inorgânico pode ser transformado em mercúrio orgânico, por um processo chamado de metilação, por ação de bactérias que são mais ativas nas regiões superficiais do solo. O mercúrio inorgânico que sofre processo de

metilação da origem ao monometilmercúrio e posteriormente ao dimetilmercúrio. O monometilmercúrio integra a cadeia trófica e também pode dar origem ao dimetilmercúrio que é insolúvel, mas por ser volátil é emitido para a atmosfera e posteriormente será transformado em monometilmercúrio e retornará ao meio aquático (Clarkson *et al.*, 2003).

A contaminação dos oceanos e dos peixes dependem da região do oceano e do tipo de peixe. O oceano pode ser dividido em três áreas chamadas: mar aberto que corresponde a 90% da área oceânica total; região costeira e zona de ressurgência que correspondem a aproximadamente 10% e 0,1% respectivamente. Apesar da menor extensão da região costeira e da zona de ressurgência é nelas que ocorre quase toda a produção de peixe (Rolfus & Fitzgerald, 1995).

Além de receber o monometilmercúrio direto das águas das chuvas, nos oceanos e lagos também existe o mercúrio inorgânico que é transportado unido a partículas que em regiões com menor oxigenação sofre a metilação e dá origem ao mercúrio orgânico (monometilmercúrio). Posteriormente as partículas com as quais o mercúrio está unido sofrem deterioração e ocorre a liberação do mercúrio (Fitzgerald & Clarkson, 1991). Acredita-se que o monometilmercúrio produzido em mar aberto e em zonas de ressurgência e posteriormente transportado para regiões com menos de 100 metros de profundidade onde passa a integrar a cadeia alimentar (Mason & Fitzgerald, 1993; Mason *et al.*, 1995). Nestas regiões algas e plantas possuem concentração de mercúrio maior do que a encontrada nas águas e conseqüentemente os peixes que se alimentam destas algas e plantas apresentam concentração ainda maior deste metal. Na bacia amazônica peixes carnívoros apresentam maior concentração de mercúrio e isso se deve a bioacumulação do mercúrio na cadeia alimentar. Além disso, peixes com grande longevidade também apresentam alta concentração de mercúrio porque a taxa de eliminação deste metal pelo organismo é pequena (Malm *et al.*, 1995; Akagi *et al.*, 1995; Bidone *et al.*, 1997).

1.4 Formas de exposição ao mercúrio

O mercúrio tem a capacidade de se acumular (bioacumulação) e ter seu efeito magnificado (biomagnificação) nos organismos. A bioacumulação do mercúrio é facilitada por sua lipossolubilidade que torna mais fácil o transporte através das membranas celulares, e por sua capacidade de reagir e se ligar a componentes

intracelulares (UNEP 2002; WHO, 1996). A biomagnificação consiste no acúmulo de mercúrio por níveis tróficos sucessivos, pois toda vez que um organismo que ocupa um nível inferior da cadeia alimentar está contaminado com Hg o seu predador apresentará concentrações comparativamente aumentadas. Os processos de bioacumulação e biomagnificação tornam o mercúrio um importante fator de risco à saúde humana (WHO 1990; Olivero *et al.*, 1997; Boening, 2000).

O homem encontra-se no topo da cadeia alimentar e por isso uma das principais formas da exposição humana ao mercúrio se dá por meio do consumo de peixe contaminado com metilmercúrio (Clarkson & Magos, 2006; McKelvey *et al.*, 2007). Em populações que utilizam o peixe como principal fonte de proteínas isso se torna um importante problema de saúde pública (Mahaffey, 2004, Clarkson *et al.*, 2003), pois tem sido observado que a exposição ao mercúrio está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente do infarto agudo do miocárdio (Salonen *et al.*, 1995; Guallar *et al.*, 2002). Apesar do peixe ser rico em ômega-3 que tem efeito cardioprotetor e reduz o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, este efeito parece ser inibido quando consumido peixe contaminado com mercúrio (Oomen *et al.*, 2000; Dewailly *et al.*, 2001; Chan & Egeland, 2004; Stern, 2005). Na maior catástrofe provocada pelo consumo de peixe contaminado com metilmercúrio na cidade de Minamata os indivíduos que consumiram peixes contaminados além de desenvolverem a doença de Minamata apresentavam hipertensão arterial e disfunções hepáticas e metabólicas (Graeme & Pollock, 1998; Eto, 2000; Harada, 1995).

Os dentistas, seus auxiliares e indivíduos que utilizam restauração dentária com amálgama de mercúrio também estão frequentemente expostos ao vapor de mercúrio que é inalado e posteriormente absorvido (Clarkson *et al.*, 1997). Isso ocorre porque na restauração com amálgama aproximadamente 50% da amálgama é constituída de mercúrio combinado com prata e zinco. Este tipo de restauração é utilizada há mais de 150 anos por ser mais resistente e ter menor custo do que outros tipos de restauração. O uso deste tipo de restauração atualmente é muito discutido devido o risco do mercúrio para a saúde e porque durante o processo de mastigação e ingestão de líquidos quentes ocorre a liberação de vapor de mercúrio na cavidade oral. Estima-se que uma restauração com amálgama de mercúrio libere de 3 a 17 μg de vapor de mercúrio por dia em concentrações maiores do que as recomendadas por organizações de saúde (WHO, 1990; Sallsten *et al.*, 1996;

Clarkson *et al.*, 2003). A remoção destas restaurações também promove a liberação e aumento da concentração sanguínea de mercúrio (Moulin *et al.*, 1990). O número de restaurações com amálgama de mercúrio está relacionada a concentração urinária e sanguínea de mercúrio e foi observado que indivíduos com mais de 10 restaurações com amálgama de mercúrio apresentavam concentração urinária de mercúrio duas vezes maior do que indivíduos sem restauração (Kingman *et al.*, 1998)

Ritchie *et al.* (2002) verificaram a concentração urinária de mercúrio e realizaram testes psicomotores em um grupo voluntário de dentistas escoceses e observaram que a concentração média de mercúrio foi de 6,8 µg de Hg/L e a máxima de 55 µg de Hg/L, e que estes apresentavam pior resultado nos testes psicomotores. Especula-se também que a exposição a baixas concentrações de vapor de mercúrio esteja associada a alterações cognitivas, piora da memória e também pode ser a causa de piora de doenças de Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (WHO, 1991; Clarkson *et al.*, 2003). No entanto, ainda hoje é questionado se este tipo de exposição realmente prejudica a saúde e este questionamento é válido porque apesar de estudos *in vitro* indicarem que o mercúrio participa de processos bioquímicos que parecem estar envolvidos na doença de Alzheimer (Leong *et al.*, 2001) estudos epidemiológicos não demonstram associação entre a restauração dentária com amálgama de mercúrio e o desenvolvimento de doenças degenerativas (Saxe *et al.*, 1995; Bjorkman *et al.*, 1996; Ahlqwist *et al.*, 1999).

Outra importante forma de exposição humana ao mercúrio ocorre por meio do Timerosal que desde os anos 30 é utilizado como conservante de vacinas devido a sua ação bactericida que se deve a ação do etil mercúrio. Nos anos 90 diferentes tipos de vacinas contendo timerosal foram utilizadas na imunização de crianças em todo o mundo e no final desta mesma década alguns autores chamaram a atenção para o fato de que crianças nascidas nos Estados Unidos, nas quais era administrada toda a série de vacinas recomendada, recebiam até 187,5 µg de etil mercúrio durante os seis primeiros meses de vida (American Academy of Pediatrics, 1999; Clements *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 2001). Considerando o efeito cumulativo do mercúrio isso poderia exceder o limite de segurança de 0,1 µg Hg/Kg/dia recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1997) e isso fez com que a Associação Americana de Pediatria recomendasse a retirada

do Timerosal das vacinas administradas a crianças (American Academy of Pediatrics, 1999). Isso ocorreu porque acreditavam que estas vacinas provocavam hiperatividade, autismo e alteração no desenvolvimento neuromotor (Ball *et al.*, 2001; Hviid *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2004).

1.5 Efeito tóxico do mercúrio

No século XIX já haviam sido descritos casos de morte de envenenamento por metilmercúrio na Inglaterra (1860) quando este foi sintetizado, porém, somente após as grandes catástrofes ocorridas no Japão (Eto, 2000) e no Iraque (Bakir *et al.*, 1973) é que foram evidenciados os grandes efeitos tóxicos deste metal. Desde então foi verificado que o mercúrio tem efeito tóxico principalmente sobre o sistema nervoso central (SNC) onde além de causar o desenvolvimento de doenças degenerativas provoca distúrbios no cérebro em desenvolvimento (Mutter *et al.*, 2004). Posteriormente foi verificada a relação entre exposição ao mercúrio com o aumento do risco de mortalidade por doença renal (Hodgson *et al.*, 2007) e mais recentemente tem sido feita associação da exposição ao mercúrio com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Salonen *et al.*, 2000; Virtanen *et al.*, 2005; Houston, 2007).

Todas as formas de mercúrio são tóxicas e o efeito tóxico está relacionado ao tempo de exposição, a via de exposição e a forma química do metal (Zalups, 2000).

A seguir são descritos os principais sistemas acometidos pelos efeitos tóxicos do mercúrio, bem como, os principais mecanismos de ação do mercúrio.

1.5.1 Efeito do mercúrio sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)

O interesse em conhecer os efeitos neurotóxicos e os mecanismos de ação do mercúrio está historicamente associado à doença de Minamata. Na autópsia de indivíduos portadores da doença de Minamata foram encontradas altas concentrações de mercúrio no cérebro (2,6 a 24,8 ppm) e as regiões do encéfalo mais acometidas eram as áreas sensitivas (giro pré-central) e motoras (giro pós-central), o córtex temporal e o cerebelo. A dilatação dos espaços perivasculares, morte neuronal, ativação da micróglia e desmielinização foram as alterações estruturais mais observadas. Alterações semelhantes foram observadas em cérebros de crianças expostas a grandes concentrações de metilmercúrio na vida intra-uterina

(Choi, 1989; Ninomiya *et al.*, 1995; Harada, 1995; Takeuchi *et al.*, 1996). Após a exposição ao mercúrio existe um período de latência, que pode variar de meses a anos, até o início do aparecimento dos sintomas e o desenvolvimento das lesões do SNC (Rice, 1996).

No período pré-natal o SNC é mais sensível ao efeito tóxico do metilmercúrio. Cox *et al.* (1989) observaram em crianças iraquianas correlação entre o nível de exposição da mãe ao metilmercúrio durante a gestação e atraso psicomotor. Resultado semelhante foi encontrado em crianças das Ilhas Faroe onde maior exposição pré-natal ao metilmercúrio foi relacionada ao déficit de atenção, memória, linguagem e função motora (Grandjean *et al.*, 1997, 1999).

A diferença das alterações cerebrais promovidas pelo mercúrio no período fetal e no indivíduo adulto não é bem conhecida. No entanto, sabe-se que indivíduos expostos ao metilmercúrio no período pré-natal apresentam alteração na citoarquitetura do cérebro e redução do número de neurônios tornando factível a hipótese que este metal interfira na divisão e na migração celular. Esta hipótese é corroborada por estudos que notaram que o metilmercúrio inibe a divisão e a migração celular em experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*” (Sager *et al.*, 1984; Ponce, *et al.*, 1994; Kunimoto & Suzuki, 1997). Por sua grande afinidade com o grupo sulfidril da tubulina o metilmercúrio inibe a organização dos microtúbulos que são importantes no desenvolvimento do SNC (Choi *et al.*, 1981; Mottet *et al.*, 1997; Castoldi *et al.*, 2000). Além disso, promove a liberação de radicais livres que atuam sobre o DNA, lipídios e outros componentes celulares (LeBel *et al.*, 1992). A observação de que em estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” antioxidantes como a vitamina E, glutatona, catalase e o selênio têm efeito protetor contra a toxicidade do metilmercúrio evidencia que o efeito neurotóxico desta forma do mercúrio parece estar relacionado principalmente a maior produção de radicais livres (Park *et al.*, 1996; Sarafian, 1999; Dare *et al.*, 2000; Gasso *et al.*, 2001). Por outro lado já foi observado que o metilmercúrio também altera a homeostase intracelular de cálcio (Danbolt, 2001; Sirois & Atchison, 2000) e age sobre os astrócitos inibindo a captação do glutamato promovendo aumento dos níveis de glutamato e da estimulação glutamatérgica que pode levar a morte celular e neurodegeneração (Brookes, 1992; Aschner *et al.*, 2000).

Alguns autores notaram que a exposição animal ao metilmercúrio além de promover alterações comportamentais causa alterações no sistema colinérgico

levando a redução da atividade da acetilcolina transferase e da acetilcolinesterase (Tsuzuki, 1981; Omata *et al.*, 1982; Day *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2005). Como a transmissão colinérgica está envolvida com funções cognitivas e comportamentais estas alterações parecem ser o mecanismo pelo qual este metal promove distúrbios do comportamento em animais.

Outra forma de mercúrio, o HgCl_2 , também possui efeito neurotóxico que parece estar associado ao aumento do estresse oxidativo, pois a exposição de neurônios motores de camundongos e de astrócitos de ratos a este tipo de mercúrio promoveu aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio (Hussain *et al.*, 1997; Brawer *et al.*, 1998; Konigsberg *et al.*, 2001). O SNC é suscetível ao aumento das espécies reativas ao oxigênio porque possui menor capacidade antioxidante do que outros tipos celulares (Philbert *et al.*, 1991; Halliwell, 1992) e no SNC as espécies reativas ao oxigênio agem sobre enzimas, proteínas, membranas lipídicas e até sobre o DNA alterando vias de sinalização intracelular necessárias para a sobrevivência dos neurônios (Maher & Schubert, 2000; Droge, 2002). É sabido que o estresse oxidativo está associado à etiologia de doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Parkinson e o mal de Alzheimer (Beal, 2002; Chong *et al.*, 2005).

Também foi observado que em células humanas o HgCl_2 inibe a ativação da via da Jak-STAT por citocina, que é uma via de comunicação intracelular que regula a proliferação e a diferenciação celular (Leonard & Oshea, 1998; Kisseleva *et al.*, 2002; Monroe & Halvorsen, 2006). Estes achados reforçam a hipótese que o mercúrio tem ação neurotóxica e provoca alterações com características semelhantes as encontradas em doenças neurodegenerativas como a Esclerose Lateral Amiotrófica e o mal de Alzheimer.

Estudos epidemiológicos que analisam o efeito tóxico do mercúrio, bem como, as formas de exposição e também a concentração e a disposição do mercúrio no corpo serviram como base para que a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos determinasse uma dose / limite oral diária de metilmercúrio para proteção da saúde humana, esta dose foi estimada em 0,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ (EPA, 1997). Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera tolerável uma ingestão diária de até 0,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ (WHO, 1996). A diferença de valores pode residir no fato de que a agência americana baseou-se em estudos epidemiológicos realizados no Iraque

enquanto a OMS utilizou dados de estudos realizados no Japão (Castoldi *et al.*, 2003).

1.5.2 Efeito do mercúrio sobre o Sistema Renal

Os rins desempenham importante papel na excreção de substâncias tóxicas e também é o órgão alvo favorito de muitas destas substâncias por suas características anatômicas e fisiológicas como o grande fluxo sanguíneo e a intensa atividade enzimática (Passow *et al.*, 1961; Zalups 1991a, 1991b, 1993; Van Vleet & Schnellmann, 2003).

O mercúrio é uma importante substância nefrotóxica que induz a falência renal tanto em humanos como em animais experimentais e afeta principalmente os túbulos proximais (Clarkson, 1997; Zalups, 2000; Stacchiotti *et al.*, 2003) e o conteúdo intrarenal de mercúrio está relacionado com a gravidade das lesões renais e da nefropatia (Houser *et al.*, 1992; Bohets *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 1995). Pelletier *et al.*, (1987) e Bagenstose *et al.*, (1999) observaram que após exposição ao mercúrio os animais desenvolviam glomerulonefrite mediada pelo sistema imunológico. Em humanos foi observado que a exposição ao mercúrio elementar (Hg^0) provocava glomerulonefrite, disfunção tubular e síndrome nefrótica (Becker *et al.*, 1962; Tubbs *et al.*, 1982; Bernard & Lauwerys, 1989; Kobal *et al.*, 2000).

Mais recentemente Hodgson *et al.* (2007) observaram que existe relação entre a exposição a ambientes com mercúrio e o maior risco de morte por doença renal. Inicialmente a exposição a baixas doses de mercúrio pode resultar em pequenas mudanças da função renal que são compensadas, enquanto a exposição a doses mais altas provoca maior dano a função renal, podendo levar a morte por doença renal (Zalups & Lash, 1994; Remuzzi & Bertani, 1998, Hodgson *et al.*, 2007). No entanto, ainda não se sabe qual a dose e o tempo de exposição necessários para causar disfunção renal.

O aumento da excreção de proteínas e o aumento da atividade de algumas enzimas lisossomais na urina são os primeiros indicadores de disfunção renal em indivíduos expostos ao mercúrio elementar (Barregard *et al.*, 1988; Kobal *et al.*, 2000). Franko *et al.*, (2005) observaram que indivíduos que trabalhavam em minas de mercúrio após curto período de exposição apresentavam aumento na excreção de albumina, imunoglobulina G (IgG), α_1 -microglobulina indicando a possibilidade deste indivíduos apresentarem uma moderada disfunção renal por disfunção tubular

em decorrência da exposição ocupacional ao mercúrio. Resultado semelhante foi encontrado por Buchet *et al.* (1980) com trabalhadores da indústria de cloro-alkali.

A grande afinidade do mercúrio pelos grupos sulfidril parece estar relacionado à disposição deste metal nos rins e a seu efeito nefrotóxico. Isso explica porque alterações intracelulares ou extracelulares dos grupos tióis podem afetar tanto a captação renal como o efeito nefrotóxico do mercúrio (Zalups & Lash, 1994). Além disso, sabe-se que alterações mitocondriais (Fowler & Woods, 1977; Lund *et al.*, 1993; Stacchiotti *et al.*, 2004), aumento da produção de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica (Lund *et al.*, 1993) e o estresse oxidativo associado à depleção de glutathione (Gstraunthaler *et al.*, 1983) são alguns dos mecanismos associados ao efeito nefrotóxico dos compostos de mercúrio.

Outro mecanismo relacionado à toxicidade renal do mercúrio foi descrito por Dieguez-Acuña *et al.* (2001) e Woods *et al.* (2002) que observaram que o mercúrio (Hg^{2+}) em baixas concentrações provocava redução da ativação do fator nuclear kappa b (NFkB) que está envolvido na indução de vários tipos de genes, em especial daqueles envolvidos com a proliferação celular e processos anti-apoptóticos. Além disso, o efeito do mercúrio sobre o NFkB pode tornar as células renais mais susceptíveis ao efeito de outros agentes tóxicos (Sha *et al.*, 1995; Kretz-Remy *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999). Posteriormente, Dieguez-Acuña *et al.* (2004) observaram que o mercúrio (Hg^{2+}) além de inibir a ativação do NFkB em células do epitélio renal promove o aumento da sensibilidade destas células a estímulos apoptóticos produzidos por outros agentes.

O acúmulo e os efeitos tóxicos do mercúrio nos rins sofrem influência de várias substâncias, dentre as quais podemos destacar o conteúdo intracelular e extracelular de glutathione e da metalotionina. Além disso, algumas substâncias quelantes como o DMPS (2,3-dimercaptopropanossulfato de sódio) e o DMSA (ácido dimercaptosuccínico) têm sido utilizados com o objetivo de prevenir ou reverter os efeitos tóxicos do mercúrio (Zalups, 2000).

1.5.3 Efeito do mercúrio sobre o Sistema Cardiovascular

Durante décadas o mercúrio teve seus efeitos tóxicos associados principalmente aos sistemas nervoso central e renal. No entanto, após Salonen *et al.* (1995) demonstrarem dados epidemiológicos que associavam exposição ao mercúrio com aumento da progressão da aterosclerose e maior risco para

desenvolvimento de doença cardiovascular maior importância passou a ser dada aos efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular.

O trabalho de Salonen *et al.* (1995) foi o que promoveu maior impacto na comunidade acadêmica, no entanto, um dos primeiros estudos a associar exposição ao mercúrio a alterações cardiovasculares foi realizado na década de 70 por Wojciechowski *et al.* (1975) que observaram que coelhos evoluíam com bradicardia, trombose em artérias de pequeno e médio calibre, necrose nos músculos papilares e no endotélio perivalvular, além de apresentar proliferação endotelial, processo inflamatório e fibrose na aorta ascendente após inalar vapor de mercúrio. Em estudos posteriores foi observado que corações de ratos quando expostos agudamente a altas concentrações de HgCl_2 apresentavam arritmias, alteração na condução átrio-ventricular, redução da pressão sistólica e do desenvolvimento de força (Massaroni *et al.*, 1992; Vassallo *et al.*, 1999). No entanto, quando eram expostos a baixas concentrações apresentavam aumento da pressão de perfusão coronariana (da Cunha *et al.*, 2000) e redução da força dos músculos papilares. Além disso, foi observado que a exposição aguda a baixas doses de HgCl_2 promove vasoconstrição em artérias caudais de ratos (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008a).

Wakita (1987) e Carmignani *et al.* (1992) já haviam observado que a exposição crônica ao mercúrio aumentava a resistência vascular e provocava hipertensão arterial e Rossoni *et al.* (1999) notaram que a exposição aguda a altas doses de HgCl_2 promovia aumento da resistência vascular pulmonar e redução da pressão arterial de ratos. Já Machado *et al.* (2007) verificaram que a exposição aguda a doses mais baixas de HgCl_2 provocava aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca de ratos. Os resultados destes estudos associados a trabalhos como o desenvolvido por Golpon *et al.* (2003) que observaram que o mercúrio promove vasodilatação nas artérias aorta e pulmonar chamam a atenção para o fato de que os efeitos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular não são totalmente conhecidos e torna factível a hipótese de que estes efeitos também dependem da dose e do tempo de exposição.

Em 1995 Salonen *et al.* acompanharam durante aproximadamente seis anos pacientes do sexo masculino, de 42 e 60 anos de idade, que apresentavam concentração média de mercúrio nos cabelos de $1,9 \mu\text{g/g}$ e notaram maior risco de desenvolvimento de doença cardiovascular e de morte por qualquer causa nos

indivíduos que apresentavam concentração de mercúrio nos cabelos maior que 2,0 µg/g. Este mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu outro estudo onde também observaram que maiores níveis de mercúrio nos cabelos estavam associados ao maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Além disso, observaram pela primeira vez que altas concentrações de mercúrio atenuam os efeitos benéficos dos ácidos graxos derivados dos peixes que são reconhecidos como importantes protetores cardiovasculares (Rissanen *et al.*, 2000). Estes achados foram corroborados por Guallar *et al.* (2002) que notaram associação entre maior concentração de mercúrio nas unhas com a redução dos efeitos benéficos do consumo de peixe e maior risco de desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio.

Virtanen *et al.* (2005) acompanharam pacientes por aproximadamente 14 anos e observaram associação entre altas concentrações de mercúrio nos cabelos com maior risco de desenvolvimento de evento cardiovascular, de morte por doença cardiovascular e e por outras causas. Outro dado importante deste estudo revela que para cada micrograma de mercúrio nos cabelos o risco de evento coronário agudo aumentava em 11% enquanto o risco de morte por doença cardiovascular e de morte por doença coronariana aumentava em 10% e 13% respectivamente. Além disso, dosaram os ácidos graxos DHA (ácido docosahexaenóico) e DPA (ácido docosapentaenóico), derivados dos peixes, e observaram associação entre os níveis de mercúrio no cabelo e os níveis de DHA e DPA, corroborando a hipótese de que consumo de peixe contaminado era a principal forma de exposição ao mercúrio.

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é um importante fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares como o acidente vascular encefálico e a doença arterial coronária (Colins *et al.*, 1990) e a hipótese de que a exposição ocupacional ao mercúrio também esteja associada a hipertensão e outras doenças cardiovasculares foi reforçada após trabalhos de Boffeta *et al.* (2001) que observaram que trabalhadores de minas de mercúrio na Europa apresentavam maior incidência de HAS (46%) e doenças cardiovasculares (36%), e Sorensen *et al.* (1999) que notaram relação entre exposição ao mercúrio e hipertensão arterial em crianças da ilhas Faroe, e observaram que o aumento da concentração de mercúrio no cordão umbilical de 1 para 10 g/L provocava incremento médio de 14% nas pressões sistólica e diastólica.

Outras alterações cardiovasculares em adultos e crianças foram associadas a exposição ao mercúrio pois adultos expostos ao mercúrio no período pré-natal

apresentavam redução da pressão de pulso e aumento da frequência cardíaca de repouso sugerindo que esta forma de exposição parece estar associada a disfunção do sistema nervoso autonômico (Oka *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram descritos por Grandjean *et al.* (2004) que ao avaliar crianças de 7 e 14 anos expostas ao mercúrio no período pré-natal, notaram redução na modulação simpática e parassimpática da frequência cardíaca.

No entanto, os mecanismos pelos quais o mercúrio exerce efeito tóxico sobre o sistema cardiovascular ainda não foram totalmente esclarecidos, mas acredita-se que o aumento do estresse oxidativo seja um destes mecanismos (Virtanen *et al.*, 2006), pois foi observado que a exposição ao mercúrio aumenta a produção de radicais livres em modelos animais (Jansson *et al.*, 1993; Magos, 1997; Clarkson, 1997) e isto pode ocorrer devido à participação do mercúrio na reação de Fenton promovendo a formação de radicais livres (Valko *et al.*, 2006) e também por promover a redução da atividade de enzimas anti-oxidantes como a glutathione peroxidase. A redução da atividade da glutathione peroxidase está associada ao fato de que o mercúrio se liga ao selênio reduzindo sua biodisponibilidade e consequentemente reduz a atividade de enzimas como a glutathione peroxidase que possuem o selênio em seu sítio ativo (Ganther *et al.*, 1972; Cuvín-Aralar *et al.*, 1991; Rayman, 2000; Raymond & Ralston, 2004). Apesar de existirem quatro tipos de glutathione contendo selênio em seu sítio ativo, somente a glutathione peroxidase 1 reduz o peróxido de hidrogênio em água (Flohe, 1988; Arthur, 2000). Além disso, uma das formas de eliminação do mercúrio se dá por meio da ligação com a glutathione formando o complexo mercúrio-glutathione (Zalups, 2000), isso faz com que ocorra diminuição dos níveis de glutathione peroxidase que é um dos principais anti-oxidantes (Raes *et al.*, 1987; Ursini *et al.*, 1995). A alta afinidade do mercúrio pelos grupos tiol pode levar a redução da ativação não só da glutathione peroxidase, mas também de outras enzimas antioxidantes como a catalase e a superóxido dismutase e a redução da atividade antioxidante favorece a ocorrência da peroxidação lipídica e aumenta o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (Naganuma *et al.*, 1980; Rungby & Ernst, 1992).

Salonen *et al.* (1995) detectaram que os níveis de mercúrio são preditores dos níveis de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL). Partículas oxidadas de LDL frequentemente são encontradas em lesões ateroscleróticas e estão associadas ao desenvolvimento da doença aterosclerótica (Hulthe *et al.*, 2002; Metso *et al.*,

2004; Wallenfeldt *et al.*, 2004), insuficiência coronariana aguda (Ehara *et al.*, 2001) e é um importante marcador para insuficiência coronariana (Toshima *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004). Como existem fortes evidências da associação entre níveis de LDL oxidado e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Chisolm & Steinberg, 2000; Nishi *et al.*, 2002) é plausível acreditar que através do aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de LDL oxidado o mercúrio facilita o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Outro mecanismo pelo qual o mercúrio exerce efeito tóxico sobre o sistema cardiovascular se dá pela inativação da “paraoxonase” (Gonzalvo *et al.*, 1997), que é uma enzima de alta densidade que retarda a oxidação do LDL e tem importante ação anti-aterosclerótica (Mackness & Mackness, 2004). Também já foi observado que o mercúrio prejudica a ativação e atenua os efeitos do NFkB, possivelmente por sua ligação com o grupo sulfidril do NFkB (Shumilla *et al.*, 1998; Dieguez-Acuña *et al.*, 2001). Como o NFkB é o principal fator de transcrição da forma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) (Xie *et al.*, 1994) e como esta é uma das responsáveis pela produção de óxido nítrico este pode ser um dos mecanismos pelos quais a exposição ao mercúrio pode afetar o sistema cardiovascular.

As evidências da existência de associação entre exposição ao mercúrio e maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares não são refutadas nem mesmo por autores como Hallgren *et al.* (2001) e Yoshizawa *et al.* (2002) que desenvolveram estudos onde não foi observada esta associação. No entanto, apesar de vários estudos apontarem a exposição ao mercúrio como fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular os mecanismos pelos quais o mercúrio promove dano cardiovascular precisam ser melhor esclarecidos.

1.5.4 Outros sistemas

Grande parte da literatura sobre o mercúrio esta relacionada aos efeitos tóxicos sobre os sistemas nervoso central, renal e cardiovascular, mas o mercúrio também exerce efeito sobre outros sistemas, dentre os quais podemos destacam-se os sistemas imunológico, respiratório, hepático e reprodutor.

Animais expostos cronicamente ao mercúrio apresentam maior possibilidade de desenvolver doenças auto-imunes e imunossupressoras (Kazantzis, 2002; Hansson & Abedi-Valugardi, 2004; Abedi-Valugardi, 2008) que parecem estar associadas ao aumento na produção de anticorpos, elevação das imunoglobulinas

séricas, proliferação de linfócitos e ativação das células B e T (Sapin *et al.*, 1977; Mathieson, 1992; Bagentose *et al.*, 1998; Zheng & Monestier, 2003). O sistema respiratório também sofre ação do mercúrio. Foi observado que indivíduos que inalam altas doses de mercúrio frequentemente evoluem com insuficiência respiratória e apresentam lesões pulmonares semelhantes às encontradas em pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda (Rowens *et al.*, 1991).

O sistema hepático, responsável pelo metabolismo de várias substâncias endógenas e exógenas, também sofre os efeitos tóxicos do mercúrio que reduz a atividade de algumas enzimas hepáticas além de reduzir os níveis de citocromo P-450 (Alvares *et al.*, 1972). Mais recentemente foi observada associação entre exposição ao metilmercúrio e anormalidade no sêmen de homens pouco férteis (Choy *et al.*, 2002) e também relação inversa entre os níveis sanguíneos de mercúrio e a qualidade do sêmen (Meeker *et al.*, 2008) demonstrando que o mercúrio também possui efeito tóxico sobre o sistema reprodutor dos homens.

1.6 Tônus Vascular

A contração do coração gera o fluxo sanguíneo através do sistema arterial que segue das artérias de grande calibre e baixa resistência para arteríolas de pequeno calibre e alta resistência. A elasticidade da parede arterial e o diâmetro dos vasos influenciam de forma importante no controle do fluxo sanguíneo. Nas arteríolas o fluxo sanguíneo é dependente da contração do músculo liso vascular / tônus vascular onde a elevação do tônus reduz o diâmetro do vaso e conseqüentemente aumenta a resistência vascular e dessa forma influencia diretamente no fluxo sanguíneo (Bevan & Laher, 1991).

Quando o tônus vascular não está adequado ocorrem alterações circulatórias que podem culminar com a incapacidade de se manter o fluxo sanguíneo necessário para suprir as necessidades metabólicas. Sendo assim, o controle do tônus vascular é muito importante e sabe-se que ele sofre influência da inervação e de substâncias vasoativas circulantes e locais (Mellander, 1989; Feigl, 1989).

Em modelos animais a exposição ao HgCl₂ alterou o tônus vascular (vasoconstrição ou vasodilatação) e alterações no endotélio vascular, no sistema renina-angiotensina, na produção de espécies reativas de oxigênio e de prostanoídes da via da ciclooxigenase parecem ser os mecanismos envolvidos.

Portanto, para o melhor entendimento dos efeitos e riscos da exposição ao mercúrio sobre o sistema cardiovascular é essencial o conhecimento do endotélio vascular e das vias que participam do controle do tono vascular (da Cunha *et al.*, 2000; Golpon *et al.*, 2003; Wiggers *et al.*, 2008a).

1.6.1 Endotélio Vascular

O endotélio vascular é formado por uma camada de células localizada na interface entre o sangue e o músculo liso vascular. Inicialmente a importância do endotélio estava relacionada exclusivamente a seus efeitos sobre o tono vascular mas atualmente é reconhecido que o endotélio atua como barreira permeável regulando o fluxo de nutrientes e substâncias e também atua na manutenção do equilíbrio entre trombose e fibrinólise através da liberação de substâncias como a prostaciclina, na inibição da proliferação de células do músculo liso vascular através da liberação de óxido nítrico e participa de respostas do sistema imunológico (Simionescu *et al.*, 1975; Moncada *et al.*, 1977; Andrews *et al.*, 2001).

Por regular o diâmetro e o tono do vaso através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras participa do controle do aporte sanguíneo, do consumo de oxigênio e também do remodelamento vascular em diferentes órgãos e sistemas (Furchgott & Vanhoute, 1989; Schechter & Gladwin, 2003; Deanfield *et al.*, 2007). As principais substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio são: óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina, acetilcolina e a bradicinina. Enquanto a endotelina, os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase e a angiotensina II são as principais substâncias vasoconstritoras (Maturana *et al.*, 2007).

Alterações na função endotelial (disfunção endotelial) aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e estão associadas a doenças como a Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial, Insuficiência Cardíaca Congestiva, Aterosclerose e Hipertensão Pulmonar (Cannon III, 1998; Anderson, 1999; McIntyre *et al.*, 1999; Triggle *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2004). O termo disfunção endotelial é utilizado quando há prejuízo na resposta vasodilatadora derivada do endotélio devido à redução na produção e/ou biodisponibilidade das substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio, em especial, redução dos níveis ou da biodisponibilidade do NO (Maturana *et al.*, 2007).

1.6.1.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) foi identificado pela primeira vez por Palmer *et al.* (1987) e em 1992 foi considerada a “molécula do ano” pela revista Science. A importância da descoberta do NO e de sua ação sobre o sistema cardiovascular fez com que os pesquisadores envolvidos na descoberta recebessem o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia.

A geração do NO dá-se a partir da L-arginina pela ação de três diferentes isoformas da sintase do óxido nítrico: sintase do NO endotelial (eNOS), sintase do NO neuronal (nNOS) que são constitutivas e a sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) que quando estimulada é expressa em vários tipos de células (Bredt *et al.*, 1991; Lamas *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992). Para gerar o NO é necessário a presença de L-arginina, oxigênio (O₂), NADPH (adenina dinucleotídeo fosfato) e tetraidrobiopterina (BH₄) (Mayer & Hemmens, 1997). Depois de formado o NO difunde-se para as células do músculo liso vascular e ativa a guanilato ciclase produzindo aumento da concentração de GMPc e ativação de quinases dependentes de GMP que reduzem a concentração de cálcio intracelular e produzem vasodilatação (Moncada *et al.*, 1991). A produção do NO via ativação da eNOS pode ser estimulada pelo estresse de cisalhamento e também pela ação de moléculas de sinalização como bradicinina, adenosina, serotonina e fator de crescimento vascular endotelial (Corson *et al.*, 1996; Govers & Rabelink, 2001; Forstermann & Munzel, 2006). Os efeitos mediados pelo NO dependem da expressão da NOS, da biodisponibilidade de fatores que regulam a atividade da NOS e das espécies reativas do oxigênio (Chatterjee & Catravas, 2008).

A redução na produção ou na biodisponibilidade de NO pode ser um dos mecanismos que contribui para o aumento da resistência vascular periférica e o desenvolvimento da Hipertensão em diferentes modelos experimentais e também em humanos (McIntyre *et al.*, 1999). Em pacientes portadores de hipertensão renovascular foi observado que o aumento do estresse oxidativo parece ser responsável pela disfunção endotelial por reduzir a liberação de NO (Higashi *et al.*, 2002).

O equilíbrio entre os níveis de ânion superóxido e a liberação de NO é essencial para manter a função endotelial normal (Fraga *et al.*, 1990; Nakae *et al.*, 1997). No entanto, um dos principais mecanismos para a redução da biodisponibilidade de NO é a interação deste com o ânion superóxido, pois quando

os níveis de ânion superóxido estão elevados ocorre competição do NO com a superóxido dismutase (SOD) pelo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e como a reação do NO com o $O_2^{\bullet-}$ é aproximadamente seis vezes mais rápida que a reação deste com a SOD, o NO torna-se um “scavenger” de ânion superóxido muito mais potente que a SOD e isto leva a redução da biodisponibilidade do NO e a geração do peróxido nitrito ($ONOO^-$) que é um potente agente oxidante (Rubany & Vanhoute, 1986; Koppenol *et al.*, 1992; Beckman & Koppenol, 1996).

O aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ associado à redução da capacidade anti-oxidante e a disfunção endotelial também é observado em condições de hiperglicemia e Diabetes. Em modelos experimentais de Diabetes a disfunção endotelial é revertida por “scavenger” de $O_2^{\bullet-}$ e este parece ser mais um modelo experimental onde a disfunção endotelial ocorre por redução da biodisponibilidade do NO provocada pelo ânion superóxido (Rosen *et al.*, 1995; Ceriello *et al.*, 1996).

Resultados semelhantes têm sido observados em estudos *in vitro* e *in vivo* com diferentes tipos de células e leitos vasculares onde a exposição ao mercúrio promove aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial, disfunção esta possivelmente promovida pela redução da biodisponibilidade do NO devido à ação das espécies reativas do oxigênio (Wolf & Baynes, 2007; Wiggers *et al.*, 2008a).

1.6.1.2 Via da Ciclooxygenase (COX)

Os prostanóides derivados da via da ciclooxygenase atuam sobre o leito vascular promovendo tanto a vasoconstrição como a vasodilatação e, por isso, estão diretamente relacionados ao controle do tono e da reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas. A produção destes prostanóides depende da disponibilidade de ácido araquidônico e da atividade das ciclooxygenases e das sintases das prostaglandinas (Davidge, 2001; Adeagbo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005, 2007).

Existem duas isoformas da ciclooxygenase, denominadas ciclooxygenase-1 (COX -1) e 2 (COX-2) que realizam a síntese das prostaglandinas (PG) e do tromboxano A_2 (TXA_2). A isoforma constitutiva, COX-1, é expressa em muitos tecidos e sintetiza pequenas quantidades de PGs e tem como principal função a manutenção das funções fisiológicas (Smith *et al.*, 1996). A COX-2 é a isoforma induzida por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores mitogênicos e

endotoxinas e tem a expressão relacionada principalmente com processos inflamatórios (Wu, 1995, Antman *et al.*, 2005). As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em Prostaglandina H₂ e esta por ação de sintases específicas é convertida em prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandina D₂ (PGD₂) ou TXA₂ (Mardini & FitzGerald, 2001).

Os prostanóides são liberados após serem sintetizados e vão se unir a receptores acoplados a proteínas G. Existem oito diferentes tipos de receptores para os prostanóides da COX, assim denominados: EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, IP, FP, DP e TP. A PGE₂ une-se aos receptores EP enquanto a PGI₂ une-se ao IP, a PGF_{2α} une-se ao FP, a PGD₂ une-se ao DP e o TXA₂ une-se ao receptor TP. Após a união com os respectivos receptores os prostanóides vão exercer seus efeitos sobre o leito vascular. Os receptores EP₂, EP₄, IP e DP quando ativados pelos prostanóides estimulam a adenilato ciclase, promovem aumento do AMPc e relaxamento do músculo liso vascular. Os receptores EP₁, EP₃, FP e TP quando ativados promovem a contração do músculo liso vascular por distintos mecanismos. Os receptores EP₁, FP e TP promovem vasoconstricção pelo aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular, enquanto os receptores EP₃ inibem a adenilato ciclase, reduzem os níveis de AMPc e promovem a vasoconstricção (Funk, 2001; Wright *et al.*, 2001). Apesar da especificidade da maioria dos receptores dos prostanóides derivados da via da COX, o receptor TP (do TXA₂) também pode ser estimulado pelos prostanóides PGE₂, PGI₂ e PGF_{2α} (Williams *et al.*, 1994).

Além da participação da COX na manutenção de condições fisiológicas, atualmente é bem conhecida a implicação dos prostanóides derivados desta via no processo patológico de várias doenças que cursam com processos inflamatórios e também em enfermidades cardiovasculares e renais (Vane *et al.*, 1994; Schonbeck *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005). Em modelos experimentais de hipertensão foi notada maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular a fenilefrina (Alvarez *et al.*, 2005).

A exposição aguda ao mercúrio ativa a enzima conversora da angiotensina (ECA) (Wiggers *et al.*, 2008a) e foi recentemente demonstrado que em ratos hipertensos a angiotensina II, via ativação de receptores AT₁, promove aumento da participação de mediadores contráteis derivados da COX-2 na resposta vascular a fenilefrina (Alvarez *et al.*, 2007). Além disso, foi notado que a exposição ao mercúrio

promoveu vasoconstrição e aumento da resposta vasoconstritora a fenilefrina na artéria caudal de ratos, sendo estas alterações associadas aos prostanóides contráteis derivados da via da COX e a maior produção de radicais livres (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008a). No entanto, o efeito das diferentes formas de mercúrio sobre a produção dos prostanóides derivados da via da COX ainda é muito discutido, pois o mercúrio tem apresentado efeitos distintos em diferentes tipos celulares. Na medula renal o metilmercúrio provocou redução de PGE₂ e PGE₂α (Fujimoto *et al.*, 1986), enquanto nos glomérulos e nas células glomerulares o HgCl₂ aumenta a produção de PGE₂ (Sraer *et al.*, 1982). Além disso, o efeito citotóxico do metilmercúrio nas células do endotélio vascular são mediadas pela ativação da fosfolipase A₂ (Mazerik *et al.*, 2007).

1.6.1.3 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina desempenha papel vital no controle da função dos sistemas cardiovascular e renal, pois a angiotensina II, principal substância efetora deste sistema, participa do controle do tono vascular e na manutenção da pressão arterial em níveis adequados. No entanto, o aumento do estímulo e dos níveis circulantes de angiotensina II cronicamente pode causar hiperplasia e hipertrofia do músculo liso vascular e levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais (Geisterfer *et al.*, 1988; Metha & Griendling, 2007).

O substrato do sistema renina-angiotensina é uma α-glicoproteína chamada angiotensinogênio que é liberada pelo fígado na circulação e por ação da renina, secretada pelas células justaglomerulares dos rins, é clivado em um decapeptídeo chamado angiotensina I. Este decapeptídeo por sua vez sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), que é expressa principalmente nas células endoteliais do pulmão, e é transformado em um octapeptídeo chamado angiotensina II. A angiotensina II atua diretamente sobre receptores específicos localizados nas células do músculo liso vascular ou atua através da liberação de aldosterona pela estimulação da adrenal (Quinn & Williams, 1988; Hackenthal, *et al.*, 1990; Deschepper, 1994; Hall, 2003; Persson *et al.*, 2004).

Foi identificada posteriormente outra enzima participante deste sistema, uma carboxipeptidase, denominada enzima conversora da angiotensina II (ECA II) que cliva tanto a angiotensina I como a angiotensina II em um metabólito chamado angiotensina 1-7 que tem propriedades vasodilatadoras. Tanto a ECA I como a ECA

II são importantes no controle dos níveis de angiotensina II (Crackower, *et al.*, 2002; Danilczyk & Penninger, 2006). Porém outras peptidases também podem degradar a angiotensina II em agiontensina III e angiotensina 3-8 (Carey & Siragy, 2003).

Os efeitos mais conhecidos da angiotensina II são mediados principalmente pelos receptores da angiotensina tipo 1 (AT₁) que são amplamente distribuídos por todos os órgãos. No entanto, os receptores da angiotensina tipo 2 (AT₂) quando estimulados antagonizam os efeitos dos receptores AT₁ e exercem efeito anti-proliferativo e anti-apoptótico. Os receptores AT₂ são importantes na regulação do crescimento, na diferenciação e na regeneração do tecido nervoso, mas após o nascimento ocorre redução da sua expressão, expressão esta que pode ser induzida em algumas condições patológicas (Griedling, *et al.*, 1996; Steckelings *et al.*, 2005).

A união da angiotensina II ao receptor AT₁ ativa vias mediadas por proteínas G, tirosinas-quinases e por receptores não-tirosina-quinases. A angiotensina II também exerce efeito sobre leito vascular através da geração de espécies reativas de oxigênio por meio da ativação da NADPHoxidase. Além disso, ativa a PKC e a MAPsK que estão implicadas na hipertrofia e no crescimento celular (Suzuki *et al.*, 2005).

A via mediada pela proteína G ativa as fosfolipases C (PLC), A₂ (PLA₂), D (PLD) e as lipooxigenases. A ativação da PLC produz inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ após se ligar ao receptor no retículo sarcoplasmático aumenta o influxo de cálcio para o citoplasma onde este se liga a calmodulina ativando a miosina quinase de cadeia leve que fosforila a miosina de cadeia leve e aumenta a interação entre actina e miosina causando a contração do músculo liso vascular. Já o DAG ativa a PKC que fosforila a bomba Na⁺/K⁺ que aumenta o pH durante a contração do músculo liso vascular (Vallega *et al.*, 1988; Ushio-Fukai *et al.*, 1999).

A ativação da PLA₂ leva a produção do ácido araquidônico e dos prostanóides derivados da via da COX que participam do controle do tono vascular por meio de estímulos vasodilatadores (PGI₂ e PGE₂) e vasoconstritores (TXA₂). A PLD quando ativada provoca a hidrólise da fosfatidilcolina em colina e ácido fosfatídico que é rapidamente convertido em DAG que aumenta a ativação da PKC e sustenta a contração do músculo liso por mais tempo. A angiotensina II também ativa a via das lipooxigenases onde media a formação de leucotrienos que são

vasoconstritores associados a doenças inflamatórias e a hipertensão arterial (Touyz & Schiffrin, 2000; Sarkis *et al.*, 2004).

A angiotensina II além de alterar a reatividade vascular exerce importante ação pró-inflamatória na parede vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (Schiffrin & Touyz, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Pauletto & Rattazzi, 2006) que participam das respostas inflamatórias presentes nas doenças vasculares. A angiotensina II também estimula a liberação de prostaglandinas em células do músculo liso, e também em outros tipos celulares, através da ativação da fosfolipase A₂ (Freeman *et al.*, 1998). Além disso, a angiotensina II regula a produção de prostanóides e a expressão da COX-2 em células do músculo liso vascular (Ohnaka *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002, Alvarez *et al.*, 2007) e em fibroblastos adventiciais através da ativação dos receptores AT₁ (Beltrán *et al.*, 2009). Devido a isto alterações no sistema renina-angiotensina estão associados ao desenvolvimento de doenças como aterosclerose, hipertensão arterial e insuficiência renal e cardíaca (Rajagopalan *et al.*, 1996; Griendling *et al.*, 2000; Ohtsu *et al.*, 2005).

A possibilidade da exposição ao mercúrio promover alterações no sistema renina-angiotensina tem sido corroborada por experimentos *in vivo* que revelam que a exposição ao mercúrio promove aumento dos níveis plasmáticos de renina (Bidani *et al.*, 1980), e experimentos *in vitro* onde foi observado que o mercúrio além de promover aumento da atividade da enzima conversora da angiotensina (Wiggers *et al.*, 2008a) exerce efeito direto sobre as células justaglomerulares estimulando a liberação de renina (Kozma *et al.*, 1996).

1.6.1.4 Espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo

A mitocôndria além de ser fonte geradora de energia (ATP) é também a principal geradora de espécies reativas de oxigênio (EROs) em condições fisiológicas e patológicas (Lee & Wei, 2007). Outras importantes fontes geradoras de EROs são as xantina oxidases, mieloperoxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases, NOS e as enzimas da família das NADPHoxidases (Mueller *et al.*, 2005; Bedard & Krause, 2007; Koh *et al.*, 2009).

Todos os tipos de células vasculares podem produzir EROs que são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio, altamente reativas e que participam da ativação e inativação de muitas vias de sinalização. Em condições

normais, estas espécies, são encontradas em baixos níveis no interior da célula e são constantemente geradas e destruídas por sistemas endógenos e estímulos ambientais. O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário porque estas espécies modulam a função vascular, seja por ação direta causada pelo estresse oxidativo ou por ativar vias de sinalização intracelulares que provocam a proliferação celular, remodelamento vascular, desenvolvimento de processo inflamatório e alteração no tônus vascular (Szasz, 2007).

O $O_2^{\bullet-}$, o mais importante EROs do sistema vascular, é formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPHoxidase e xantinas oxidases. Após ser formado o ânion superóxido além de exercer seus efeitos em diferentes vasos e órgãos pode dar origem a outras EROs. O $O_2^{\bullet-}$ reage com o NO, inativa-o e dá origem ao peróxido de nitrito ($ONOO^-$) e por ação da SOD o $O_2^{\bullet-}$ é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e este pode ser convertido em água por ação da glutathione peroxidase (GPx) ou da catalase. O H_2O_2 regula vias de sinalização que levam a contração e ao crescimento do músculo liso vascular, migração e inflamação. O H_2O_2 também pode ser metabolizado pela mieloperoxidase e formar o ácido hipocloroso (HOCl) ou reagir com metais de transição e dar origem ao radical hidroxila (OH). (Griendling *et al.*, 2000; Szocs *et al.*, 2002). O $O_2^{\bullet-}$, o peróxido de nitrito e o radical hidroxila são as EROs mais instáveis e reativas enquanto o peróxido de hidrogênio é a mais estável (Droge, 2002; Taniyama & Griendling, 2003).

A NADPHoxidase, uma das principais fontes geradoras de ânion superóxido, é constituída por diferentes subunidades: gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox e rac2 (proteína G de baixo peso molecular), porém, a p22phox é a subunidade essencial para o adequado funcionamento da NADPHoxidase. Acreditava-se que estas enzimas eram expressas somente nos fagócitos, no entanto, foram descobertos homólogos da gp91phox que fazem parte da família Nox da NADPHoxidase, que é composta pela Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox 2 que são expressas em vários tecidos e estão ligadas a funções biológicas relacionadas com a defesa e o crescimento celular (Lassegue & Clempus, 2003; Geiszt, 2006; Griendling, 2006).

Outra fonte geradora de EROs é a xantina oxidase que utiliza a xantina, hipoxantina ou a NADH na geração de EROs enquanto a mieloperoxidase além de

formar EROs utiliza o NO para gerar espécies reativas de nitrogênio provocando redução da biodisponibilidade do NO e aumento do estresse oxidativo (Harrison, 2002; Gaut *et al.*, 2002). As três isoformas da NOS também podem promover a formação de $O_2^{\bullet-}$ quando estão desacopladas. Na eNOS o desacoplamento é causado pela ausência dos co-fatores L-arginina e tetrahydrobiopterina (BH_4) (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Andrews & Mayer, 1999).

Diferentes tipos de mecanismos intracelulares e extracelulares associados a atividades enzimáticas compõem o sistema antioxidante que se contrapõe a ação das EROs e do estresse oxidativo. Nos vasos as três isoformas da SOD, a catalase e a glutathione peroxidase constituem o principal sistema antioxidante. As diferentes isoformas da SOD catalizam a reação que transforma o ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 , sendo a SOD extracelular (ECSOD) a isoforma mais encontrada nos vasos. A glutathione peroxidase, que é importante em baixos níveis de estresse oxidativo, transforma o H_2O_2 em H_2O . Enquanto a catalase, importante antioxidante intracelular, é mais efetivo quando o estresse oxidativo está em altos níveis e participa da reação que transforma o H_2O_2 em H_2O e O_2 . (Sindhu *et al.*, 2005; Cai, 2005; Gongora *et al.*, 2006).

Situações onde ocorre aumento da produção de EROs, redução da atividade do sistema antioxidante e aumento do estresse oxidativo estão associadas ao desenvolvimento de enfermidades como o câncer, artrites, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Griendling & Fitzgerald, 2003; Valko *et al.*, 2006).

A capacidade de o mercúrio aumentar o estresse oxidativo parece estar relacionada à sua participação na reação de Fenton causando aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, este metal possui grande afinidade com os grupos sulfidril (-SH) e pode causar a inativação de antioxidantes que possuem composto tiol. O mercúrio também pode unir-se ao selênio provocando a redução da atividade de enzimas antioxidantes, pois impede que o selênio sirva de co-fator para enzimas como a glutathione peroxidase (Naganuma *et al.*, 1980; Cuvin-Aralar & Furness, 1991, Su *et al.*, 2008). Já foi notado que a exposição ao metilmercúrio promove aumento do estresse oxidativo no cérebro, cerebelo, rins e fígado de camundongos (Huang *et al.*, 2008; de Freitas *et al.*, 2009) e que o $HgCl_2$ também exerce efeito nefrotóxico, em ratos, através do aumento do estresse oxidativo (Fouda, *et al.*, 2008). Também já foi observado que a exposição ao

mercúrio promove aumento da produção de EROs em diferentes tipos de células (Kishimoto *et al.*, 1995; Park & Park, 2007; Wolf & Baynes, 2007) e em vários órgãos e sistemas (Miller & Woods, 1993; Huang *et al.*, 1996; Mahboob *et al.*, 2001; Reus *et al.*, 2003; Kim & Shama, 2004; Houston, 2007).

Além de estimular a geração de espécies reativas do oxigênio o mercúrio também pode promover alterações nos sistemas antioxidantes e por meio destas alterações exerce efeito tóxico sobre diferentes sistemas podendo causar doenças neurológicas, renais, imunológicas e cardiovasculares. (Clarkson *et al.*, 2003; Virtanen *et al.*, 2005; Magos & Clarkson, 2006; Vas & Monestier, 2008).

1.6.1.5 Outros fatores

1.6.1.5.1 Endotelina

A endotelina é uma das substâncias vasoativas mais importantes no controle do tono vascular e das três isoformas conhecidas, a endotelina 1 (ET-1) é a que tem maior efeito vasoconstritor e também é a principal isoforma encontrada no endotélio e no sistema cardiovascular. Apesar de ser produzida primariamente pelo endotélio, células do músculo liso vascular, fibroblastos, cardiomiócitos, células do epitélio tubular renal, macrófagos e leucócitos também podem produzi-la (Yanagisawa *et al.*, 1988; Kohan, 1997).

A ET-1 exerce seus efeitos após unir-se a seu receptor específico e atualmente são conhecidos dois subtipos de receptores denominados: ET_A e ET_B. Nas células do músculo liso vascular são expressos os receptores ET_A, que media vasoconstrição e mitogênese, e ET_B, que media tanto a vasoconstrição como a vasodilatação. Enquanto nas células endoteliais são expressos primariamente os receptores ET_B que induzem a vasodilatação (Schiffrin, 2005). Ao unir-se ao receptor ET_A a ET-1 promove a vasoconstrição através da ativação da fosfolipase C, da proteína quinase C (PKC) e dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem que aumentam os níveis intracelulares de Ca²⁺. Enquanto a união com o receptor ET_B ativa a fosfolipase A₂ e a guanilato ciclase que estimulam a liberação do NO e da prostaglandina I₂ (PGI₂) promovendo a vasodilatação (Villar *et al.*, 2005).

Aumento da pressão arterial, redução da frequência cardíaca, do volume sistólico e do débito cardíaco e vasoconstrição em diferentes leitos vasculares são alguns dos efeitos da ET-1 observados em humanos. Por sua potente ação vasoconstritora e por seus efeitos pró-inflamatórios e pró-fibróticos acredita-se que a

ET-1 contribua para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a insuficiência coronariana, hipertensão e insuficiência cardíaca (Love *et al.*, 2000; Bohm & Pernow, 2007; Dhaun *et al.*, 2008).

1.6.1.5.2 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)

Além da via do NO e da prostaciclina existe uma outra via através da qual o endotélio promove a vasodilatação. Nesta terceira via a vasodilatação está associada à hiperpolarização das células do músculo liso vascular que ocorre devido a ativação de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} por substâncias liberadas pelo endotélio que são chamadas de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF). São conhecidos dois mecanismos pelos quais se explica como a ativação dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} hiperpolariza células do músculo liso vascular, são eles: a) transmissão via *gap junctions*, da hiperpolarização das células endoteliais para as células do músculo liso; b) ativação de condutores de potássio ou da bomba Na^+K^+ -ATPase pelo acúmulo de K^+ no espaço extra-celular. (Félétou & Vanhoutte, 2008).

Apesar de só serem considerados EDHF as substâncias que promovam a hiperpolarização das células do músculo liso vascular via hiperpolarização das células endoteliais ou mediante ativação dos $IK(Ca)$ e / ou $SK(Ca)$, encontrados principalmente no endotélio vascular. Substâncias como os íons K^+ , H_2O_2 e os ácidos epoxieicosatrienoicos e dihidroxieicosatrienoicos (derivados do ácido araquidônico) que promovem a hiperpolarização das células do músculo liso vascular, mas que ainda não tem confirmada ação mediante estes mecanismos, continuam sendo chamados de EDHF (Bryan *et al.*, 2005; Félétou & Vanhoutte, 2008).

1.7 Justificativa

A exposição humana ao mercúrio ocorre principalmente através do consumo de peixe contaminado, uso de restauração dentária com amálgama de mercúrio, exposição ocupacional e também por viver em áreas contaminadas. Nestas situações o indivíduo frequentemente é exposto cronicamente a baixas concentrações de mercúrio. Nos anos 60 foram desenvolvidos os primeiros estudos para investigar os efeitos tóxicos do mercúrio, e uma vez estabelecido seu grande poder tóxico passaram a ser desenvolvidos experimentos científicos para esclarecer os mecanismos através dos quais este metal age. Nestes estudos, “*in vitro*” ou “*in vivo*”, frequentemente é feita exposição a altas concentrações de mercúrio e nos poucos estudos realizados com baixas concentrações o tempo de exposição ao metal não ultrapassa há uma hora.

Nestes estudos, não ocorre exposição semelhante à exposição humana a este metal e considerando que o efeito tóxico do mercúrio parece estar diretamente relacionado ao tempo e ao nível de exposição, torna-se necessário e essencial o desenvolvimento de um modelo experimental onde o animal fosse exposto cronicamente, de maneira controlada, a baixas doses de mercúrio. Além disso, o controle do nível sanguíneo de mercúrio é necessário para confirmar que este animal esteve exposto a níveis semelhantes ao de humanos. Um modelo experimental assim desenvolvido permitirá, pela primeira vez, que sejam investigados os efeitos tóxicos do mercúrio, bem como, os mecanismos pelos quais este metal exerce efeito, sobre o sistema cardiovascular em condições semelhantes às aquelas encontradas em humanos frequentemente expostos ao mercúrio.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver modelo experimental de exposição a baixas concentrações de cloreto de mercúrio (HgCl_2) e investigar as possíveis alterações promovidas, pela exposição ao HgCl_2 , na reatividade vascular da artéria aorta torácica e no comportamento da pressão arterial.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar o efeito do HgCl_2 , em concentração plasmática semelhante às encontradas em humanos expostos ao mercúrio, sobre o comportamento da pressão arterial de ratos acordados;

Avaliar se a exposição crônica ao HgCl_2 promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina da artéria aorta torácica;

Verificar se o tratamento com HgCl_2 altera a participação do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina;

Estudar a participação das espécies reativas ao oxigênio, dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase-2 e do sistema renina-angiotensina na reatividade vascular à fenilefrina da artéria aorta de ratos expostos ao HgCl_2 ;

Analisar se a exposição crônica ao HgCl_2 altera a atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina;

Avaliar se a exposição ao HgCl_2 altera a expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico, da ciclooxigenase-2, do receptor da angiotensina AT_1 e das isoformas extracelular, cobre-zinco e manganês da superóxido dismutase;

Verificar se em anéis de artéria aorta torácica as respostas vasodilatadoras dependentes e independentes do endotélio são alteradas pela exposição crônica ao HgCl_2 ;

Analisar as possíveis alterações estruturais na artéria aorta torácica promovidas pelo HgCl_2 .

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Na realização deste estudo foram utilizados ratos machos, Wistar que no início do estudo tinham três meses de idade e pesavam entre 250 – 300 g. Os animais foram cedidos pelo biotério da *Facultad de Medicina da Universidad Autónoma de Madrid*. Durante o tratamento os ratos permaneciam em gaiolas com temperatura e umidade constantes, e ciclo claro-escuro de 12:12 h. Os animais tinham livre acesso a ração e água.

3.2 Desenvolvimento do modelo experimental

3.2.1 Modelo experimental

Os ratos foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais, chamados: Controle e Mercúrio. Os animais do grupo Mercúrio receberam diariamente, durante trinta dias, injeções intramusculares (*im.*) de HgCl_2 na face interna das patas traseiras, sendo a primeira dose de 4,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e as doses subsequentes de 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$. Os animais do grupo Controle receberam diariamente, injeção *im.* nas patas traseiras, de solução salina durante os trinta dias de tratamento.

Com o objetivo de determinar se a exposição crônica ao mercúrio exerce efeito sobre o consumo diário de água e excreção urinária alguns animais foram colocados em gaiolas metabólicas, durante 24 horas, no primeiro e último dia do protocolo de tratamento, dias 0 e 30 respectivamente. Todos os animais foram submetidos a processo de adaptação a gaiola metabólica durante período de 24 horas.

Este trabalho foi desenvolvido segundo o Consenso de Uso e Proteção de Animais de Laboratório da *National Institutes of Health* (NIH Publication N° 85 - 23 revisado em 1996) e também de acordo com leis espanholas e europeias (RD 233/88 Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentação e 609/86).

3.2.2 Dosagem do cloreto de mercúrio plasmático

Os níveis de mercúrio plasmático após 30 dias de tratamento foram medidos nas amostras sanguíneas de ratos do grupo Mercúrio por

espectrofotometria por fluorescência atômica acoplada ao gerador de vapor frio (PSA Analytical, Model 1025 Millenium System) no *Centro de Espectrometría Atômica (Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Espana)*. A acurácia da análise do mercúrio foi confirmada por material de referência externo, sendo considerado aceitável quando: valor teórico de 3,8 ng/ml e valor experimental de 3,85 ng/ml. Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

3.3 Análise do comportamento da pressão arterial sistólica

Objetivando a análise do efeito da exposição crônica ao HgCl_2 sobre o comportamento dos níveis pressóricos dos animais, os valores da pressão arterial sistólica, de animais dos grupos Controle e Mercúrio, foram verificados semanalmente, de maneira indireta, pelo método de pletismografia de cauda (Letica, Digital Pressure Meter, LE 5000, Barcelona, Espanha) (Buñag, 1973).

3.4 Estudo da reatividade vascular da aorta

3.4.1 Método de estudo da reatividade vascular da aorta

Para avaliar o efeito da exposição crônica ao HgCl_2 sobre a reatividade vascular das artérias aorta, após 30 dias de tratamento os ratos dos grupos Controle e Mercúrio foram anestesiados com dióxido de carbono (CO_2) e posteriormente sacrificados por decapitação na guilhotina. As artérias aortas torácicas foram removidas e imersas em uma placa petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C , composta por (mM): NaCl 115; KCl 4,7, NaHCO_3 25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 ; CaCl_2 2,5; KH_2PO_4 1,2; glicose 11,1 e Na_2EDTA 0,01, aerada por mistura carbogênica contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2 .

Posteriormente foram removidos os tecidos conectivo e adiposo das artérias sendo, em seguida, divididas em segmentos de aproximadamente 2 mm de comprimento. A obtenção do registro de tensão isométrica foi feito de acordo com o método descrito por Nielsen & Owman (1971). Cada anel de aorta foi colocado em uma cuba que continha 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a 37°C e continuamente aeradas por carbogênio para alcançar um pH ótimo de 7,3-7,4. Dois pinos de metal foram colocados no lúmen dos anéis de aorta, um dos pinos estava fixado a parede da cuba e o outro era conectado verticalmente ao transdutor de tensão isométrica. O transdutor de força (Letica TRI 011) que registrava a tensão isométrica estava conectado a um sistema de aquisição de dados (MacLab/41

ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e este, a um computador Machintosh (SE 1/20) (Figura 1A).

3.4.2 Protocolos experimentais

3.4.2.1 Período de estabilização, resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio e teste de integridade funcional do endotélio

Após a montagem os anéis de aorta torácica foram submetidos à tensão de repouso de 1,5 g, sendo esta, reajustada a cada 15 minutos durante os 45 minutos do período de estabilização. Terminado o período de estabilização as artérias foram contraídas com KCl (75 mM) para comprovar sua integridade funcional. A contração induzida pelo KCl (75 mM) foi considerada como contração máxima, e os anéis com contração menor que um grama não eram utilizados.

A exposição ao KCl (75 mM) foi seguida pela troca da solução de Krebs-Henseleit da preparação e de outro período de estabilização com duração de 45 minutos. Após este período os anéis da aorta foram pré-contraídos com fenilefrina, até aproximadamente 50% da contração máxima produzida pelo KCl (75 mM), e a integridade do endotélio foi determinada pela capacidade da acetilcolina (10 μ M) relaxar as artérias pré-contraídas. Anéis de aorta de animais do grupo Controle que apresentaram relaxamento maior que 80% foram considerados segmentos com endotélio.

3.4.2.2 Avaliação da resposta vascular à fenilefrina

Após a realização do teste de integridade do endotélio a solução de Krebs-Henseleit da preparação era trocada e, 1 hora depois, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (1 η M a 30 μ M) (Figura 1B).

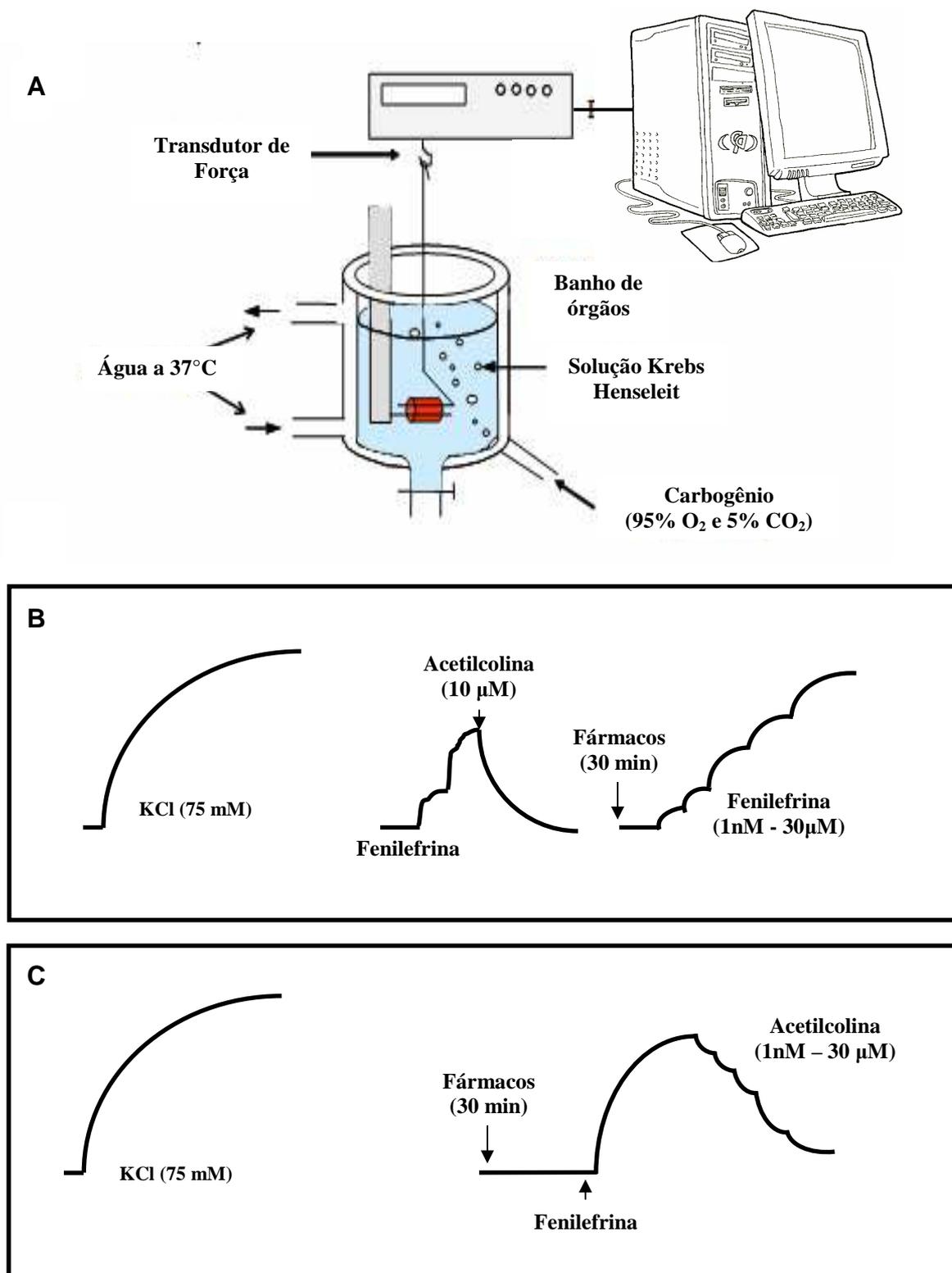


Figura 1: A) Esquema representativo do banho de órgãos onde foram realizados os experimentos de reatividade vascular em segmentos de artéria aorta torácica; B) Representação dos registros dos experimentos de reatividade vascular ao KCl (75 mM), teste de integridade do endotélio e contração a fenilefrina; C) Resposta vascular a acetilcolina (Modificado de Álvarez, 2006).

3.4.2.2.1 Análise da modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para avaliar a capacidade de o endotélio modular a resposta contrátil à fenilefrina, alguns anéis de aorta torácica antes de serem montados tiveram o endotélio removido mecanicamente, por meio do uso de uma agulha de metal limpa com etanol e solução de Krebs-Henseleit. Após montagem os anéis foram submetidos à tensão de repouso de 1,5 g, e depois de 45 minutos de estabilização foram expostos a KCl (75 mM) para avaliar a integridade do vaso. Todos os anéis que apresentaram contração inferior a um grama foram descartados.

A administração de KCl (75 mM) era seguida da troca da solução de Krebs-Henseleit e de outro período de estabilização de 45 minutos. Após este período as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (em uma concentração capaz de induzir resposta contrátil de aproximadamente 50% da contração máxima ao KCl 75 mM) e a ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina (10 μ M) induzir relaxamento maior que 10%. Após teste de integridade do endotélio a solução de Krebs-Henseleit da preparação era trocada e depois de aproximadamente uma hora, eram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina de maneira cumulativa (1 η M a 30 μ M).

3.4.2.2.2 Efeito do bloqueio da via do óxido nítrico, com L-NAME, sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para avaliar a influência do óxido nítrico sobre a resposta contrátil à fenilefrina foi utilizado o inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico (NOS) o N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

Neste protocolo, a administração de KCl (75 mM) foi seguida de 45 minutos de estabilização e, após este período foi avaliada a integridade funcional do endotélio, através da administração de acetilcolina (10 μ M), em anéis pré-contraídos (contração de aproximadamente 50% da contração máxima ao KCl (75 mM) com fenilefrina, sendo considerado íntegro o endotélio dos anéis que relaxassem mais que 90%. Uma hora após o teste de integridade do endotélio foi realizada curva concentração-resposta à fenilefrina (1 η M a 30 μ M). O L-NAME era administrado 30 minutos antes do início da curva de fenilefrina.

3.4.2.2.3 Análise da participação da via da angiotensina e das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina

Com a finalidade de investigar a participação do sistema renina-angiotensina e das espécies reativas do oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) na resposta contrátil a fenilefrina foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina na presença de Losartan (10 mM), bloqueador dos receptores angiotensinoginérgicos AT₁; Captopril (0,1 mM), inibidor da enzima conversora da angiotensina; Apocinina (0,3 mM), inibidor da NADPH oxidase; Superóxido Dismutase (SOD, 150 U/ml), “scavenger” do ânion superóxido e Catalase (1000 U/ml), “scavenger” do peróxido de hidrogênio. Todos os fármacos foram adicionados a preparação 30 minutos antes do início da curva concentração-resposta a fenilefrina.

3.4.2.2.4 Análise da participação dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina

Com o objetivo de estudar a influência dos prostanóides da via da ciclooxigenase na vasoconstrição induzida pela fenilefrina, foram utilizados os seguintes fármacos: Indometacina (1 µM), inibidor não específico da ciclooxigenase; NS 398 (1 µM), inibidor específico da ciclooxigenase-2 (COX-2); SQ 29,548 (1 µM), antagonista do receptor TP - receptor do tromboxano A₂ e da prostaglandina H₂; SC 19,220 (10 µM), antagonista do receptor EP₁; e furegrelato (10 µM) inibidor da síntese do tromboxano A₂. Estes fármacos foram adicionados à preparação 30 minutos antes do início da curva de fenilefrina.

3.4.2.3 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente e não-dependente do endotélio

3.4.2.3.1 Avaliação da resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio

Curvas concentração-resposta ao doador de óxido nítrico, DEA-NO (10 ηM - 0,1 mM), foram utilizadas para avaliar o relaxamento não-dependente do endotélio, as curvas eram iniciadas assim que a pré-contracção à fenilefrina atingisse um platô com valor correspondente a aproximadamente 50% da contracção máxima induzida pelo KCl (75 mM), a pré-contracção à fenilefrina era iniciada 45 após a exposição dos anéis ao KCl.

3.4.2.3.2 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Para avaliar a resposta vasodilatadora dependente do endotélio foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (1 η M a 30 μ M) em anéis de artéria aorta pré-contraídos com fenilefrina, até aproximadamente 50% da contração máxima produzida pelo KCl (75 mM). A pré-contração das artérias com fenilefrina era iniciada 45 minutos após o término da contração máxima ao KCl (Figura 1C).

3.4.2.3.3 Análise da participação das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta vasodilatadora à acetilcolina

Para analisar a participação das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides derivados da via da COX na resposta vascular a acetilcolina, anéis de artéria aorta de ratos dos grupos Controle e Mercúrio foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina na presença de Apocinina (0,3 mM), inibidor da NADPH oxidase; superóxido dismutase (SOD, 150 U/ml), “scavenger” do ânion superóxido; Catalase (1000 U/ml), “scavenger” do peróxido de hidrogênio e Indometacina (1 μ M), inibidor inespecífico da COX. Estes fármacos foram adicionados à preparação 30 minutos antes do início da curva concentração-resposta à acetilcolina.

3.5 Estudo da expressão protéica

3.5.1 Western Blot para detecção da eNOS, SOD e receptor AT₁

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a expressão protéica em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Foram medidas a expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), das três isoformas da superóxido dismutase (SOD), a manganês (MnSOD), a cobre zinco (CuZnSOD) e a isoforma extracelular (EC-SOD) e do receptor AT₁. A expressão protéica de todas as proteínas foi realizada em condição basal (segmentos retirados logo após o animal ser sacrificado).

3.5.1.1 Preparação do tecido e quantificação das proteínas

As amostras foram preparadas utilizando segmentos de aorta torácica de ambos os grupos. Os anéis da aorta na condição basal e estimulada eram

congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -70°C até o momento em que foram utilizados.

A homogeneização dos segmentos arteriais congelados foi realizado com homogeneizador de vidro contendo “*buffer*” aquecido composto por 10 mM de Tris (pH 7,4), 1% de dodecil sulfato sódico (SDS) e 1 mM do inibidor de proteases metavanadato sódico. Depois de homogeneizadas as amostras eram centrifugadas durante 10 minutos a 4°C e, em seguida, o sobrenadante era retirado e feita então a quantificação pelo uso do método de Lowry (1951) (Bio Rad DC Protein Assay). Posteriormente foi calculado o volume necessário para uma carga de 30 μg de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com “*buffer*” de Laemli (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 μM de ditioteitol, 0,01 M de Tris e azul de bromefol). A amostra depois de preparada era aquecida a 99°C durante 4 minutos.

3.5.1.2 Eletroforese e transferência das amostras

A eletroforese foi realizada no Mini Protean (Bio Rad Laboratórios, Madrid, Espana), o primeiro gel, chamado gel concentrador, e o segundo, chamado gel separador foram polimerizados. Posteriormente os géis foram colocados em uma cuba com “*buffer*” de eletroforese (25 mM de Tris, 0,2 M de glicina e 1% de SDS), que é um eletrólito com alto poder de tamponamento. Em seguida as amostras foram colocadas (carregadas) no gel concentrador (3% de acrilamida, 1,49% de Tris (pH = 6,8), 0,1% de SDS, 0,98% de persulfato amônico (APS) e 0,053% de Temed). Depois de carregado o gel as amostras com proteína foram submetidas à eletroforese, aplicando corrente constante de 80 mV durante aproximadamente 2 horas, isto promoveu a transferência das amostras do gel concentrador para o gel separador (4,6% de Tris – pH – 8,8, 0,1% de SDS, 3,4% de glicerol, 0,03 de APS, 0,033% de Temed e concentração de acrilamida de 7,5%).

Após o término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PDVF, Transfer Membrane, Hybond P, Amersham Life Science), previamente ativada com metanol por 20 segundos. Para a transferência o gel, a membrana, o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Módulo de Transferência, BioRad) contendo solução de transferência (Tris 25 mM; Glicina 190 mM; SDS

0.05% e Metanol 20%). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA durante aproximadamente 18 horas.

3.5.1.3 Incubação dos anticorpos

Ao fim da transferência para evitar a união não-específica com reativos não-imunológicos, as membranas foram incubadas durante aproximadamente 90 minutos, à temperatura ambiente, com solução bloqueante (leite desnatado 5%, soroalbumina bovina 5%, Tris 25 mM, NaCl 137 mM e Tween 20 0,2%). Em seguida, ainda em temperatura ambiente, as membranas eram incubadas durante 90 minutos, sob agitação com solução bloqueante e os anticorpos primários para eNOS (anticorpos primários monoclonais contra a isoforma eNOS, diluição 1:2500 - Transduction Laboratories, KY), AT₁ (anticorpos monoclonais de coelho anti-AT₁, 1:500, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA) e das isoformas da SOD, MnSOD (anticorpos policlonais de coelho anti-MnSOD, 1:20000, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA), CuZnSOD (anticorpos policlonais de coelho anti-CuZnSOD, 1:10000, Sigma Chemical, CO, St Louis, USA), EC-SOD (anticorpos policlonais de coelho anti-EC-SOD, 1:1000 Sigma Chemical, CO, St Louis, USA) e da α -actina (anticorpo monoclonal de rato anti- α -actina, 1:3000000, Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA). Para corrigir a expressão da eNOS, AT₁ e das três isoformas das SOD foi utilizada a expressão da α -actina. Depois disto, as membranas eram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T (Tris 10 mM; NaCl 100 mM e Tween 20 0.1%) durante 30 minutos, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 10 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas durante 90 minutos com o anticorpo secundário (Transduction Laboratories, KY) Imunoglobulina IgG anti-camundongo unida a peroxidase de coelho para a eNOS e α -actina nas membranas que foram incubadas com anticorpo primário para eNOS e α -actina (1:2000 Bio-Rad), Imunoglobulina IgG anti-coelho unida a peroxidase de coelho para as três isoformas da SOD e AT₁ (1:2000 Bio-Rad) nas membranas anteriormente incubadas com anticorpos primários para SOD ou AT₁.

3.5.1.4 Detecção das proteínas

As proteínas correspondentes a eNOS, receptor AT₁, α -actina e as três diferentes isoformas da SOD foram detectadas por uma reação de quimiluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, um

sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Life Science). Em seguida, as membranas eram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham Life Science), sendo as bandas impregnadas posteriormente reveladas. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isso, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram gravados por um scanner conectado a um computador. O programa FootLook 2.05 foi utilizado para analisar as bandas e a quantificação da área e da densidade das bandas foi feita por meio do programa de análise de imagens NIH Image 161.

3.6 Expressão de RNAm por PCR em tempo real (RT-PCR)

A quantificação de RNAm de COX-2 foi realizada em segmentos de artéria aorta extraídos de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

As artérias foram homogeneizadas com trizol (Invitrogen Life Technologies, Philadelphia, PA, USA), um “buffer” específico de isolamento de RNAm. As amostras foram centrifugadas a 12000 g durante 10 min a 4°C e se recolheu o sobrenadante ao qual se adicionou clorofórmio. A mistura foi novamente centrifugada a 12000 g durante 15 min a 4°C. Recolheu-se a fase aquosa e foi adicionado isopropanol para precipitar o RNAm. Depois de incubar a mistura em temperatura ambiente durante 20 minutos foi realizada nova centrifugação por 30 min a 4°C. O precipitado desta centrifugação foi lavado com etanol 75% e mantido em água bidestilada-0,1% dietilpirocarbonato (água DEPC) que inativa ribonucleases. A quantificação do RNA total foi calculada medindo-se a absorvância a 260nm. Na seqüência, 1 µg do RNA total tratado com DNAase I foi transcrito a cDNA utilizando-se um kit comercial (High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo foi realizado segundo as instruções comerciais em 20 µL de volume de reação. Esta mistura foi processada em um termociclador durante 10 minutos a 25°C e duas horas a 37°C. Os cDNA obtidos se mantiveram a -20°C. 10 ng de cDNA foram adicionados a mistura de reação de RT-PCR (Taqman Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Foram utilizados *primers* para amplificar o gen da COX-2 (Rn00568225_m1, Applied Biosystems) e *primers* para amplificar o gene da β2 microglobulina (Rn00560865_m1, Applied Biosystems) como controle interno de cada amostra. A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um sistema de detecção de seqüência ABI prism 7700 (Applied Biosystems), nas seguintes

condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 minutos durante 40 ciclos e 60°C por 1 minuto. As amostras foram feitas em duplicata.

3.7 Imunofluorescência

A expressão da COX-2 também foi determinada por imunofluorescência em cortes transversais de segmentos da aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Para isso segmentos de aorta foram fixados com paraformaldeído 4% (PFA em 0,2 M PBS, pH: 7,2-7,4) durante aproximadamente 2 horas. Após este período as artérias foram lavadas três vezes com PBS 0,1M durante 10 minutos cada lavado. Após, foi incubado com Sacarose 30% durante 1 hora. Depois disso os segmentos de aorta foram incluídos em meio de congelamento "OCT Tissue-Tek" (Sakura Finetek Europe, Holanda) e congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -70°C. Foram realizados cortes transversais de 14 µm de espessura com um criostato sobre lâminas gelatinadas. Após período de secagem a 37°C por duas horas as lâminas foram lavadas com PBS 0,1M e bloqueadas com PBS 0,1M, Tween 20 0,3% e BSA 5% durante 1 hora a 37°C para evitar uniões inespecíficas do anticorpo. Após o bloqueio as artérias foram incubadas com anticorpo policlonal anti-COX-2 (1:100, Cayman Chemicals) durante 1 hora a 37°C. Depois de três lavados de 10 minutos com PBS 0,1M, as artérias foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-coelho IgG (1:1.000) conjugado com Alexa 546 (1:500, Molecular Probes, Leiden, Holanda) durante 1 hora a 37°C. Após o período de incubação as artérias foram lavadas durante 10 minutos por 3 vezes com PBS 0,1M. Em seguida, para visualizar a presença das três camadas vasculares, os cortes foram corados com corante nuclear Hoechst 33342 (0.01 mg/ml, Sigma Chemical). Os anticorpos foram diluídos com PBS 0,1M, Tween 20 0,3% e BSA 2% e todas as incubações foram realizadas em câmara úmida.

A fluorescência foi visualizada em microscópio confocal invertido Leica TCS SP2 com lente objetivo 40x. O anticorpo conjugado com Alexa foram visualizados com $\lambda_{exc} = 546$ nm e detectados com $\lambda_{em} = 600 - 700$ nm e núcleos corados com Hoechst foram visualizados com excitação de 351 e 364 nm e detecção a 400-500 nm. A especificidade da união foi avaliada mediante a omissão do anticorpo primário e o mesmo processamento da amostra.

3.8 Medida da produção de Prostaglandina E₂ e Tromboxano A₂

A produção dos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase-2, Prostaglandina E₂ (PGE₂) e do Tromboxano A₂ (TXA₂), foi medida através da quantificação do seu metabólito estável 13,14-dihidro-15-keto PGE₂ e Tromboxano B₂ (TXB₂), respectivamente. A quantificação foi realizada por reação de imunoensaio utilizando os kits comerciais Prostaglandina E₂ EIA Kit- Monoclonal e o Tromboxano B₂ EIA Kit (Cayman Chemical Ann Arbor, MI, USA). As medidas foram realizadas em preparações com anéis de aorta em solução Krebs-Henseleit onde foram realizadas curvas concentração resposta à fenilefrina, na presença e ausência do inibidor específico da COX-2, NS 398 (1 μM). Ao final da curva de fenilefrina o sobrenadante era recolhido, congelado e mantido a -70 °C até o momento da utilização. A reação consiste na competição entre o prostanóide presente na amostra a ser analisada e o mesmo prostanóide que se encontra conjugado com uma enzima cuja concentração é conhecida. A enzima conjugada ao prostanóide reage com um dos reativos do kit comercial e forma um composto que pode ser lido em uma onda com longitude de 405 – 420 nm, sendo assim realizada a quantificação (Figura 2). Para determinar a concentração das amostras, foram extrapolados os resultados de densidade óptica na curva padrão realizada durante o experimento.

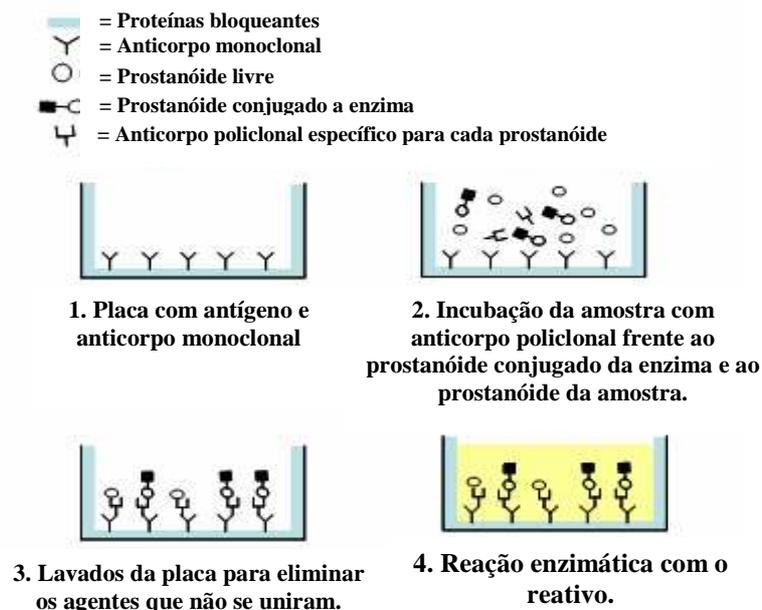


Figura 2: Esquema representativo do processo de imunoensaio (Modificado de Álvarez, 2006).

3.9 Quantificação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Para verificar a influência da exposição crônica ao $HgCl_2$ sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE). O experimento foi realizado em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

O DHE é um derivado do etídio quando entra em contato com $O_2^{\bullet-}$ oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha. Este método permite analisar a produção “*in situ*” nos segmentos arteriais. Os segmentos de aorta são retirados dos animais, em seguida, limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose a 30%. Posteriormente foram congelados em meio adequado (OCT tissue-tek, Sakura) e as amostras mantidas a $-70^\circ C$ até o dia do experimento.

Os segmentos de aorta congelados foram cortados no criostato, em anéis com $10\ \mu m$ de espessura, estes anéis foram recolhidos em lâminas gelatinadas e posteriormente foram secos na estufa a $37^\circ C$ durante 90 minutos. Depois disso, lâminas contendo as artérias foram lavadas com KH-HEPES e incubadas em uma câmara úmida, por 30 minutos, a $37^\circ C$, com solução KH-HEPES e posteriormente incubadas com solução KH-HEPES contendo DHE $2\ \mu M$ por igual período de tempo e temperatura.

A luminescência emitida foi visualizada com microscópio confocal Leica TCS SP2. O componente auto-fluorescente da elastina na parede do vaso foi visualizado com $\lambda_{exc} = 488\ nm$ e detectado com $\lambda_{em} = 490 - 535\ nm$, e o etídio, unido ao núcleo das células, foi visualizado com $\lambda_{exc} = 546\ nm$ e detectado com $\lambda_{em} = 600 - 700\ nm$.

3.10 Determinação da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA)

A atividade da ECA foi medida por método fluorimétrico, adaptado por Friedland e Silverstein (1976). As amostras de plasma em triplicado ($3\ \mu L$) foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de $37\ ^\circ C$ com $40\ \mu L$ “buffer” contendo o substrato da ECA, $5\ mM$ Hip-His-Leu (Sigma). A reação foi cessada pela adição de $190\ \mu L$ de $0,35\ N$ HCl. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente seguindo 10 minutos de incubação com $100\ \mu L$ de 2% *o-phthalaldehyde* (OPA) em metanol. As medidas de fluorescência foram realizadas a

37°C em uma placa de leitura Fluostar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany) com filtros de excitação de 350 nm e de emissão de 520 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo software Fluostar Optima. Placas negras com 96 cavidades (Biogen Científica, Madrid, Espanha) foram utilizadas. Uma curva de calibração com ECA de pulmão de coelho (Sigma) foi incluída em cada placa.

3.11 Estudo das propriedades estruturais de segmentos de aorta torácica de ratos

Para realização deste estudo artérias aorta de ratos dos grupos Controle e Mercúrio foram removidas, colocadas em uma placa Petri contendo solução de Krebs Henseleit a 4°C, e posteriormente foram retirados os tecidos conectivo e gorduroso das artérias.

3.11.1 Microscopia Confocal

A análise morfométrica dos componentes da parede vascular foi realizada através da microscopia confocal. Para isso, anéis de artéria aorta torácica previamente fixados com paraformaldeído (4%) foram incubados durante 15 minutos, protegidos da luz, com o corante nuclear Hoechst 33342 (0,01 ml/ml). As artérias foram colocadas em uma câmara confeccionada com fita adesiva para impedir a compressão e alteração de sua estrutura. Posteriormente os anéis das artérias foram imersas em meio de montagem *Fluoroguard (Antifaz Reagent – Biorad)*, cobertas com lamínula, protegidas da luz e levadas para visualização em um microscópio confocal Leica ECS SP2 acoplado a um microscópio invertido e a uma fonte de laser (Argon e Helio-Neon Laser Sources).

3.11.1.1 Análise morfométrica dos componentes celulares da parede vascular

Secções ópticas da camada adventícia ao lúmen do vaso foram capturadas com uma objetiva de imersão em óleo (NA 1,3) e aumento de 40x. No microscópio confocal foi utilizado comprimento de onda de 351 e 364 nm para excitação e detecção a 400 – 500 nm. Pelo menos duas imagens eram capturadas em cada anel de aorta analisado, sempre sob as mesmas condições de intensidade, laser, brilho e contraste.

A medida da espessura da parede da artéria foi determinada pela distância entre a primeira e a última lamela. A espessura da parede foi determinada pela média de três medidas de diferentes regiões da mesma artéria.

Para quantificação do número de núcleos celulares na camada média, uma área foi determinada aleatoriamente e foi quantificado o número de núcleos pertencentes a esta área. Isto foi realizado em três diferentes pontos da artéria, sendo o número de núcleos por área determinado pela média destas medidas. As imagens foram analisadas no *MetaMorph Image Analysis Software* (Universal Image Corporation) (Figura 3).

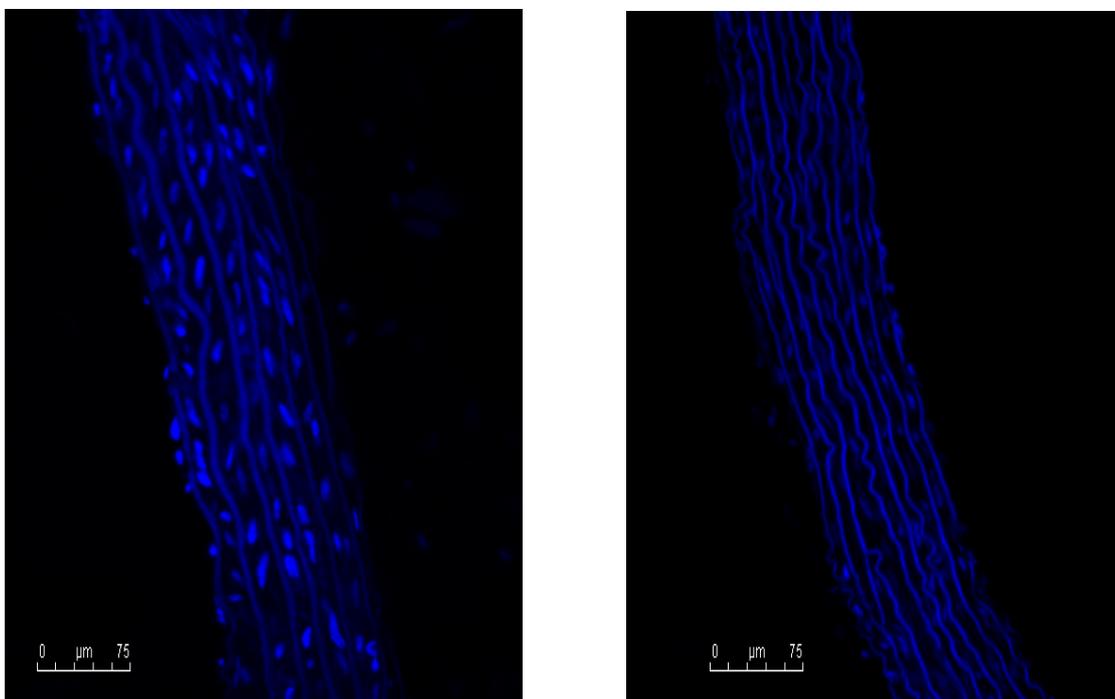


Figura 3: Secções ópticas obtidas por meio de microscopia confocal mostrando diferentes componentes da parede vascular de anéis de aorta torácica de ratos fixadas com paraformaldeído (4%) e coradas em azul com o corante Hoechst 33342. As imagens foram capturadas com objetiva de 40x.

3.12 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados foram analisados e apresentados comparando os animais dos grupos Controle e Mercúrio, os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de “n” representam o número de animais utilizados nos protocolos experimentais.

Nos anéis de aorta as respostas vasoconstritoras à fenilefrina foram normalizadas em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (75 mM), que foi considerada como 100% da resposta contrátil do músculo. As respostas de relaxamento induzidos pela acetilcolina e DEA-NO estão expressos em porcentagem de relaxamento e foram avaliadas a partir dos valores de tensão atingidos durante o platô da pré-contração com fenilefrina, sendo o platô considerado 100% da contração. Nas curvas concentração-resposta à fenilefrina e acetilcolina foram calculados os valores de PD_2 ($-\log. EC_{50}$) e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) sendo para isso realizada análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta a esses fármacos utilizando o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A).

Para comparar a magnitude dos efeitos de alguns fármacos ou da remoção do endotélio sobre a resposta contrátil à fenilefrina, nos animais dos grupos Controle e Mercúrio, alguns resultados estão expressos por meio da diferença da área abaixo da curva (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina nas situações controle (sem fármaco) e experimental (preparações com fármacos ou sem o endotélio). O cálculo da AUC foi realizada para cada curva concentração-resposta à fenilefrina e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC) da curva controle correspondente (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, U.S.A).

Os resultados da expressão protéica da eNOS, do receptor AT_1 e das três isoformas da SOD estão expressos como a relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação a α -actina.

Os dados de expressão de RNAm foram calculados pela expressão relativa do RNAm em segmentos arteriais do grupo Mercúrio em relação ao grupo Controle. Foi utilizado teste não paramétrico de Mann-Whitney para análise entre os grupos.

A liberação dos prostanóides Prostaciclina e Tromboxano A_2 foram expressos como nanograma de prostanóide / grama de tecido / ml de KH.

Os dados de medida da produção de ânion superóxido foram expressos como unidades de luz relativa (ULR) por grama de tecido seco por minuto.

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

(GraphPad Prism Software, San Diego, CA, U.S.A). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valores de $P < 0,05$.

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de teste t de “*student*” pareado e / ou não-pareado, análise de variância (ANOVA), de duas vias completamente randomizada para comparação entre os grupos e ANOVA duas vias para medidas repetidas para comparar os tratamentos dentro do mesmo grupo ou teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Quando a ANOVA apresentava significância estatística era realizado o *pos-hoc* de Bonferroni (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, U.S.A). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valores de $P < 0,05$.

3.13 Fármacos e reagentes utilizados

- 2-Hidroxiethylmercaptano (β -mercaptoetanol) (Sigma)
- 3', 3", 5', 5"-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Azul de Bromefol) (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido acético glacial (Probus)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido etilodiaminotetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico 9HEPES) (Sigma)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo de camundongo anti-Enos (Anti-Enos) (Transduction Laboratories)
- Anti-imunoglobulina G de camundongo (Transduction Laboratories)
- Apocinina (Fluka)
- Azul brilhante de Coomassie G (BioRad)
- Azul brilhante de Coomassie R (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Pancreac)
- Catalase (Sigma)
- Cloreto de cálcio (Pancreac)
- Cloreto de potássio (Pancreac)
- Cloreto de sódio (Pancreac)
- Controle positivo para eNOS (Células endoteliais) (Transduction Laboratories)
- Corante nuclear Hoescht 33342 (Hoescht)
- Cromo alumbre de potássio
- Dihidroetidio (Molecular Probes)

-
- DL-Ditioteritol (DTT) (Sigma)
 - Etanol absoluto (Probus)
 - Éter sulfúrico (Pancreac)
 - Fosfato de potássio (Pancreac)
 - Fosfato de sódio (Merck)
 - Furegrelato (Sigma)
 - Gelatina
 - Glicerol (Sigma)
 - Glicose (Merck)
 - Indometacina (Sigma)
 - Lauril sulfato sódico (SDS) (BioRad)
 - Leite desnatado (Asturiana)
 - Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
 - Losartan (Merck)
 - Metanol (Merck)
 - Meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek OCT (Bayer)
 - Meio de imersão *Fluoroguard, Glycerol: antifade* (Biorad)
 - N, N, N', N' - Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
 - N, N' - Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (BioRad)
 - NS 398(N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Calbiochem)
 - N(W)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), dicloreto (Sigma)
 - Paraformaldeído (Panreac)
 - Persulfato Amônico (APS) (Sigma)
 - Picro Sirius F3B em solução saturada de ácido pícrico (Aldrich Chemical Company)
 - Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Biorad)
 - Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham Life Science, Pharmacia biotech)
 - Sacarose (Merck)
 - Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)
 - SQ 19,548 (Ácido [1S-[1 alfa,2 beta (5Z),3 beta,4 alpha]-7-[3-[[2-[(fenilamino) carbonil]hidrazin]metil]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-5-heptenoico) (ICN Ibérica SA)
 - SC 19,220 (Cayman Chemical)

- Superóxido dismutase (Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (Biorad)
- Uréia (Sigma)

Com exceção da indometacina que foi dissolvida em solução de bicarbonato de sódio 1,5 mM, todas as outras soluções concentradas (10^{-1} e 10^{-2} M) foram dissolvidas em água deionizada e mantidas no congelador a temperatura de -20°C .

IV RESULTADOS

4.1 Níveis de mercúrio plasmático

A dosagem do nível plasmático de HgCl_2 foi realizada após 30 dias de exposição ao metal e os animais do grupo Mercúrio apresentavam níveis plasmáticos de $7,97 \pm 0,59$ ng/ml ($n = 5$).

4.2 Avaliação do comportamento da pressão arterial sistólica (PAS)

Nos animais dos grupos Controle e Mercúrio o comportamento da PAS foi avaliado semanalmente. Antes de iniciar o tratamento os dois grupos apresentavam valores pressóricos semelhantes (Controle, $n = 9$, $135,3 \pm 3,7$ mmHg vs Mercúrio, $n = 9$, $129,6 \pm 2,2$ mmHg, ANOVA (duas vias): $P > 0,05$). No decorrer do tratamento os animais de ambos os grupos apresentaram pequenas variações da pressão arterial (Figura 4), no entanto, estas não foram significantes e, ao final do tratamento apresentaram níveis pressóricos semelhantes (Controle, $n = 9$, $132,8 \pm 3,8$ mmHg vs Mercúrio, $n = 9$, $122,0 \pm 3,7$ mmHg, ANOVA (duas vias) $P > 0,05$).

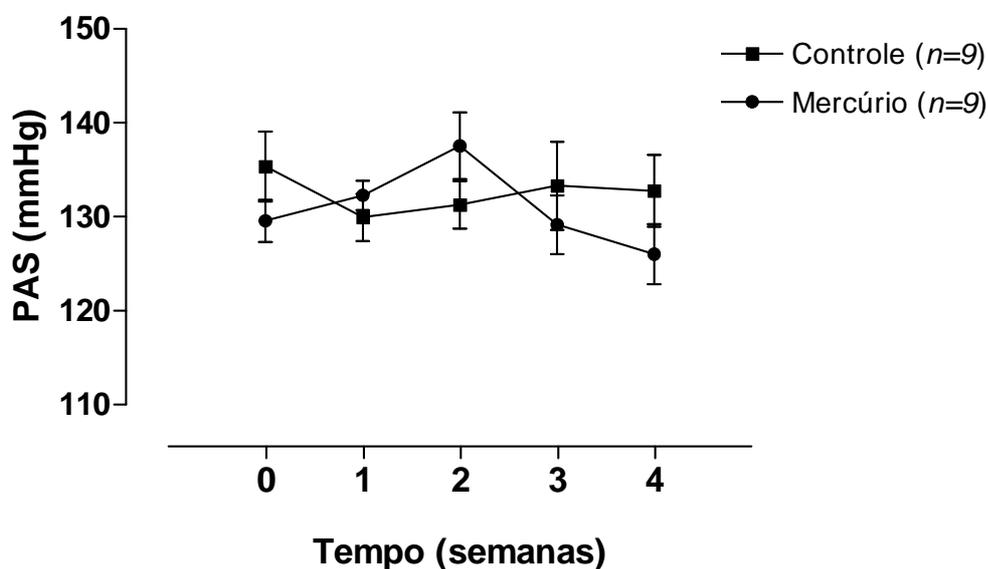


Figura 4: Comportamento dos valores da pressão arterial sistólica (PAS) medidos por meio da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Controle e Mercúrio, durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias) $P > 0,05$.

4.3 Consumo de bebida, ração e valores de massa corporal

O consumo de água e ração foi semelhante em ambos os grupos. Os animais dos grupos Controle e Mercúrio apresentaram peso semelhante no início e ao fim do tratamento sugerindo que a exposição crônica ao HgCl_2 não influencia no consumo de ração e água e no ganho de peso corpóreo (Tabela 1).

Tabela 1: Valores do consumo médio de ração (g), água (ml) e valores médios do peso corporal (g) no início e ao término da exposição crônica ao HgCl_2 .

Grupo	Peso Corporal Inicial (g)	Peso Corporal Final (g)	Consumo de Ração (g)	Consumo de Água (ml)
Controle (n=9)	325,1 ± 7.5	381,2 ± 9,8	26,1 ± 5,1	35,5 ± 2,5
Mercúrio (n=9)	327,1 ± 7.3	390,6 ± 8,0	24,1 ± 1,6	37,6 ± 2,1

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste t: $P > 0,05$

4.4 Respostas vasculares ao Cloreto de Potássio (KCl) e a fenilefrina em artéria aorta

A exposição dos segmentos arteriais ao KCl (75 mM) promoveu resposta contrátil com magnitude semelhante nos dois grupos experimentais. A retirada mecânica do endotélio não modificou de forma significativa a resposta contrátil ao KCl (Controle, $n = 43$; $2,84 \pm 0,35$ g vs Mercúrio, $n = 35$; $2,78 \pm 0,47$ g), e assim como nos segmentos com endotélio íntegro a resposta ao KCl nos anéis sem endotélio foi semelhante nos dois grupos experimentais.

A fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos Controle e Mercúrio, no entanto, a resposta máxima foi maior nos segmentos arteriais dos animais do grupo Mercúrio. A resposta a fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl (Figura 5).

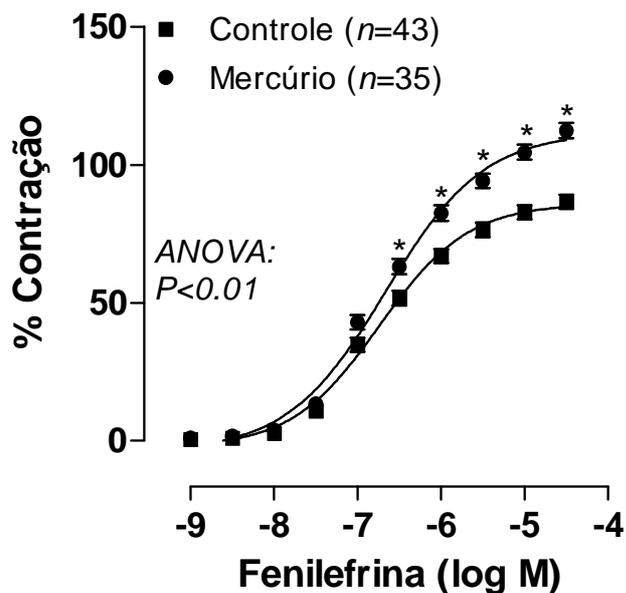


Figura 5: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias): * $P < 0,01$.

4.5. Participação do endotélio na resposta contrátil a fenilefrina

Para avaliar a participação do endotélio na resposta vascular a fenilefrina o endotélio vascular foi removido e, a ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina (30 μ M) induzir relaxamento maior que 10%.

A remoção mecânica do endotélio promoveu aumento significativo da sensibilidade e da resposta máxima a fenilefrina em segmentos arteriais dos animais dos grupos Controle e Mercúrio, no entanto, quando comparados os resultados do efeito da retirada do endotélio, por meio da dAUC, entre os animais dos dois grupos experimentais foi observado efeito de menor magnitude nos animais do grupo Mercúrio. Diferente do observado nos experimentos com endotélio íntegro, nos segmentos arteriais sem endotélio a resposta máxima e a sensibilidade a fenilefrina foram semelhantes nos animais de ambos os grupos experimentais (Figura 6, Tabela 2).

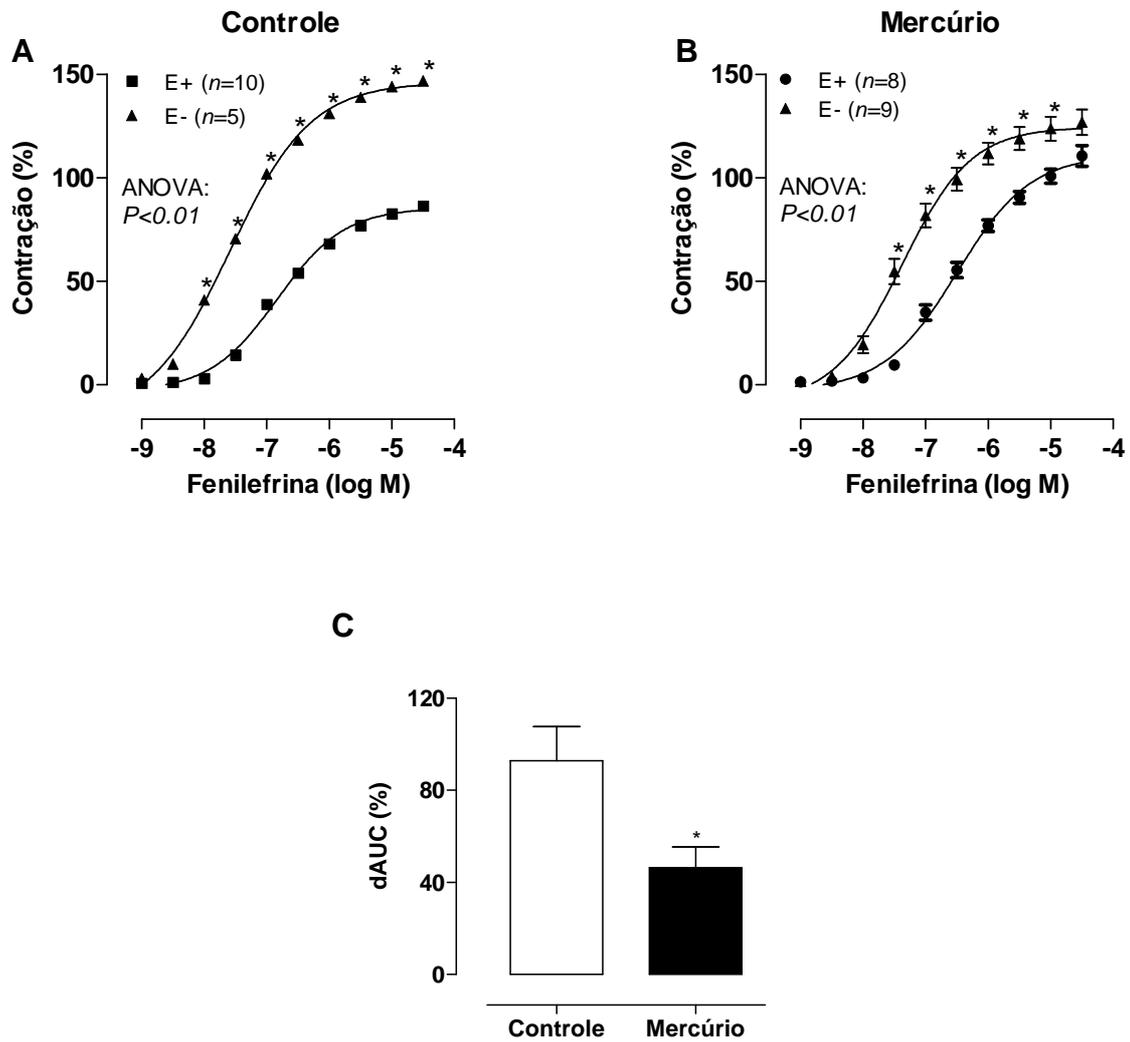


Figura 6: Efeito da retirada mecânica do endotélio sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * $P < 0,01$. Teste t * $P < 0,05$ (dAUC).

Tabela 2: Valores de pD_2 e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, % de contração) obtidos por meio das curvas concentração-resposta à fenilefrina, na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

	pD_2		$R_{m\acute{a}x}$ (%)	
	Controle	Mercúrio	Controle	Mercúrio
E+	$-6,74 \pm 0,15$	$-6,51 \pm 0,11$	$86,6 \pm 6,2$	$111,7 \pm 7,0$
E-	$-7,59 \pm 0,10^*$	$-7,36 \pm 0,08^*$	$145,8 \pm 12,5^*$	$124,42 \pm 6,1$

Valores expressos como média \pm erro padrão da média.

Teste t: * $P < 0,01$ E+ vs E-.

4.6 Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico sobre a resposta vascular a fenilefrina

Para avaliar se a exposição crônica ao $HgCl_2$ altera a participação do óxido nítrico na resposta contrátil a fenilefrina em segmentos de artéria aorta de ratos, anéis de aorta torácica, com endotélio preservado, foram incubados com L-NAME (100 μM), inibidor não-específico da NOS. O L-NAME provocou aumento da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina nas artérias de animais dos grupos Controle e Mercúrio. Porém, os valores da dAUC demonstram que a participação do óxido nítrico na resposta contrátil a fenilefrina está reduzida em ratos expostos ao mercúrio (Figura 7, Tabela 3).

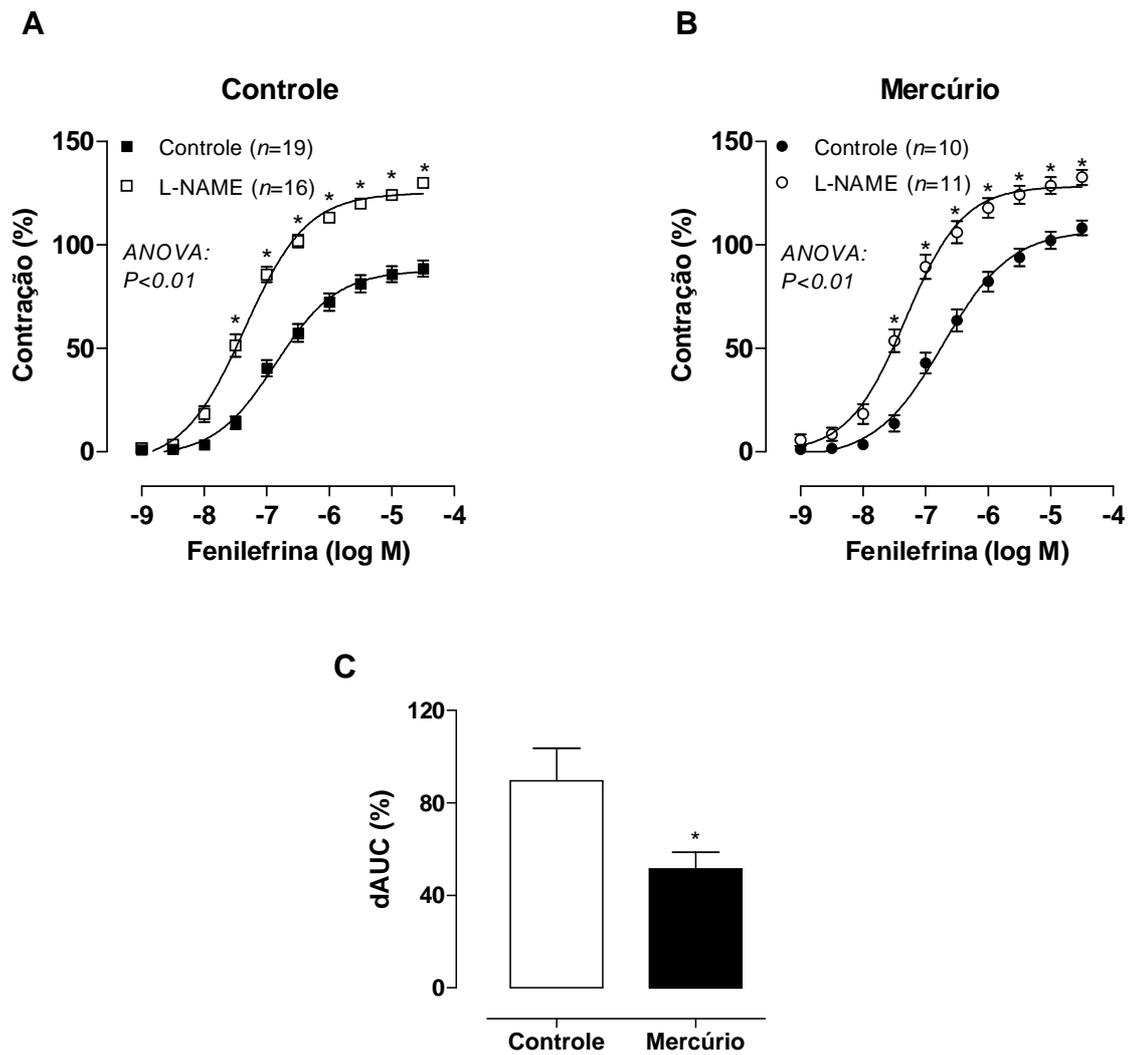


Figura 7: Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100 μ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * $P < 0,01$. Teste t * $P < 0,05$ (dAUC).

Tabela 3: Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com L-NAME (100 μ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

	pD_2		$R_{m\acute{a}x}$ (%)	
	Controle	Mercúrio	Controle	Mercúrio
Controle	-6,79 \pm 0,09	-6,71 \pm 0,07	88,4 \pm 3,6	106,7 \pm 3,5#
L-NAME	-7,35 \pm 0,08*	-7,33 \pm 0,07*	125,0 \pm 1,4*	128,7 \pm 3,7*

Valores expressos como média \pm erro padrão da média.

Teste t: *P<0.001 Curva Controle vs Curva + Fármaco. #P<0,05 grupo Controle vs grupo Mercúrio.

4.7 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS)

A expressão da eNOS em condições basais (segmentos arteriais retirados logo após o animal ser sacrificado) foi detectada, através da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Foi observado que nestas artérias a exposição a baixas doses de HgCl₂ durante trinta dias não provocou alteração na expressão protéica da eNOS (Figura 8).

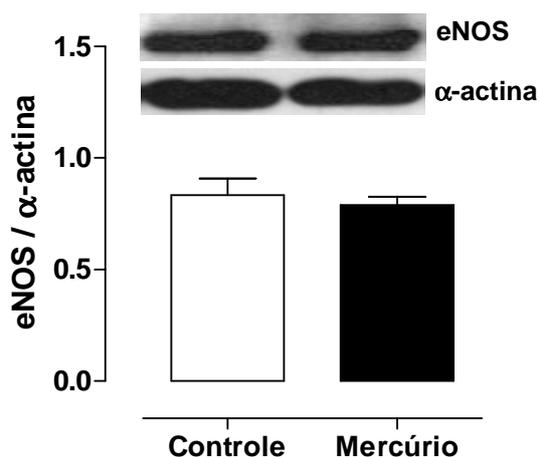


Figura 8: Resultados da expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (n = 12) e Mercúrio (n = 12). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da eNOS e da α -actina. Células endoteliais humanas foram utilizadas como controle positivo (imagem não mostrada). Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da eNOS e da α -actina. Teste t: $P > 0,05$.

4.8 Participação das espécies reativas ao oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Alguns autores associam o efeito tóxico do mercúrio ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Reus *et al.*, 2003; Kim & Shama, 2004; Houston, 2007) e, por isso, decidimos analisar a participação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio na resposta contrátil a fenilefrina. Para avaliar a participação do $O_2^{\bullet-}$ na resposta vascular a fenilefrina foram realizados experimentos de reatividade vascular em anéis de aorta na presença do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) e também experimentos na presença do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (0,3 mM).

A apocinina promoveu redução tanto na sensibilidade como na resposta máxima a fenilefrina nos segmentos arteriais de animais dos grupos Controle e Mercúrio, todavia, quando comparados os efeitos da inibição da NADPHoxidase, por meio da dAUC, entre os animais dos dois grupos experimentais, nota-se efeito de maior magnitude nos animais do grupo mercúrio (Figura 9, Tabela 4).

Nos experimentos realizados na presença de SOD foi observada redução da sensibilidade e da resposta máxima a fenilefrina somente em anéis de aorta dos animais do grupo Mercúrio (Figura 10, Tabela 4).

A participação do H_2O_2 na resposta contrátil à fenilefrina foi avaliada em experimentos em que os anéis de aorta eram incubados com o “scavenger” do peróxido de hidrogênio, catalase (1000 U/ml) e, foi observado que a catalase não modificou a resposta vascular a fenilefrina em nenhum dos grupos estudados (Figura 11, Tabela 4).

Estes resultados sugerem que em animais expostos cronicamente a baixas doses de $HgCl_2$ ocorre maior participação do $O_2^{\bullet -}$ na resposta contrátil a fenilefrina.

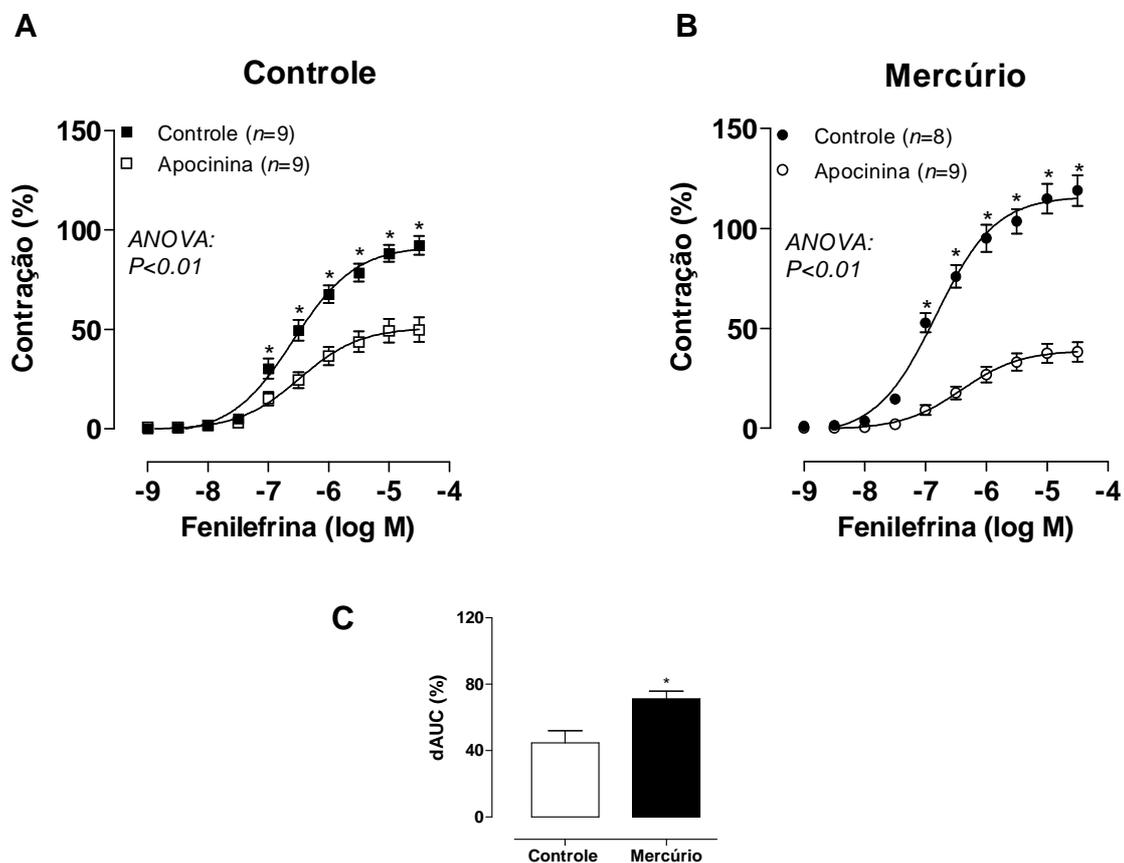


Figura 9: Efeito do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (0.3 mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * $P < 0,01$. Teste t * $P < 0,05$ (dAUC).

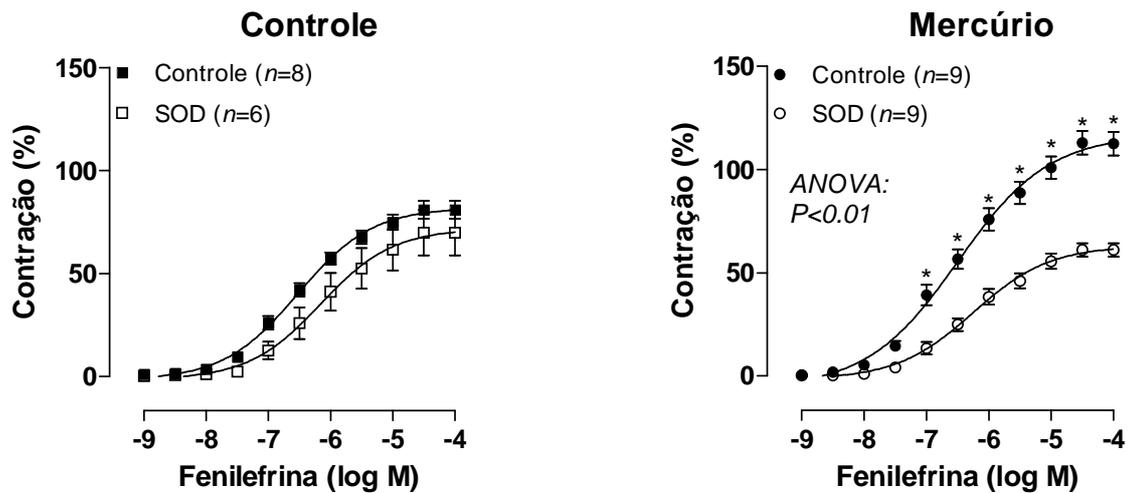


Figura 10: Efeito do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * $P < 0,01$.

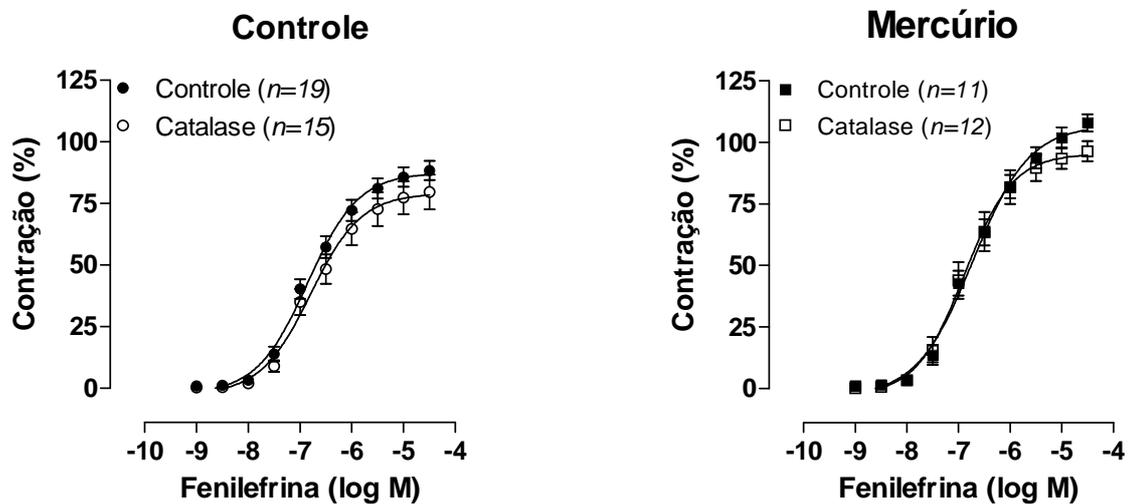


Figura 11: Efeito da catalase (1000 U/ml), “scavenger” do peróxido de hidrogênio sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) $P > 0,05$.

Tabela 4: Efeito do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (0.3 Mm) , do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) e da Catalase (1000 U/ml), “scavenger” do peróxido de hidrogênio sobre os valores de pD_2 e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, % de contração) a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

	pD_2		$R_{m\acute{a}x}$ (%)	
	Controle	Mercúrio	Controle	Mercúrio
Apocinina				
Controle	$-6,58 \pm 0,08$	$-6,82 \pm 0,03$	$90,8 \pm 4,2$	$116,2 \pm 7,1\#$
Apocinina	$-6,46 \pm 0,08$	$-6,40 \pm 0,09^*$	$51,3 \pm 6,3^*$	$39,0 \pm 5,0^*$
SOD				
Controle	$-6,53 \pm 0,10$	$-6,48 \pm 0,13$	$82,8 \pm 5,0$	$117,5 \pm 6,3\#$
SOD	$-6,10 \pm 0,12^*$	$-6,23 \pm 0,12$	$71,3 \pm 10,8$	$63,0 \pm 3,0^*$
Catalase				
Controle	$-6,81 \pm 0,08$	$-6,72 \pm 0,7$	$87,2 \pm 3,8$	$103,4 \pm 3,7\#$
Catalase	$-6,71 \pm 0,08$	$-6,81 \pm 0,13$	$78,6 \pm 6,7$	$97,5 \pm 4,6$

Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

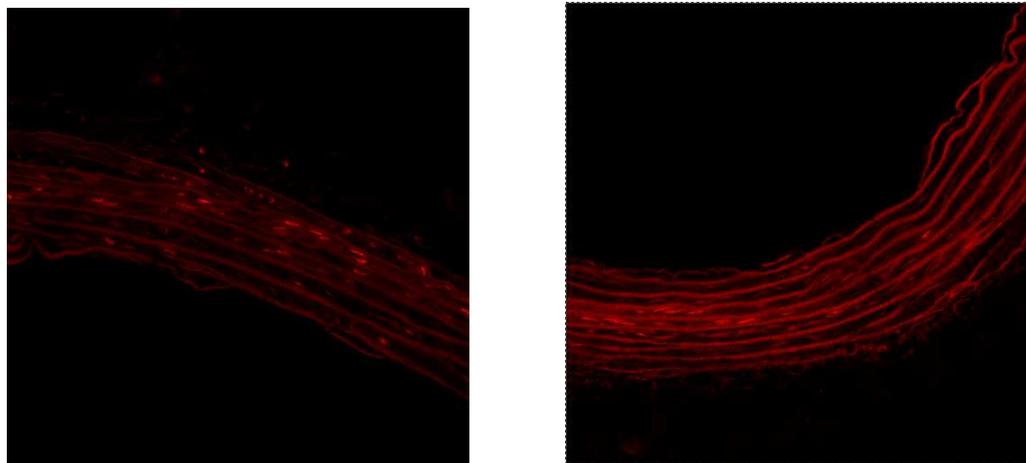
Teste t: * $P < 0,01$ Curva Controle vs Curva + Fármaco. # $P < 0,05$ grupo Controle vs grupo Mercúrio.

4.9 Produção de ânion superóxido

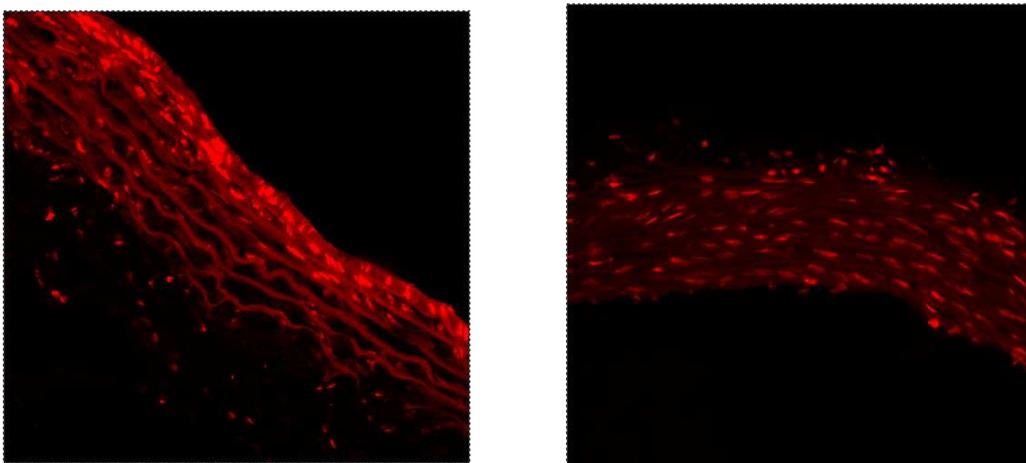
Como os resultados dos experimentos de reatividade vascular sugeriam maior participação do $O_2^{\bullet-}$ na resposta contrátil a fenilefrina em segmentos arteriais dos animais do grupo Mercúrio, resolvemos verificar se a exposição crônica ao $HgCl_2$ influencia na produção de $O_2^{\bullet-}$. Para isto, utilizamos a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE) (Figura 12).

Nos experimentos realizados em condição basal (anéis de aorta não estimulados) foi observada maior produção de $O_2^{\bullet-}$ nos segmentos arteriais dos ratos do grupo Mercúrio.

A



B



C

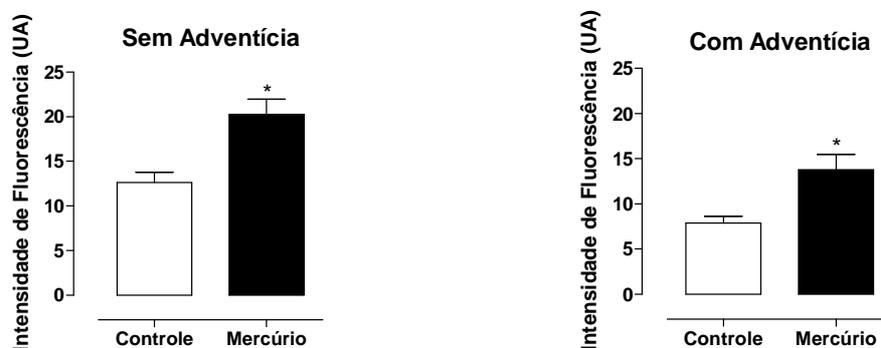


Figura 12: Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de artéria aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio quando excluída (C) a camada adventícia ou contada (C). Teste t: * $P < 0,05$.

4.10 Expressão protéica das três isoformas da superóxido dismutase (SOD): MnSOD, CuZnSOD e EC-SOD

Os resultados sugerem que a exposição crônica ao HgCl_2 promove aumento da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e também maior participação deste radical livre na resposta contrátil a fenilefrina em anéis de artéria aorta. Isso demonstrou a necessidade de investigarmos o efeito da exposição ao mercúrio sobre a expressão de enzimas antioxidantes, sendo assim, estudamos a expressão protéica das três isoformas da SOD nos segmentos arteriais de animais dos grupos Controle e Mercúrio.

A expressão protéica das três isoformas da SOD foi detectada em anéis de aorta torácica de ratos de ambos os grupos experimentais. O tratamento com mercúrio não alterou a expressão protéica das isoformas MnSOD e CuZnSOD, no entanto, foi observado aumento da expressão protéica da isoforma EC-SOD nos segmentos arteriais dos animais do grupo Mercúrio (Figura 13).

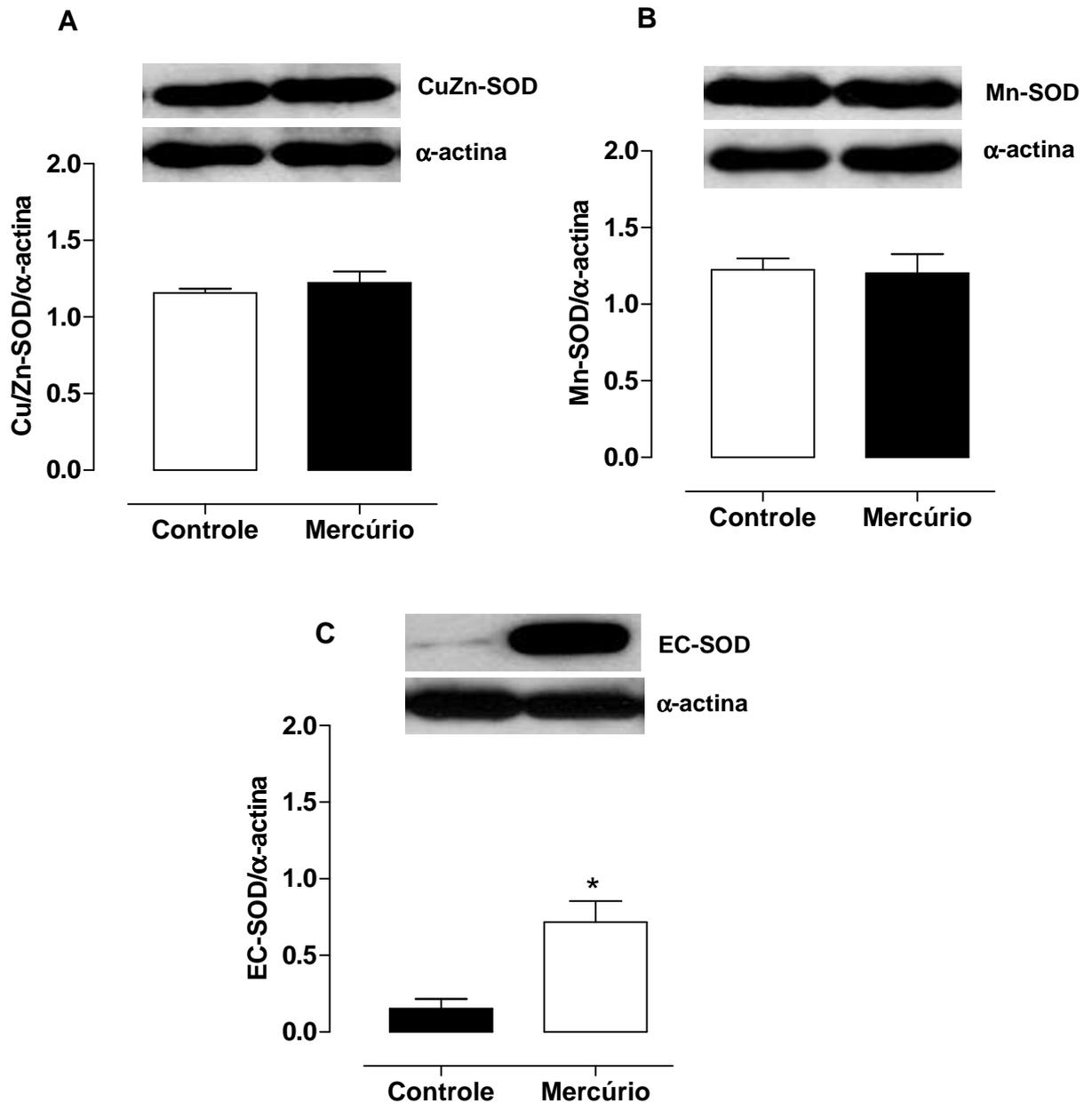


Figura 13: Resultados da expressão protéica das três isoformas da superóxido dismutase (SOD), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão das isoformas da SOD e da α -actina. A. CuZnSOD (Controle n = 7; Mercúrio n = 8), B. MnSOD (Controle n = 7; Mercúrio n = 7). C. EC-SOD (Controle n = 8; Mercúrio n = 8). Extrato de tecido cerebral de rato foi utilizado como controle positivo para CuZn-SOD e Mn-SOD, e extrato de tecido pulmonar de rato foi o controle positivo para EC-SOD. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como relação entre a densidade das isoformas da SOD e a α -actina. Teste t: $P > 0,05$.

4.11 Participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina

Para estudar a influência dos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase sobre a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio, foi desenvolvida uma seqüência de experimentos de reatividade vascular com indometacina, NS 398, SQ 29,548, SC 19,220 e furegrelato.

O inibidor não-específico da COX, indometacina (1 μ M) reduziu a resposta máxima a fenilefrina nos segmentos arteriais de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Porém, quando comparados os efeitos da inibição da COX, através da dAUC, entre os dois grupos experimentais, observa-se efeito de maior magnitude nos animais do grupo Mercúrio (Figura 14, Tabela 5). Estes resultados sugerem que nos animais do grupo Mercúrio existe maior participação dos prostanóides vasoconstritores derivados da COX na resposta a fenilefrina.

Após verificar que a exposição ao HgCl_2 aumenta a participação dos prostanóides contráteis derivados da COX na resposta vascular à fenilefrina decidimos estudar se, estes prostanóides, são derivados da COX-2. Para testar esta hipótese anéis de aorta foram pré-incubados com o inibidor específico da COX-2, o NS 398 (1 μ M). Este fármaco promoveu redução da resposta máxima a fenilefrina somente em animais do grupo Mercúrio (Figura 15, Tabela 5).

Diante das evidências de maior participação dos prostanóides derivados da COX-2 na resposta contrátil a fenilefrina em anéis de aorta dos ratos expostos ao HgCl_2 foi investigado se estes prostanóides agem através da ativação dos receptores TP ou EP_1 . Para isso foram realizados experimentos de reatividade vascular a fenilefrina em anéis de aorta pré-incubados com o antagonista do receptor TP, o SQ 29,548 (1 μ M) e experimentos com artérias pré-incubadas com o SC 19,220 (10 μ M), antagonista do receptor EP_1 . Estes fármacos reduziram a resposta máxima a fenilefrina somente nos segmentos arteriais de ratos do grupo Mercúrio (Figuras 16 e 17, Tabela 5).

Para estudar se a exposição ao HgCl_2 promove aumento da participação do tromboxano A_2 (TXA_2) na resposta contrátil a fenilefrina, anéis de aorta de ratos dos grupos Controle e Mercúrio foram pré-incubados com furegrelato (10 μ M), inibidor da sintase do TXA_2 . O furegrelato reduziu a resposta contrátil a fenilefrina somente nos anéis de aorta de ratos expostos ao HgCl_2 (Figura 18, Tabela 5).

Estes resultados sugerem maior participação dos prostanóides derivados da COX-2, em especial do TXA₂, na resposta contrátil a fenilefrina em anéis de aorta de ratos expostos ao HgCl₂. Além disso, estes prostanóides parecem agir principalmente por meio da ativação dos receptores TP e EP₁.

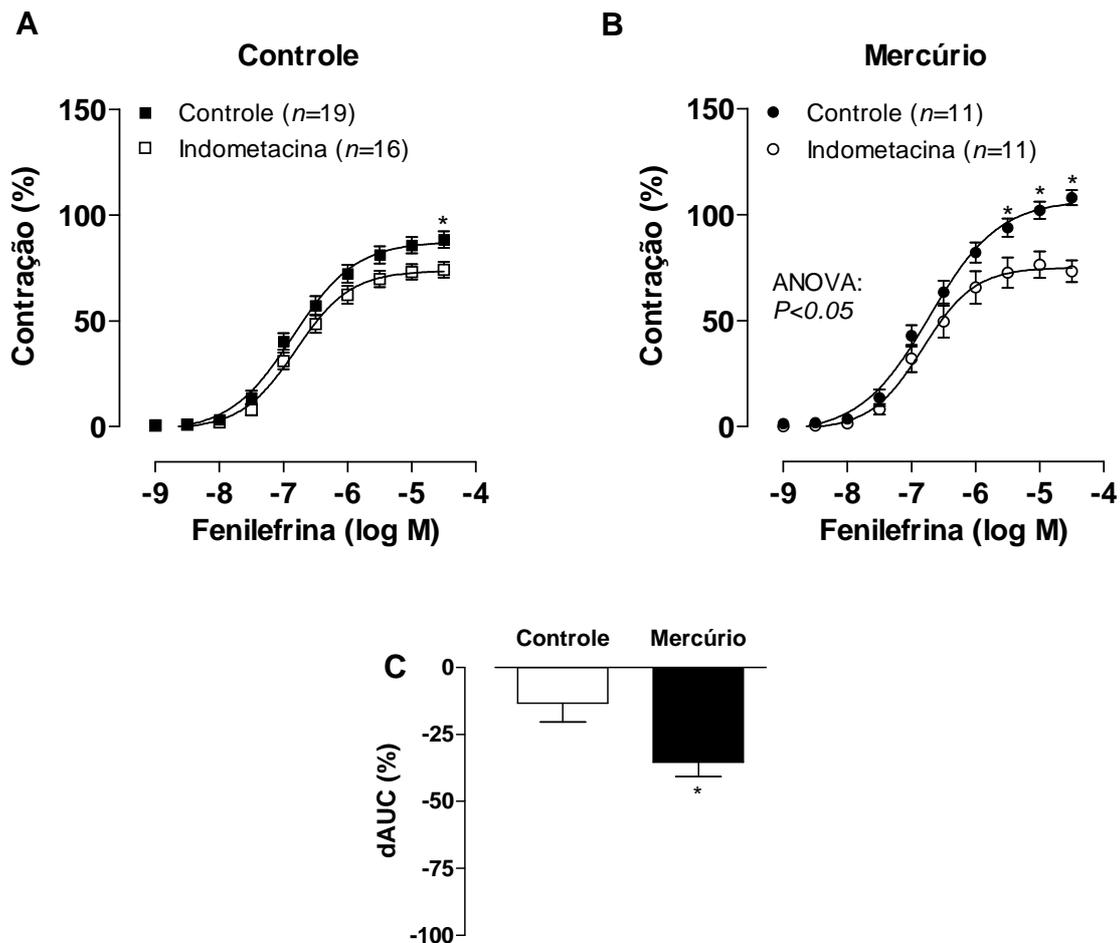


Figura 14: Efeito do inibidor não-específico da COX, indometacina (1 μ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAUC) em segmentos de aorta de ambos os grupos experimentais (C). Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * P<0,05. Teste t * P< 0,05 (dAUC).

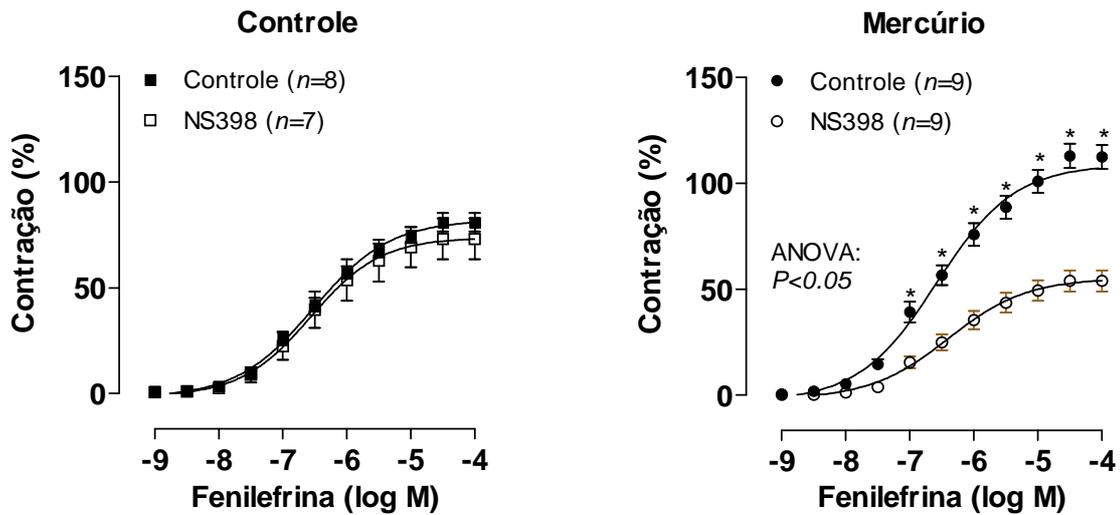


Figura 15: Efeito do inibidor específico da COX-2, o NS 398 (1 μ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * $P < 0,05$.

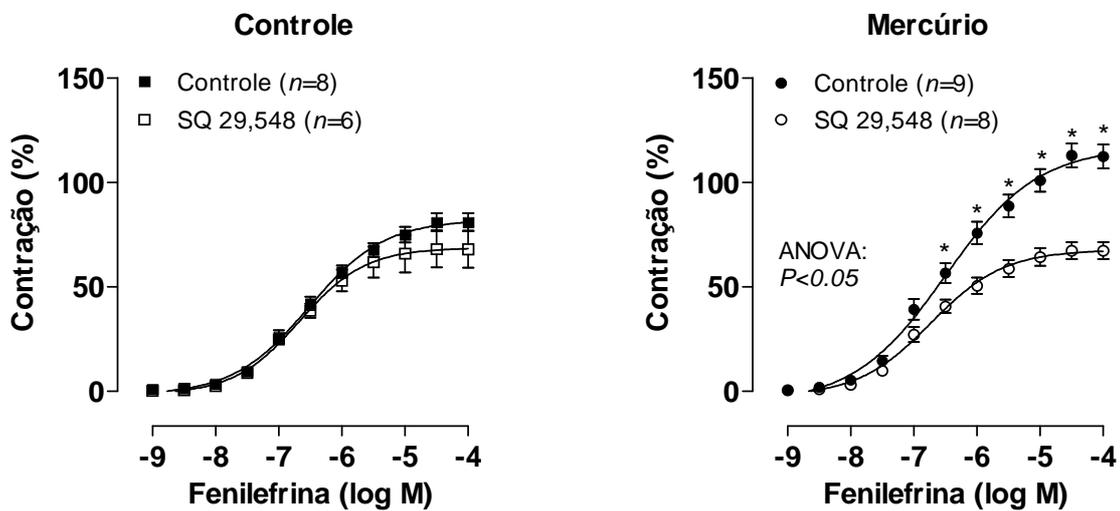


Figura 16: Efeito do antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1 μ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * $P < 0,05$.

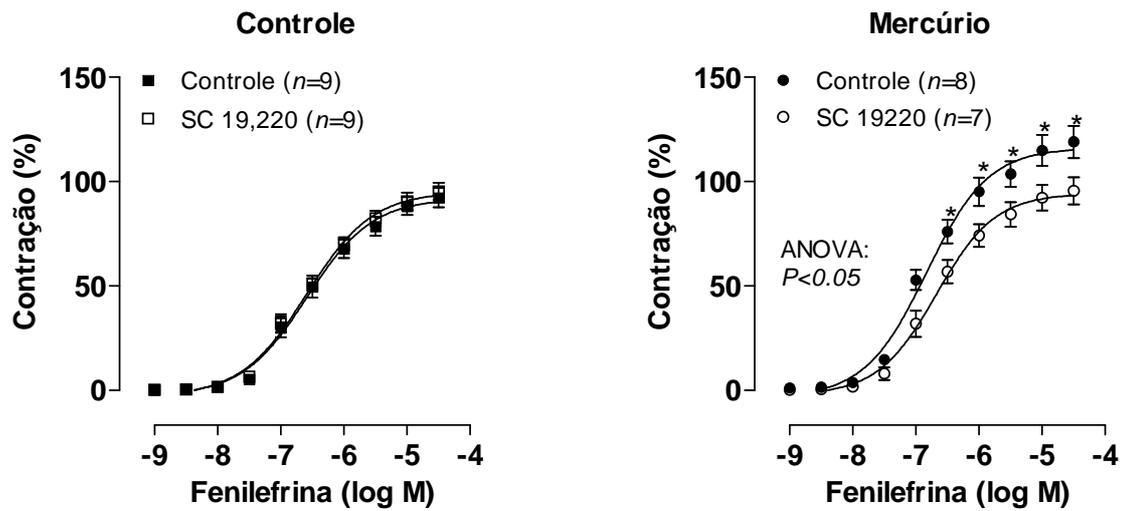


Figura 17: Efeito do antagonista do receptor EP₁, SC 19,220 (10 µM), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Os resultados (média ± erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * P < 0,05.

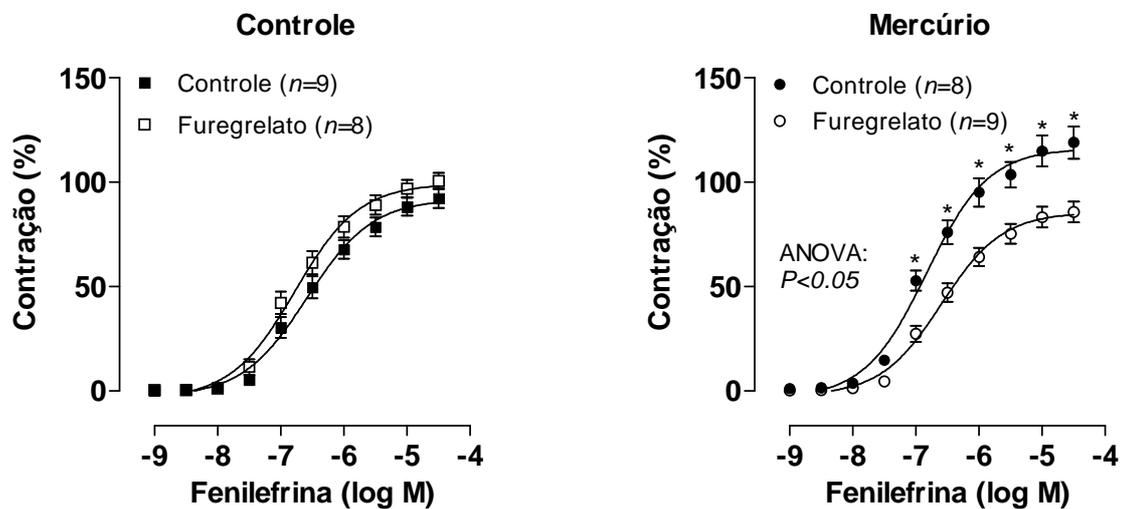


Figura 18: Efeito inibidor da sintase do TXA₂, furegrelato (10 µM), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (A) e Mercúrio (B). Os resultados (média ± erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * P < 0,05.

Tabela 5: Efeito do inibidor não-específico da COX, indometacina (1 μ M), do inibidor específico da COX-2, NS 398 (1 μ M), do antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1 μ M), do antagonista do receptor EP₁, SC 19,220 (10 μ M) e do inibidor da sintase do TXA₂, furegrelato (10 μ M), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

	pD ₂		R _{máx} (%)	
	Controle	Mercúrio	Controle	Mercúrio
Indometacina				
Controle	-6,79 ± 0,09	-6,70 ± 0,07	88,4 ± 3,6	106,7 ± 3,5#
Indometacina	-6,77 ± 0,07	-6,71 ± 0,10	73,9 ± 3,4*	76,7 ± 5,8*
NS 398				
Controle	-6,53 ± 0,09	-6,48 ± 0,13	82,8 ± 5,0	117,5 ± 6,3#
NS 398	-6,49 ± 0,16	-6,35 ± 0,09	74,3 ± 9,8	55,5 ± 5,0*
SQ 29,548				
Controle	-6,53 ± 0,10	-6,48 ± 0,13	82,8 ± 4,5	117,5 ± 6,3#
SQ 29,548	-6,72 ± 0,08	-6,72 ± 0,08	68,7 ± 9,3	67,8 ± 4,1*
SC 19,220				
Controle	-6,58 ± 0,08	-6,82 ± 0,03	90,8 ± 4,2	116,2 ± 7,1#
SC 19,220	-6,62 ± 0,07	-6,62 ± 0,04*	94,6 ± 4,3	90,8 ± 7,0*
Furegrelato				
Controle	-6,58 ± 0,08	-6,82 ± 0,03	90,9 ± 4,2	116,2 ± 7,1#
Furegrelato	-6,75 ± 0,09	-6,60 ± 0,07*	99,2 ± 3,4	85,2 ± 4,9*

Valores expressos em média ± erro padrão da média.

Teste t: *P<0,01 Curva Controle vs Curva + Fármaco. # P<0,05 grupo Controle vs grupo Mercúrio.

4.12 Expressão gênica da COX-2

A análise do RNAm de COX-2 nos segmentos de aorta de animais dos grupos Controle e Mercúrio demonstrou que a expressão do RNAm de COX-2 é muito maior na aorta dos animais que foram expostos ao HgCl₂ (Figura 19).

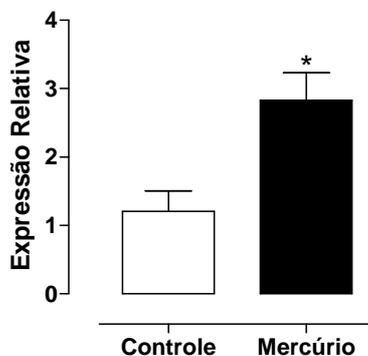


Figura 19: Resultados da análise da expressão do RNAm da COX-2, por meio da técnica de PCR-RT, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (n = 7) e Mercúrio (n = 9). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como relação entre a expressão relativa de RNAm do grupo Controle comparado ao grupo Mercúrio. Mann-Whitney test: *P<0,05.

4.13 Expressão de COX-2 por Imunofluorescência

Na análise de cortes transversais de segmentos de aorta de animais dos grupos Controle e Mercúrio foi notada expressão da COX-2 no endotélio e na camada adventícia de animais expostos ao HgCl₂ (Figura 20).

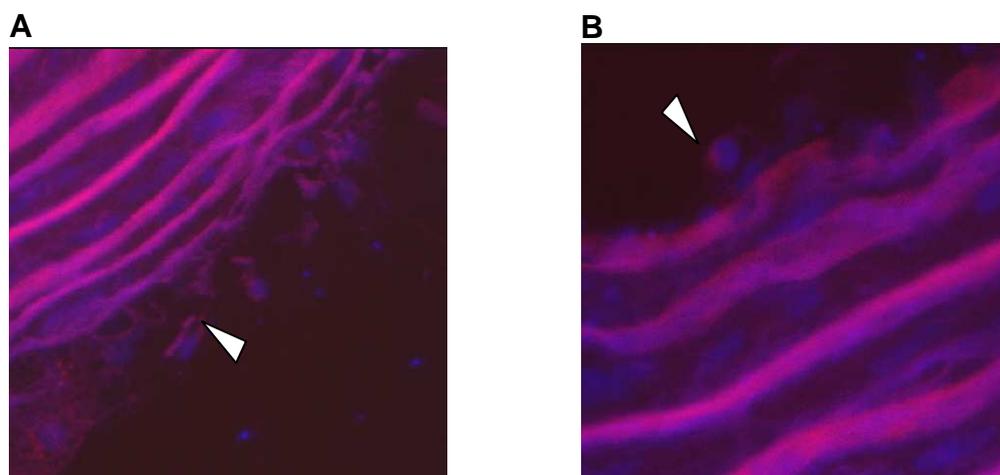


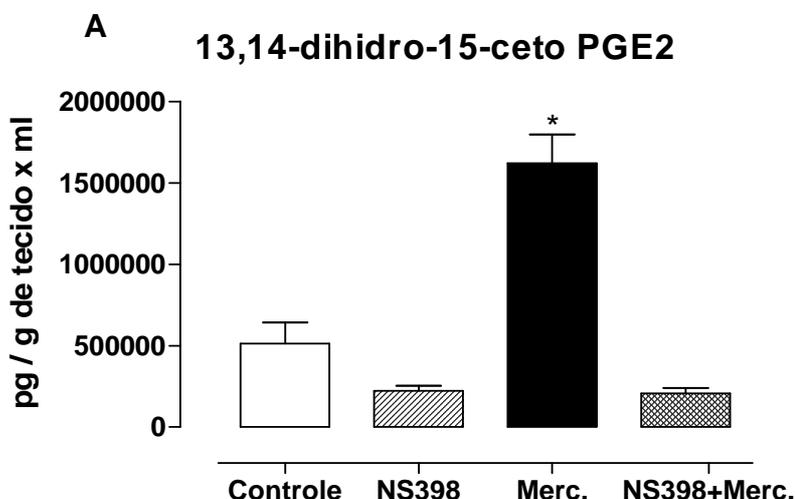
Figura 20: Imagens representam a expressão da COX-2, por imunofluorescência, na camada adventícia (A) e em células endoteliais (B) de segmentos de aorta de animais do grupo Mercúrio.

4.14 Quantificação da liberação de prostanóides derivados da COX-2

Como visto anteriormente os resultados de reatividade vascular indicam que animais do grupo Mercúrio apresentam maior participação dos prostanóides derivados da via da COX-2 na resposta vascular a fenilefrina. O TXA₂ e os prostanóides que agem via ativação dos receptores TP e EP₁ são os que parecem tem maior ação. Foi visto que a maior participação dos prostanóides desta via está associada ao aumento da expressão gênica da COX-2 e, para verificar a maior participação destes prostanóides na resposta a fenilefrina em anéis de aorta dos animais do grupo Mercúrio foi quantificada a liberação de PGE₂ e do TXA₂ na solução de Krebs-Henseleit depois de realizada curva de concentração-resposta à fenilefrina. As curvas de fenilefrina foram realizadas na presença e ausência do inibidor específico da COX-2, NS 398 (1 µM).

Os níveis de 13,14-dihidro-15-keto PGE₂ e Tromboxano B₂ (TXB₂) eram maiores nos meios onde estavam incubados os segmentos arteriais dos animais expostos ao HgCl₂. Na presença do inibidor específico da COX-2, NS 398, ocorreu redução da liberação dos prostanóides 13,14-dihidro-15-keto PGE₂ e TXB₂ somente nos meios de incubação dos segmentos arteriais dos animais do grupo Mercúrio (Figura 21 A e B)

Estes resultados sugerem que a exposição crônica ao HgCl₂ aumenta a produção dos prostanóides contráteis, 13,14-dihidro-15-ceto PGE₂ e TXA₂, na resposta vascular a fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica.



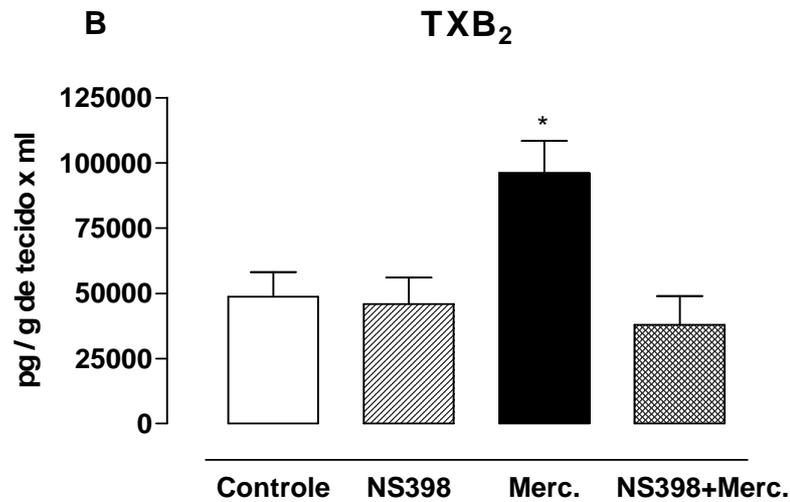


Figura 21: Efeito da exposição crônica ao HgCl_2 sobre a liberação de 13,14-dihidro-15-ceto PGE_2 (A) e TXB_2 (B) em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. As medidas foram realizadas nas condições: Controle (n = 6), Controle + NS398 (n = 7), Mercúrio (n = 7) e Mercúrio + NS398 (n = 7). ANOVA (duas vias) * $P < 0,01$ vs Controle.

4.15 Análise da participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina

Trabalho desenvolvido em nosso laboratório (Wiggers *et al.*, 2008a) sugere que em leito vascular caudal de ratos a exposição aguda ao HgCl_2 promove aumento da resposta contrátil a fenilefrina, sendo este aumento possivelmente associado a maior atividade da enzima conversora da angiotensina. Com base nesta informação foi investigada a participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina em segmentos de artéria aorta de ratos expostos cronicamente ao HgCl_2 .

Para esta investigação foram realizados experimentos de reatividade vascular na presença do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Captopril (0.1 mM) e também experimentos onde os anéis de aorta eram pré-incubados com o antagonista dos receptores AT_1 , Losartan (10 mM). O Losartan reduziu a resposta máxima a fenilefrina somente nos segmentos arteriais dos animais do grupo Mercúrio (Figura 22A, Tabela 6). A inibição da enzima conversora da angiotensina

não alterou a resposta contrátil a fenilefrina em anéis de aorta em nenhum dos grupos experimentais (Figura 22B, Tabela 6).

Estes resultados sugerem que a exposição crônica ao HgCl_2 aumenta a participação da angiotensina II na resposta contrátil a fenilefrina. Além disso, tornou necessária a avaliação da atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina e também o estudo da expressão protéica dos receptores angiotensinoginérgicos AT_1 .

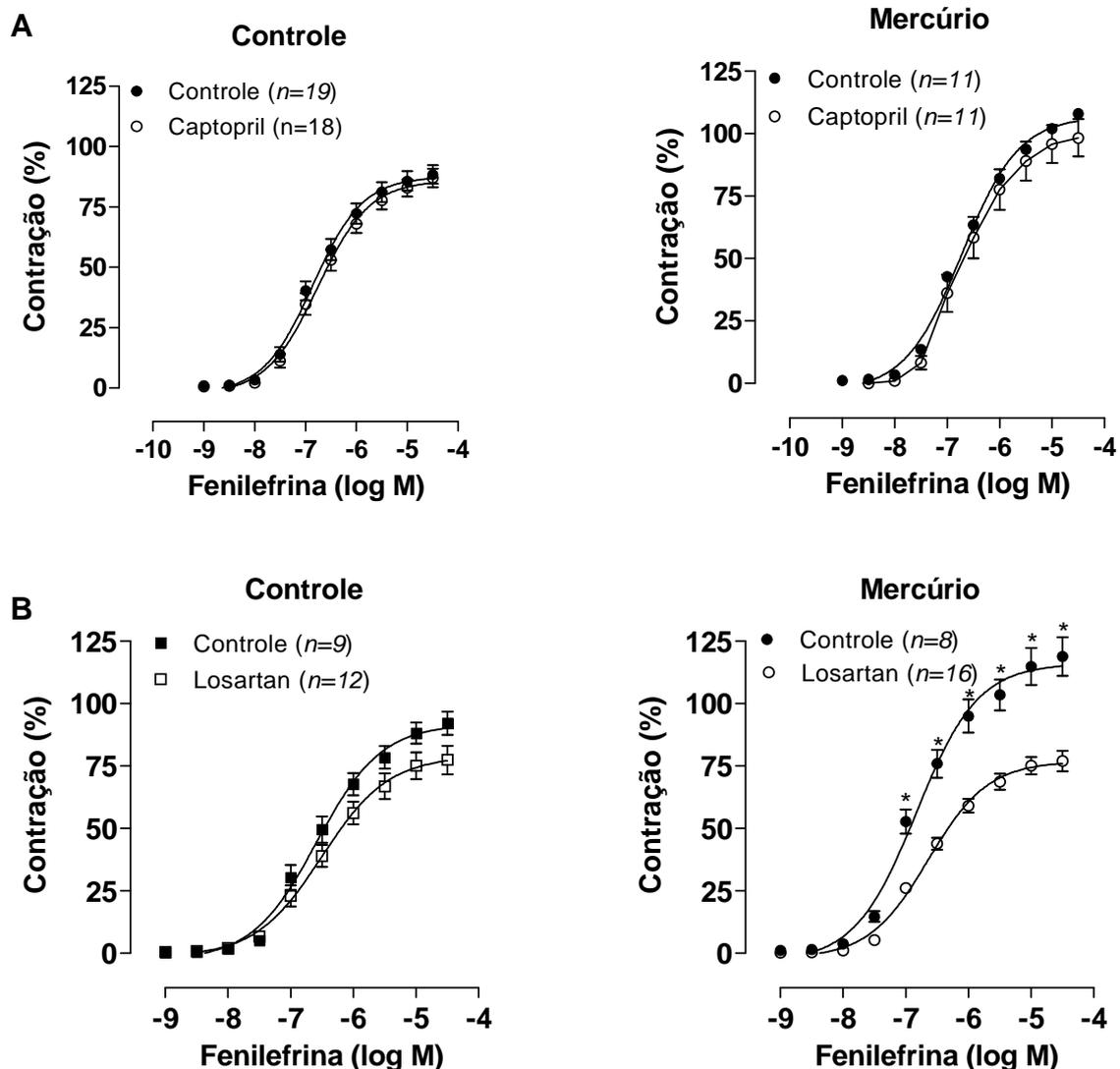


Figura 22: Efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Captopril (0,1 mM) e do antagonista do receptor AT_1 , Losartan (10 mM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Os resultados (média \pm erro padrão da média) da resposta à fenilefrina estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. ANOVA (duas vias) * $P < 0,05$.

Tabela 6: Efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina, Captopril (0.1 mM) e do antagonista do receptor AT₁, Losartan (10 mM) sobre os valores de pD₂ e resposta máxima (R_{máx}, % de contração) obtidos através das curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

	pD ₂		R _{máx} (%)	
	Controle	Mercúrio	Controle	Mercúrio
Captopril				
Controle	-6,81 ± 0,08	-6,72 ± 0,07	87,2 ± 3,8	103,4 ± 3,7#
Captopril	-6,73 ± 0,08	-6,64 ± 0,09	85,0 ± 3,4	98,2 ± 7,3
Losartan				
Controle	-6,59 ± 0,08	-6,83 ± 0,03	89,4 ± 3,9	114,0 ± 6,9*#
Losartan	-6,51 ± 0,08	-6,65 ± 0,03	76,5 ± 5,3	75,9 ± 3,7

Valores expressos em média ± erro padrão da média.

Teste t: *P<0,05 Curva Controle vs Curva + Fármaco. # P<0,05 grupo Controle vs grupo Mercúrio.

4.16 Atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA)

A atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) foi significativamente maior no plasma dos animais expostos cronicamente ao HgCl₂ quando comparados aos animais controle (Figura 23).

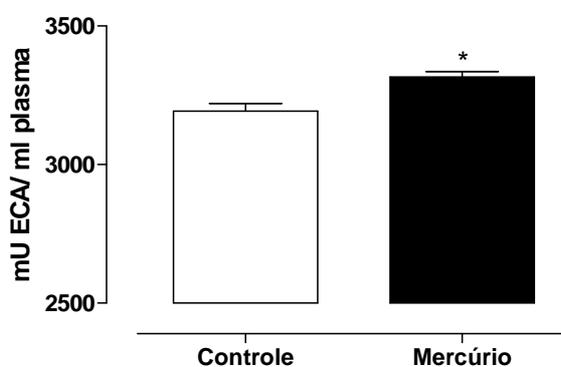


Figura 23: Atividade da ECA (mU/ml) no plasma de ratos dos grupos Controle (n = 16) e Mercúrio (n = 8). Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média. Teste t: * P<0,01.

4.17 Expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT₁

Através da técnica de Western Blot a expressão protéica dos receptores AT₁ foi detectada nos segmentos de aorta torácica dos animais de ambos os grupos experimentais. A expressão protéica foi semelhante nas artérias dos animais dos grupos Controle e Mercúrio (Figura 24).

A análise destes resultados sugere que a exposição crônica a baixas doses de HgCl₂ aumenta a participação do sistema renina-angiotensina por meio do aumento da atividade plasmática da ECA sem alterar a expressão dos receptores AT₁.

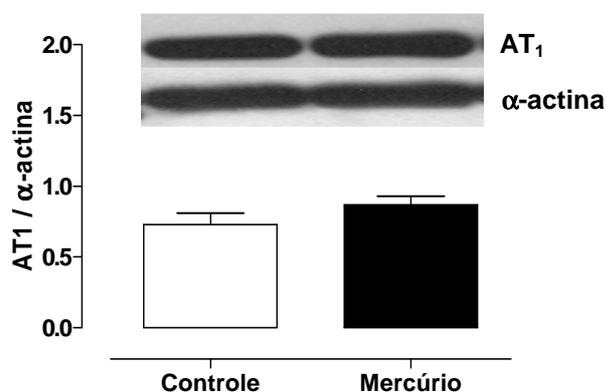


Figura 24: Resultados da expressão protéica do receptor angiotensinoginérgico AT₁, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle (n = 8) e Mercúrio (n = 8). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT₁ e da α-actina. Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como relação entre a densidade do receptor AT₁ e da α-actina. Teste t: P>0,05.

4.18 Respostas vasculares a acetilcolina e ao DEA-NO

A exposição à acetilcolina (1 ηM a 30 μM) e ao DEA-NO (10 ηM – 0.1 mM) promoveu relaxamento concentração-dependente nos anéis de aorta torácica, de ambos os grupos, estes anéis foram previamente expostos a dose de fenilefrina suficiente para promover pré-contração correspondente a 50% da resposta máxima ao KCl. A exposição crônica ao HgCl₂ promoveu alteração na resposta vascular a acetilcolina observada pela redução da resposta máxima e da sensibilidade a acetilcolina nos anéis de aorta dos animais do grupo mercúrio (Figura 25A, Tabela 7).

A resposta vasodilatadora ao doador do óxido nítrico, DEA-NO, foi semelhante nos segmentos arteriais dos animais dos grupos Controle e Mercúrio (Figura 25B, Tabela 7).

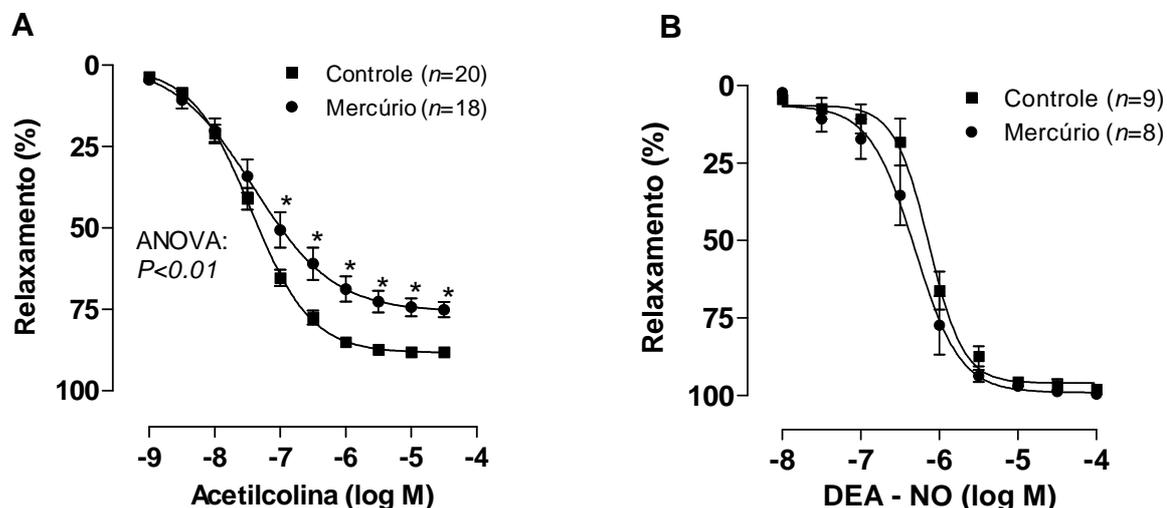


Figura 25: Curva concentração-resposta à acetilcolina (A) e ao doador de óxido nítrico, DEA-NO (B) em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Mercúrio pré-contraídas com fenilefrina. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias) * $P < 0,01$.

4.18.1 Participação das espécies reativas ao oxigênio na resposta vascular a acetilcolina

Resultados anteriores sugerem que a exposição ao HgCl_2 promove aumento da produção de radicais livres e, como foi observado piora na resposta vasodilatadora dependente do endotélio decidimos investigar se o prejuízo na resposta vasodilatadora está associado ao aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio. Para isso foram desenvolvidos experimentos de reatividade vascular onde anéis de aorta de animais dos grupos Controle e Mercúrio eram pré-incubados com o “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml), e também com o inibidor da NADPHoxidase, apocinina (0,3 mM).

A SOD e a apocinina promoveram melhora na resposta vasodilatadora a acetilcolina nos segmentos arteriais de animais do grupo Mercúrio (Figura 26, Tabela 7).

Esses resultados indicam que o ânion superóxido parece ser provocar a redução da resposta vasodilatadora a acetilcolina em animais expostos ao HgCl_2 .

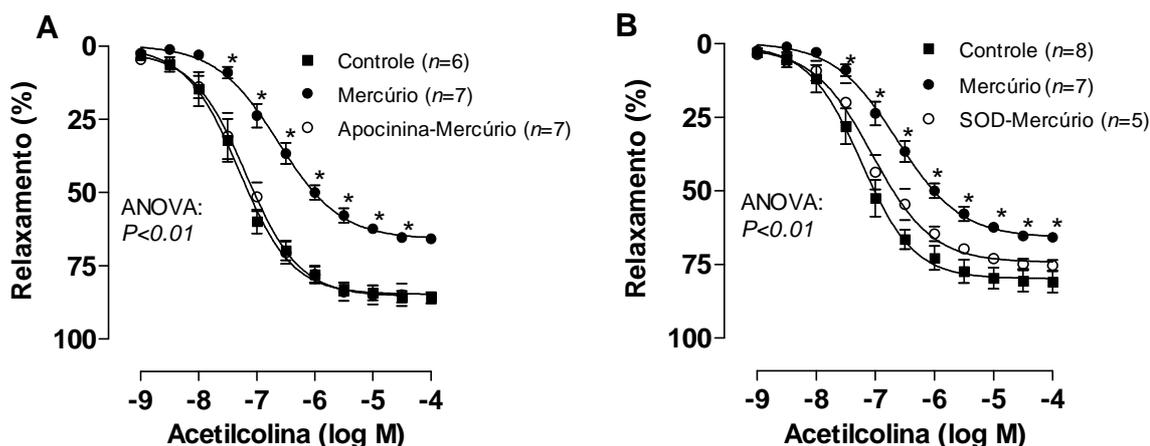


Figura 26: Efeito do inibidor da NADPHoxidase, Apocinina (0,3 mM) (A) e efeito do “scavenger” do ânion superóxido, SOD (150 U/ml) (B) sobre a curva concentração-resposta à acetilcolina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos do grupo Mercúrio pré-contraídas com fenilefrina. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias) * $P < 0,01$ Mercúrio vs Apocinina-Mercúrio e SOD-Mercúrio.

4.18.2 Participação dos prostanóides da via da COX na resposta vascular a acetilcolina

Como resultados deste estudo indicam maior participação de prostanóides derivados da COX na resposta contrátil a fenilefrina, resolvemos investigar se os prostanóides derivados desta via estão envolvidos na piora da resposta vasodilatadora a acetilcolina. Experimentos de reatividade vascular foram realizados na presença do inibidor inespecífico da COX, indometacina (1 μ M).

A indometacina não provocou alteração da resposta vasodilatadora a acetilcolina (Figura 27, Tabela 7). Indicando, com isso, que os prostanóides derivados da via da COX não parecem estar envolvidos no prejuízo da resposta vasodilatadora a acetilcolina.

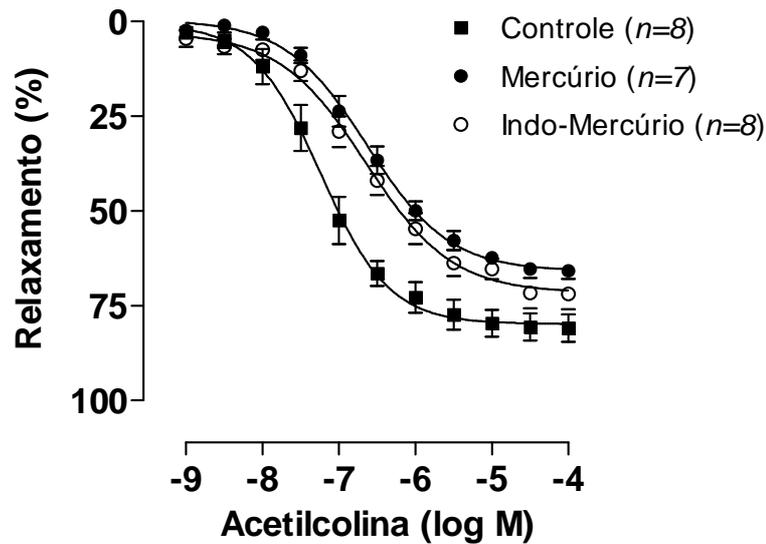


Figura 27: Efeito do inibidor não-específico da COX, indometacina (1 μ M) sobre a curva concentração-resposta à acetilcolina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos do grupo Mercúrio pré-contraídas com fenilefrina. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias): $P > 0,05$.

Tabela 7: Valores de pD_2 e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, % de contração) obtidos através das curvas concentração-resposta à DEA-NO e acetilcolina; efeito da Apocinina, SOD e Indometacina sobre a curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de artéria aorta de ratos dos grupos Controle e Mercúrio.

	pD_2		$R_{m\acute{a}x}$ (%)	
	Controle	Mercúrio	Controle	Mercúrio
DEA-NO	$-6,30 \pm 0,20$	$-6,44 \pm 0,14$	$97,5 \pm 3,0$	$103,0 \pm 1,7$
Acetilcolina	$-7,44 \pm 0,07$	$-7,30 \pm 0,14\#$	$88,6 \pm 1,3$	$74,9 \pm 2,5\#$
Apocinina				
Controle	$-7,26 \pm 0,13$	$-6,73 \pm 0,13\#$	$78,8 \pm 3,9$	$69,4 \pm 4,4\#$
Apocinina	$-6,90 \pm 0,66$	$-7,24 \pm 0,15^*$	$89,6 \pm 5,9$	$84,7 \pm 3,3^*$

SOD

Controle	-7,25 ± 0,13	-6,61 ± 0,15#	79,4 ± 3,9	64,7 ± 1,1#
SOD	-6,91 ± 0,13	-7,01 ± 0,18*	84,5 ± 3,7	74,5 ± 2,3*

Indometacina

Controle	-7,25 ± 0,13	-6,63 ± 0,11#	79,4 ± 3,9	65,6 ± 1,1#
Indometacina	-7,19 ± 0,14	-6,65 ± 0,08	79,6 ± 2,8	72,8 ± 4,2

Valores expressos em média ± erro padrão da média.

Teste t: *P<0,01 Curva Controle vs Curva + Fármaco. # P<0,01 grupo Controle vs grupo Mercúrio.

4.19 Análise das propriedades estruturais dos segmentos de aorta torácica

Através da utilização do microscópio confocal foram determinados os valores médios de espessura da camada média e o número de núcleos celulares na camada média em anéis de aorta de ratos dos grupos Controle e Mercúrio. Os animais do grupo Mercúrio apresentaram menor número de núcleos na camada média (Controle: 3625 ± 229 núcleos/mm² vs Mercúrio: 2863 ± 214 núcleos/mm²; Teste t – P<0,05), bem como, menor espessura da camada média (Controle: 111.5 ± 5.0 µm vs Mercúrio: 95.1 ± 3.6 µm; Teste t – P<0,05). Estes resultados sugerem que a exposição ao mercúrio, mesmo em baixas doses, é capaz de promover alterações estruturais em segmentos de artéria aorta torácica.

V DISCUSSÃO

O mercúrio é considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em humanos (Guallar *et al.*, 2002; Houston, 2007) e em experimentos animais a exposição aguda ao mercúrio é relacionada a alterações vasculares (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008a) e cardíacas (Massaroni *et al.*, 1992; Vassallo *et al.*, 1999), e a exposição crônica promove aumento da resistência vascular periférica e hipertensão arterial (Wakita, 1987; Carmignani *et al.*, 1992). O efeito tóxico exercido pelo mercúrio está relacionado ao aumento do estresse oxidativo (Valko *et al.*, 2006; Virtanen *et al.*, 2006), da peroxidação lipídica (Salonen *et al.*, 1995) e também por meio da redução da atividade de enzimas antioxidantes (Jie *et al.*, 2007), do NFkB (Dieguez-Acuña *et al.*, 2001) e de outras enzimas como a paraoxanase (Gonzalvo *et al.*, 1997). Além disso, alterações nos sistemas renina-angiotensina (Kozma *et al.*, 1996; Wiggers *et al.*, 2008a) e nos prostanoídes derivados da via da ciclooxigenase-2 (da Cunha *et al.*, 2000) também foram observados em trabalhos experimentais com exposição a este metal.

Embora seja crescente o número de trabalhos que estudam os efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular pouco se sabe sobre o efeito da exposição crônica a baixas doses de mercúrio sobre este sistema. A importância deste estudo reside no fato de ter sido desenvolvido um modelo experimental de exposição crônica a baixas doses de mercúrio que permitiu não só avaliar e tornar mais conhecido o efeito deste tipo de exposição sobre o sistema cardiovascular, em especial, sobre a artéria aorta, mas também, analisar se a toxicidade do mercúrio neste leito vascular relaciona-se com alterações endoteliais, produção de radicais livres, alteração da atividade de enzimas antioxidantes, do sistema renina-angiotensina e da via da ciclooxigenase-2. E sem dúvida conseguimos avançar no conhecimento dos efeitos e dos mecanismos pelos quais o mercúrio exerce efeito tóxico sobre o leito vascular de ratos.

Os resultados deste estudo podem ser divididos em dois grupos: 1) a criação de um modelo experimental animal onde o rato é submetido à exposição crônica e controlada a baixas doses de HgCl₂, tendo ao final da exposição concentração sanguínea semelhante à de humanos expostos a este metal; 2) a exposição crônica ao HgCl₂ promoveu alteração na reatividade vascular em artéria

aorta de ratos por induzir disfunção endotelial e alterações nas vias do óxido nítrico, ciclooxigenase-2, sistema renina-angiotensina e estados oxidante e antioxidante.

5.1 Modelo experimental

Um dos principais objetivos deste estudo foi o desenvolvimento de um modelo experimental que permitisse a avaliação dos efeitos cardiovasculares da exposição crônica a baixas doses de mercúrio.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos considera que concentrações sanguíneas de até 5,8 ng/ml são seguras e não provocam efeitos adversos (National Academy of Sciences, 2000; Rice, 2004; Stern, 2005). No modelo experimental desenvolvido neste estudo, ao final de trinta dias de exposição ao HgCl₂ os ratos apresentavam níveis sanguíneos de mercúrio de aproximadamente 8 ng/ml.

Considerando que trabalhadores expostos ao mercúrio no ambiente de trabalho (Gupta *et al.*, 1996) e indivíduos que vivem em áreas contaminadas apresentam níveis sanguíneos de mercúrio variando de 7 a 10 ng/ml (Chen *et al.*, 2005), e que a população adulta de Nova Iorque apresenta concentração sanguínea de mercúrio de 2,73 ng/ml enquanto a população consumidora regular de peixe apresenta concentração média de 5,65 ng/ml (McKelvey *et al.*, 2007), podemos afirmar que no modelo animal deste estudo a concentração de mercúrio encontrada no sangue é semelhante à observada em humanos expostos a este metal. O desenvolvimento deste modelo permitiu a realização de experimentos com o intuito de esclarecer os mecanismos pelos quais o mercúrio exerce seu efeito tóxico sobre o sistema cardiovascular. Além disso, é importante ressaltar que este é o primeiro modelo experimental animal de exposição controlada a baixas doses de mercúrio.

No decorrer do experimento foi analisada a ingestão de água e ração e também foi controlado o peso dos animais e foi observado que a exposição ao mercúrio não afeta a ingestão de água e ração nem interfere no peso dos animais.

5.2 Comportamento da pressão sistólica

A Hipertensão Arterial é um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Gu *et al.*, 2009) e como existem relatos de associação entre exposição ao mercúrio e desenvolvimento de Hipertensão Arterial em humanos (Torres *et al.*, 2000; Boffetta *et al.*, 2001; Kobal *et*

al., 2004; García Gómez *et al.*, 2007) e animais (Wakita, 1987; Carmignani *et al.*, 1992) foi investigado o efeito da exposição ao HgCl₂ sobre o comportamento da pressão arterial sistólica (PAS) neste modelo experimental.

Neste estudo não foram observadas alterações significantes na PAS durante todo o período de exposição ao mercúrio e isto pode estar relacionado ao fato de que neste modelo experimental os animais foram expostos durante somente 30 dias a concentrações muito baixas de HgCl₂, concentrações estas semelhantes às encontradas em humanos. A diferença nos resultados de outros estudos em que foi observado aumento da pressão sanguínea de ratos após exposição ao mercúrio pode dever-se a dose e ao tempo de exposição ao mercúrio utilizados. Foi observado aumento da pressão sanguínea em ratos expostos a altas concentrações de metilmercúrio (0,5 mg/kg/dia) e de HgCl₂ (50 µg/ml, 200 µg/ml) durante período de tempo que variava de 180 a 350 dias (Carmignani & Boscolo, 1984; Wakita *et al.*, 1987; Carmignani *et al.*, 1992). Em estudos de exposição aguda ao mercúrio foi observado que a exposição durante 20 minutos da artéria caudal de ratos a 5 µM de HgCl₂ promovia aumento da pressão média de perfusão (da Cunha *et al.*, 2000), também foi observado que a exposição aguda de ratos a 680 ng/Kg de HgCl₂, durante 1 hora, provocava aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, no entanto, este aumento não era notado na presença do Tempol, mimético da SOD, sugerindo participação das espécies reativas do oxigênio nesta resposta (Machado *et al.*, 2007). Este mesmo grupo observou que ratos expostos agudamente a dose de 5 mg/kg de HgCl₂ apresentavam queda da pressão arterial, disfunção ventricular bilateral e aumento da resistência vascular pulmonar. A provável redução do débito cardíaco secundário a disfunção ventricular e ao aumento da resistência vascular pulmonar parecem ter sido a causa da queda da pressão arterial (Rossoni *et al.*, 1999). Os resultados conflitantes provavelmente devem-se as baixas doses de mercúrio as quais os animais foram expostos e também a duração da exposição. Além disso, estes resultados parecem indicar que o efeito do mercúrio sobre a pressão arterial é dependente da dose.

Mesmo não tendo sido observadas alterações significantes nos níveis pressóricos, após exposição ao mercúrio, era necessário investigar o efeito deste tipo de exposição sobre o leito vascular, pois o mercúrio é associado ao maior risco de desenvolvimento de alterações cardiovasculares.

5.3 Efeito do mercúrio sobre a resposta vascular a fenilefrina

Inicialmente foi verificada a resposta a fenilefrina em artéria aorta de ratos dos grupos Controle e Mercúrio e foi observada resposta contrátil concentração-dependente que era maior nos animais expostos ao HgCl_2 . Vale ressaltar que a resposta ao cloreto de potássio (KCl) foi semelhante em ambos os grupos estudados.

Anteriormente da Cunha *et al.* (2000) observaram que a administração aguda de HgCl_2 em doses de 0,5 a 10 μM produzia vasoconstrição em artéria caudal de ratos. Resultado semelhante foi obtido por Wiggers *et al.* (2008a) que observaram que a exposição aguda a baixas doses de HgCl_2 (6 ηM) promoveu aumento da resposta contrátil e da sensibilidade a fenilefrina no leito vascular caudal de ratos, e também por Evans & Weingarten (1990) que notaram a ocorrência de vasoconstrição na artéria aorta de tubarões após exposição ao mercúrio. No entanto, Golpon *et al.* (2003) observaram que em segmentos do tronco pulmonar e da artéria aorta torácica de ratos, pré-contraídas com noradrenalina, o mercúrio provocava vasodilatação. O fato de o mercúrio provocar, em artéria aorta, o aumento da resposta contrátil a fenilefrina sem que seja observada alteração na resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl) indica que a exposição a este metal promove alteração na participação do endotélio vascular nestas respostas. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que a exposição ao mercúrio altere vias de sinalização celulares que participem da resposta a fenilefrina, ou mesmo, que nos ratos tratados com HgCl_2 exista um maior número de receptores α -adrenérgicos sobre os quais a fenilefrina atua.

Para melhor entendimento dos efeitos do mercúrio sobre o leito vascular foi investigado se este tipo de exposição alterava a participação do endotélio e do óxido nítrico no controle do tono vascular.

5.4 Participação do endotélio na resposta a fenilefrina e a acetilcolina

As células endoteliais desempenham importante papel no controle do tono vascular através da liberação de substâncias vasoativas como o óxido nítrico, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, endotelina, angiotensina II e prostanóides derivados da via da ciclooxigenase-2, entre outros (Vane & Botting, 1993; Vane *et al.*, 1994; Harrison, 1994). Estes mediadores endoteliais podem participar tanto nas respostas vasodilatadoras com na modulação das respostas vasoconstritoras. Já foi

descrito que a remoção do endotélio potencializa as respostas contráteis induzidas pela fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência (Briones *et al.*, 2000; Xavier *et al.*, 2004), artéria mesentérica superior (Rossoni *et al.*, 2002; Xavier *et al.*, 2004) e aorta (Rossoni *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2005), indicando modulação negativa destas respostas por fatores endoteliais vasodilatadores. Alteração na produção ou atividade de alguns destes mediadores poderia justificar o incremento nas respostas vasoconstritoras a fenilefrina observadas na aorta de ratos expostos ao HgCl₂. A possibilidade de ocorrência de alteração da função endotélio no modelo experimental desenvolvido neste estudo associado ao fato de que a disfunção endotelial é considerada um importante fator de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Melo *et al.*, 2004) fez com que fossem desenvolvidos experimentos para verificar a ocorrência de disfunção endotelial.

Como o termo disfunção endotelial é utilizado quando há prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio por redução da ação do óxido nítrico (Cai & Harrison, 2000), foram realizadas curvas concentração-resposta a acetilcolina, que promove relaxamento por via dependente do endotélio, em segmentos de artéria aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina. Foi observado que a acetilcolina provocou resposta vasodilatadora, concentração-dependente, nos segmentos arteriais de animais dos grupos Controle e Mercúrio, no entanto, o relaxamento foi menor nos animais do grupo Mercúrio, evidenciando que o mercúrio prejudicou o relaxamento dependente do endotélio.

Também foram realizados experimentos com DEA-NO, doador de óxido nítrico, para avaliar o relaxamento independente do endotélio e foi observado que o DEA-NO provocou resposta vasodilatadora semelhante nos segmentos arteriais dos animais de ambos grupos experimentais, sugerindo que a exposição crônica ao HgCl₂, nas doses estudadas, não altera o relaxamento independente do endotélio.

Estes resultados demonstram que a exposição durante 30 dias a baixas concentrações de HgCl₂ promoveu disfunção endotelial nos segmentos de artéria aorta. Considerando que o relaxamento induzido pela acetilcolina é mediado pelo óxido nítrico (Freitas *et al.*, 2003) pode-se sugerir que a disfunção endotelial promovida pela exposição ao mercúrio deve-se a alteração na produção ou na biodisponibilidade do óxido nítrico. No entanto, não se pode afastar completamente a possibilidade de que o mercúrio cause alteração de outros fatores derivados do endotélio que participam da resposta a acetilcolina. da Cunha *et al.* (2000) haviam

observado que a exposição da artéria caudal ao HgCl_2 durante 20 minutos a uma concentração de 5 μM reduzia a resposta vasodilatadora a acetilcolina em artéria caudal de ratos. Resultado semelhante foi observado por Golpon *et al.* (2003) em artéria aorta de ratos expostos a 1 μM de HgCl_2 por 20 minutos. Experimentos “*in vitro*” onde células endoteliais da artéria pulmonar de bovinos eram expostas a doses de 3 a 5 μM de íons mercúrio (Wolf & Baynes, 2007) e de 5 a 15 μM de metilmercúrio (Mazerik *et al.*, 2007) demonstram que o mercúrio exerce grande efeito citotóxico sobre o endotélio. A análise conjunta de todos estes achados fortalece a hipótese de que a exposição ao mercúrio promove importante prejuízo na função endotelial.

Apesar dos resultados indicarem que o modelo experimental animal deste estudo apresenta disfunção endotelial era necessário esclarecer por quais mecanismos esta alteração ocorria. Para isso foram desenvolvidos experimentos de reatividade vascular a fenilefrina em anéis de aorta em que o endotélio vascular foi removido mecanicamente. Foi observado que a remoção do endotélio provocou um desvio a esquerda da curva dose-resposta a fenilefrina nos segmentos de aorta dos animais dos grupos controle e mercúrio, sendo este desvio menor em animais do grupo mercúrio, sugerindo que a exposição ao mercúrio reduz a participação do endotélio na resposta contrátil a fenilefrina.

Considerando que a disfunção endotelial pode ser causada pela redução da síntese ou da biodisponibilidade do óxido nítrico (Triggle *et al.*, 2003) e que o óxido nítrico é um dos mais importantes produtos liberados pelo endotélio (Maturana *et al.*, 2007) foi realizada curva concentração-resposta a fenilefrina na presença de L-NAME, inibidor inespecífico da sintase do óxido nítrico. O resultado foi semelhante ao observado nos experimentos em que o endotélio foi removido. Anteriormente já havíamos observado resultados semelhantes após analisar o efeito da exposição aguda (6 ηM) ao HgCl_2 sobre a artéria caudal de ratos. Estes resultados sugerem que a exposição ao mercúrio além de promover disfunção endotelial reduz a modulação endotelial na resposta contrátil a fenilefrina por prejudicar a via do óxido nítrico.

A descoberta de que neste modelo experimental de exposição ao mercúrio existe prejuízo da via do óxido nítrico associado ao fato de que Kishimoto *et al.* (1995) haviam observado que em células endoteliais do cordão umbilical de humanos o metilmercúrio inibe a produção de óxido nítrico por exercer efeito tóxico

sobre a sintase do óxido nítrico (NOS) e que Yanagisawa *et al.* (1998) observaram que o HgCl₂ provocou redução da expressão da eNOS nas células justaglomerulares das arteríolas renais aferentes, tornou necessária a verificação da expressão protéica da eNOS na aorta dos ratos deste estudo e foi observado que a expressão da eNOS não foi alterada pela exposição ao mercúrio. Este resultado apesar de não esclarecer completamente o mecanismo pelo qual o mercúrio promove a disfunção endotelial neste modelo experimental, permite afirmar que esta disfunção não ocorre por redução da expressão protéica da eNOS. No entanto, como em alguns modelos animais que cursam com disfunção endotelial a expressão da eNOS encontra-se aumentada (Kanazawa *et al.*, 1996), não pode ser descartada a possibilidade de que neste modelo experimental de exposição crônica ao HgCl₂ a atividade da eNOS esteja reduzida ou ainda que a mesma esteja desacoplada, o que resultaria em menor produção de óxido nítrico e maior produção de ânion superóxido.

O desacoplamento da eNOS foi observado em pacientes com disfunção endotelial devido ao tabagismo (Heitzer *et al.*, 2000a) e a doenças como diabetes mellitus (Heitzer *et al.*, 2000b) e hipercolesterolemia (Stroes *et al.*, 1997). Existem fortes indícios de que o desacoplamento desta enzima ocorra quando os níveis de tetrahydrobiopterina (BH₄) estão reduzidos (Kawashima & Yokoyama, 2004; Fostermann & Munzel, 2006) e que o aumento do estresse oxidativo promova depleção de BH₄ (Milstien & Katusic, 1999). Como neste modelo experimental a exposição crônica ao HgCl₂ provocou aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial sem alterar a expressão da eNOS, é possível que disfunção endotelial deste modelo animal, mesmo que parcialmente, possa estar relacionada ao desacoplamento da eNOS.

5.5 Participação das espécies reativas do oxigênio na reatividade vascular

A disfunção endotelial pode estar relacionada à menor produção ou a maior degradação do óxido nítrico promovida pelo estresse oxidativo (Landmesser *et al.*, 2007) que é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a ação dos sistemas antioxidantes. Tem sido sugerido que o estresse oxidativo é responsável pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e pelo desenvolvimento de disfunção endotelial no leito vascular renal (Chade *et al.*, 2004), coronariano (Lavi *et al.*, 2008) e em enfermidades cardiovasculares. A associação entre disfunção endotelial e estresse oxidativo já foi observada em situações

patológicas como hipertensão, hipercolesterolemia (Drexler, 1997; Gao & Mann, 2009), resistência a insulina (Vincent *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006) e deficiência de estrogênio (Koh, 2002). Como é sabido que a exposição ao mercúrio, tanto em animais como em humanos, promove a geração de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente aumenta o estresse oxidativo (Miller & Woods, 1993; Huang *et al.*, 1996; Mahaboob *et al.*, 2001; Reus *et al.*, 2003; Kim & Sharma, 2004; Chen *et al.*, 2005). Neste estudo foram desenvolvidos experimentos para investigar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de disfunção endotelial neste modelo animal de exposição crônica ao HgCl₂.

Para tanto, foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina e a acetilcolina na presença de SOD, “scavenger” do ânion superóxido, e da apocinina, inibidor da NADPH oxidase. Foi observado que na presença destes dois fármacos a fenilefrina provocou resposta contrátil concentração-dependente, no entanto, a SOD e a apocinina reduziram a resposta contrátil somente em segmentos de aorta de animais que foram expostos ao HgCl₂. Além disso, a SOD e a apocinina restauraram o prejuízo do relaxamento induzido pela acetilcolina nos segmentos de aorta dos ratos do grupo mercúrio.

A NADPHoxidase é uma das principais fontes de ânion superóxido (Diatchuk *et al.*, 1997), é constituída por duas subunidades (p22phox e gp91phox) ligadas a membrana e por três subunidades citosólicas (p67phox, p47phox e p40phox), e tem sua ação inibida pela apocinina que impede a união da subunidade citosólica, p47phox, com a membrana e conseqüentemente reduz a geração de ânion superóxido (Meyer *et al.*, 1999; Stefanska & Pawliczak, 2008). A SOD dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e em uma molécula de oxigênio e reduz os efeitos tóxicos do ânion superóxido (Faraci & Didion, 2004). Os resultados dos experimentos com a apocinina e a SOD exógena demonstram que ambos melhoram a função endotelial dos ratos expostos ao mercúrio e isso dá subsídios para sugerir que a disfunção endotelial presente neste modelo experimental de exposição ao mercúrio deve-se provavelmente a maior produção espécies reativas de oxigênio, em especial a maior produção de ânion superóxido. No entanto, como a apocinina foi mais efetiva em restaurar a resposta vasodilatadora a acetilcolina que a SOD é possível que outras espécies reativas de oxigênio, que não o ânion superóxido, sejam parcialmente responsáveis pelo prejuízo na resposta vasodilatadora a acetilcolina nos ratos expostos ao mercúrio. Como a SOD exógena, que converte o

ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, não restaura completamente a resposta vasodilatadora a acetilcolina é possível que o peróxido de hidrogênio seja uma das espécies reativas do oxigênio que prejudica a resposta vasodilatadora nas artérias dos ratos do grupo mercúrio. Em experimentos de reatividade vascular em artéria caudal de ratos expostos agudamente ao mercúrio desenvolvidos por da Cunha *et al.* (2000) e Wiggers *et al.* (2008a) foram observados resultados semelhantes que indicavam a participação das espécies reativas do oxigênio no aumento da resposta contrátil a fenilefrina.

Outro importante achado deste estudo foi a observação, por meio de microscopia confocal, de que os segmentos de artéria aorta dos ratos expostos ao mercúrio apresentavam maior produção basal de ânion superóxido o que reforça a hipótese de que neste modelo animal a exposição ao mercúrio provoca aumento do estresse oxidativo e por ação das espécies reativas do oxigênio promove a disfunção endotelial. As espécies reativas do oxigênio, em especial o ânion superóxido, promovem a peroxidação lipídica (Griendling & Fitzgerald, 2003) e uma das formas de se verificar o estresse oxidativo é através da medida do malondialdeído plasmático. Foi demonstrado que o neste modelo experimental os animais expostos ao mercúrio apresentavam níveis aumentados de malondialdeído plasmático (Wiggers *et al.*, 2008b), corroborando a hipótese de que este tipo de exposição ao mercúrio além de aumentar a produção de ânion superóxido provoca aumento do estresse oxidativo.

O aumento do estresse oxidativo além de estar associado a maior produção de espécies reativas do oxigênio também pode ocorrer por redução da atividade antioxidante (Lerman *et al.*, 2001; Rodriguez-Porcel, 2001; Lee & Wei, 2007). Wiggers *et al.* (2008b) demonstraram que neste modelo experimental de exposição ao mercúrio o estado antioxidante total (TAS) plasmático encontrava-se aumentado ao final do tratamento indicando que neste modelo experimental o estresse oxidativo está associado ao aumento da produção de radicais livres sem que tenha ocorrido redução do estado antioxidante. Em realidade o estado antioxidante encontra-se aumentado e pode ser que isso se deva ao desenvolvimento de algum mecanismo compensatório.

Uma possibilidade para explicar o incremento da produção de ânion superóxido na aorta dos animais expostos ao mercúrio é que a expressão das enzimas que detoxificam este ânion estejam alteradas. Para isso, foi realizado

Western Blot para verificar a expressão protéica da SOD nos segmentos de artéria aorta dos animais dos grupos controle e mercúrio.

A SOD possui três isoformas distintas que catalizam a mesma reação de dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio. As três isoformas da SOD são: CuZn-SOD que está localizada no citosol, a Mn-SOD localizada na mitocôndria e a isoforma EC-SOD que encontra-se no espaço extracelular (Faraci & Didion, 2004). Neste estudo foi analisada a expressão protéica das três isoformas e foi notado que na artéria aorta dos ratos dos grupos controle e mercúrio a expressão protéica das isoformas CuZn-SOD e Mn-SOD são semelhantes. No entanto, há evidente aumento da expressão protéica da isoforma EC-SOD nos segmentos de artéria aorta dos ratos do grupo mercúrio.

A EC-SOD localiza-se na parede vascular entre o endotélio e o músculo liso vascular (Stralin *et al.*, 1995; Fukai *et al.*, 2002), é produzida principalmente pelo músculo liso vascular (Zelko *et al.*, 2002) e pode ter a expressão alterada em condições patológicas como hipertensão, diabetes e aterosclerose, e também por diferentes estímulos produzidos pelo exercício, angiotensina II, óxido nítrico (Fukai *et al.*, 1999, 2002, Davis *et al.*, 2003). Passerini *et al.* (2004) observaram que células endoteliais da artéria aorta de porco, localizadas em região de fluxo sanguíneo turbulento, apresentam “*upregulation*” do sistema antioxidante por aumento da expressão de proteínas antioxidantes como a EC-SOD. Apesar do modelo animal de exposição crônica ao mercúrio desenvolvido neste estudo não apresentar hipertensão existem sinais claros de disfunção endotelial que é associada a alteração do fluxo sanguíneo podendo este ser um dos mecanismos causadores da alteração na expressão da EC-SOD. Além disso, será discutido a seguir o fato da exposição ao mercúrio estar associada a maior atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina neste modelo experimental, o que nos permite hipotetizar que esta ativação promova maior formação de angiotensina II e esta por sua vez possa interferir na expressão da isoforma extracelular da SOD. Outra possibilidade que não pode ser descartada é a de que mecanismos compensatórios, como a “*upregulation*” da EC-SOD possam ser desenvolvidos devido a maior produção de ânion superóxido provocada pela exposição ao mercúrio.

Outros autores tem demonstrado aumento das defesas antioxidantes após exposição ao mercúrio. Assim, Girardi & Elias (1995) ao expor rins de rato ao HgCl₂ notaram aumento da atividade de enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e

catalase. Também foi descrito que a exposição de camundongos ao HgCl_2 (doses em miligramas/Kg) durante 14 dias aumentava o estresse oxidativo e a atividade de enzimas antioxidantes no fígado (Hussain *et al.*, 1999) e Bando *et al.* (2005) notaram aumento da atividade da Mn-SOD, CuZn-SOD, glutathiona peroxidase e catalase no fígado de ratos expostos ao HgCl_2 . Chen *et al.* (2005) foram um dos primeiros a observar que trabalhadores expostos ao mercúrio além de apresentar aumento do estresse oxidativo apresentavam importante aumento da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona e SOD.

O mecanismo pelo qual o aumento do estresse oxidativo provoca maior atividade das enzimas antioxidantes não foi investigado neste estudo. No entanto, Wolf & Baynes (2007), após realizar experimentos em células endoteliais da artéria pulmonar de bovinos, encontraram dados que sugerem que esta associação pode ser dose-dependente, pois notaram que enquanto a exposição a altas concentrações de mercúrio ($> 3\text{-}5 \mu\text{M}$) inibe a atividade de enzimas do grupo tiol e induz a depleção de glutathiona, a exposição a concentrações menores de mercúrio ($1\text{-}2 \mu\text{M}$) provoca aumento da atividade das enzimas tiol e também da glutathiona. É possível então que na exposição ao mercúrio as enzimas que compõem o sistema antioxidante sejam ativadas como um mecanismo de proteção das células contra o aumento do estresse oxidativo.

5.6 Participação da COX-2 e dos prostanóides derivados desta via na resposta vascular a fenilefrina

O presente estudo demonstra que a exposição crônica a baixas doses de mercúrio promoveu disfunção endotelial. Na disfunção endotelial as células endoteliais sofrem agressões que podem alterar a expressão ou atividade das substâncias produzidas e liberadas pelo endotélio (Goligorsky, 2005). Os prostanóides derivados da via da ciclooxygenase são algumas das substâncias liberadas pelas células endoteliais que desempenham importante função na regulação do tono vascular e participam das respostas à agressão vascular (Alvarez *et al.*, 2005, 2007). No capítulo anterior desta discussão demonstramos que a exposição aguda ao HgCl_2 provoca aumento da resposta contrátil a fenilefrina e esta resposta parece estar associada ao aumento da produção de espécies reativas do oxigênio que podem reagir com o NO diminuindo sua biodisponibilidade. Outra possibilidade para explicar o aumento na resposta contrátil a fenilefrina após a

exposição ao mercúrio é que ocorra aumento na participação dos prostanóides contráteis derivados da via da ciclooxigenase nestas respostas.

Para analisar a participação dos prostanóides contráteis na resposta a fenilefrina nos ratos dos grupos controle e mercúrio, foram desenvolvidos experimentos de reatividade vascular onde foi utilizada a Indometacina, inibidor inespecífico da ciclooxigenase. Foi notado que a Indometacina provocou redução da resposta contrátil a fenilefrina, que foi maior nas artérias de animais expostos ao mercúrio, sugerindo participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase na maior resposta a fenilefrina nos segmentos de aorta dos animais tratados com mercúrio. Estes resultados foram semelhantes aos observados por da Cunha *et al.* (2000) e Wiggers *et al.* (2008a). Vale ressaltar que estes autores realizaram experimentos na artéria caudal de ratos e a exposição ao metal tinha duração de 20 a 60 minutos. Além disso, somente o leito vascular caudal era exposto ao mercúrio. No presente estudo os animais foram expostos ao mercúrio durante 30 dias e apesar de serem analisados resultados de experimentos de reatividade vascular deve ser considerado que enquanto nos experimentos agudos a exposição ao mercúrio restringiu-se somente ao leito vascular, neste modelo crônico todos os sistemas foram expostos a este metal.

Tem sido reportada a expressão vascular da COX-2 em processos patológicos que cursam com processo inflamatório e também na aterosclerose e hipertensão (Adeagbo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005; Antman *et al.*, 2005). Os prostanóides derivados da COX-2 contribuem para a disfunção endotelial associada a hipertensão e ao envelhecimento dos animais (Widlansky *et al.*, 2003; Blanco-Rivero *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2009). Além disso, estes prostanóides contribuem sobremaneira para a resposta vasoconstritora observada em ratos hipertensos (Zerrouk *et al.*, 1998; Adeagbo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005). Nos últimos anos, tem se tornado evidente que a produção de prostanóides pela COX-2 está envolvida na modulação da resposta vascular em condições fisiológicas (Adeagbo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005; Antman *et al.*, 2005) e tem sido descrito que esta isoforma da COX é expressa em células endoteliais e adventíciais de artérias não estimuladas (Tabernerero *et al.*, 2003; Briones *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005). Em concordância, no presente estudo foi observado que a COX-2 estava localizada essencialmente nas células da adventícia e do endotélio. Para investigar a participação dos prostanóides derivados da COX-2 na resposta vascular a fenilefrina foram realizadas

curvas concentração-resposta a fenilefrina em segmentos de aorta incubados com inibidor específico da COX-2, o NS 398. Foi notado que na presença do NS 398 ocorreu redução da resposta contrátil a fenilefrina somente na aorta dos animais do grupo mercúrio, indicando que os prostanóides contráteis que participam da maior resposta a fenilefrina nos animais do grupo mercúrio são derivados da via da COX-2.

No entanto, vários prostanóides contráteis são derivados da via da COX-2 e era importante descobrir quais destes prostanóides participavam desta resposta aumentada a fenilefrina nos ratos do grupo mercúrio. Considerando que 5 diferentes prostanóides (PGE_2 , PGI_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , TXA_2) são derivados da via da COX-2, foram desenvolvidos experimentos de reatividade vascular onde artérias foram incubadas com SQ 29,548, antagonista do receptor TP, ou SC 19,220, antagonista do receptor EP1, ou com Furegrelato, inibidor da sintase do TXA_2 . Todos estes experimentos apresentaram resultado semelhante aos obtidos com NS 398, sendo observada redução da resposta a fenilefrina somente nos segmentos de aorta dos ratos do grupo mercúrio.

Considerando que os receptores TP e EP₁ são estimulados pelos prostanóides TXA_2 e PGE_2 e o Furegrelato inibe a sintase específica do TXA_2 estes resultados demonstram que os mecanismos pelos quais o mercúrio promove alteração vascular neste modelo animal envolve a participação do TXA_2 e da PGE_2 . Para confirmar estes achados foi realizada medida da produção / liberação dos prostanóides, TXA_2 e PGE_2 nos segmentos de artéria aorta após curva concentração-resposta a fenilefrina e foi observado que a produção destes prostanóides foi muito maior nos segmentos arteriais de ratos do grupo mercúrio. A certeza de que estes prostanóides eram derivados da via da COX-2 foi obtida quando o aumento na produção destes prostanóides foi impedido pelo inibidor específico da COX-2, NS 398.

MacFarlane (1980) já havia observado que a exposição ao metilmercúrio estava relacionada ao aumento da síntese de PGE_2 . Em outros experimentos “*in vitro*” foi observado que em células mesangiais e do epitélio glomerular a exposição ao $HgCl_2$ aumentava de 2 até 8 vezes a síntese de PGE_2 (Sraer *et al.*, 1982). Também foi observado que no coração o metilmercúrio promove aumento da síntese de PGI_2 e TXA_2 , enquanto na artéria aorta estimula somente a síntese da PGI_2 (Ally *et al.*, 1993). No entanto, não foram encontradas publicações que tivessem relacionado a exposição ao mercúrio com maior participação de prostanóides

derivados da COX-2 na resposta vascular a fenilefrina. Entretanto, em modelo animal de hipertensão, com ratos espontaneamente hipertensos (SHR), que cursa com disfunção endotelial e aumento da reatividade vascular foi notado aumento da resposta contrátil a fenilefrina em segmentos de artéria aorta e maior participação dos prostanóides derivados da via da COX-2 nesta resposta (Alvarez *et al.*, 2005, 2007). Resultados similares foram obtidos com outros modelos de hipertensão (Adeagbo *et al.*, 2005).

Depois de descoberta a participação dos prostanóides derivados da via da COX-2, TXA₂ e PGE₂, na maior resposta contrátil a fenilefrina neste modelo experimental de exposição ao mercúrio, para melhor compreensão do mecanismo pelo qual o mercúrio promovia alteração deste sistema, era necessário descobrir se esta alteração devia-se a alteração na expressão ou na atividade da COX-2. A realização do PCR-RT evidenciou que o RNAm para expressão da COX-2 é maior em segmentos de aorta dos animais expostos ao mercúrio e ajudou a esclarecer o mecanismo pelo qual este metal altera a função vascular.

Os resultados discutidos acima demonstram que a alteração vascular observada neste modelo experimental deve-se, mesmo que parcialmente, a maior expressão da COX-2, ao aumento na produção dos prostanóides TXA₂ e PGE₂, e na maior participação destes na resposta vascular a fenilefrina.

Apesar de não ter sido encontrada na literatura qualquer referência sobre o efeito da exposição ao mercúrio na expressão da COX-2, é importante notar que em indivíduos portadores de diabetes e em modelos experimentais de diabetes e hipertensão a alteração da COX-2 tem sido relatada. Em modelos de hipertensão o aumento da expressão da COX-2 ocorre tanto em condições basais (Briones *et al.*, 2002; Adeagbo *et al.*, 2005 Álvarez *et al.*, 2005) quanto após estímulo com agonista vasoconstritor (Alvarez *et al.*, 2007). Resultado semelhante foi observado em indivíduos portadores de diabetes que apresentaram maior quantidade de COX-2 em arteríolas coronárias (Szerafin *et al.*, 2006). Em modelo experimental de diabetes também foi observado aumento na expressão da COX-2 em artéria aorta (Guo *et al.*, 2005). Nos modelos experimentais de hipertensão e diabetes tem sido notado que a hiperreatividade vascular parece dever-se a maior produção de prostanóides contráteis derivados da via da COX-2 (Guo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2007).

A observação de que as alterações presentes neste modelo experimental de exposição crônica a baixas doses de mercúrio são semelhantes às alterações

encontradas em modelos de doenças como hipertensão e diabetes, consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, servem para reforçar ainda mais a hipótese de que o mercúrio deve ser considerado fator de risco cardiovascular.

5.7 Participação do sistema renina-angiotensina na resposta a fenilefrina

O fato de anteriormente termos descrito que a exposição ao mercúrio provocava ativação da angiotensina II local já era suficiente para justificar a avaliação da participação do sistema renina-angiotensina neste modelo experimental de exposição crônica ao mercúrio. No entanto, foi observado que a angiotensina II induz a expressão de COX-2 (Alvarez *et al.*, 2007; Beltrán *et al.*, 2009), aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio (Wolf, 2000; Beltrán *et al.*, 2009), reduz a biodisponibilidade do NO e provoca disfunção endotelial (Doughan *et al.*, 2008), ou seja, promove alterações semelhantes às observadas no modelo animal deste estudo. Isto tornou essencial a análise do comportamento do sistema renina-angiotensina neste modelo animal.

Foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina na presença do bloqueador dos receptores AT₁, Losartan, que promoveu redução da resposta contrátil a fenilefrina somente em segmentos de aorta dos ratos expostos ao mercúrio sugerindo participação do sistema renina-angiotensina na maior resposta contrátil a fenilefrina. Além disso, foi notado que esta resposta não se devia ao aumento do número de receptores AT₁, pois a expressão deste receptor não foi alterada pela exposição ao mercúrio. Estes resultados não esclarecem se o aumento da participação do sistema renina-angiotensina é local ou sistêmico, mas a observação de que os níveis plasmáticos da ECA eram maiores nos ratos expostos ao mercúrio permite sugerir que a exposição ao mercúrio promoveu maior participação local e sistêmica do sistema renina-angiotensina.

A associação da exposição ao mercúrio e maior participação do sistema renina-angiotensina havia sido observada em experimentos “*in vitro*” onde a exposição ao mercúrio provocou aumento da liberação de renina pelas células justaglomerulares sendo este efeito concentração-dependente (Kozma *et al.*, 1996) e aumento da atividade da angiotensina II no sangue (Wiggers *et al.*, 2008a).

Neste modelo experimental a exposição crônica ao HgCl₂ além de aumentar a atividade do sistema renina-angiotensina também promove aumento da expressão

da COX-2, maior produção de espécies reativas de oxigênio, hiperreatividade vascular à fenilefrina e disfunção endotelial. Resultados semelhantes foram provocados pela angiotensina II que em células endoteliais de bovinos provocou disfunção endotelial por aumentar produção de espécies reativas de oxigênio e reduzir a biodisponibilidade do óxido nítrico (Doughan *et al.*, 2008) e induziu a expressão da COX-2 em células musculares lisas e em fibroblastos da aorta de ratos (Alvarez *et al.*, 2007; Beltrán *et al.*, 2009). Além disso, já tinha sido observado que em camundongos o tratamento com angiotensina II induziu a expressão da COX-2 via ativação de receptores AT₁ (Tamarat *et al.*, 2002) e que a utilização do inibidor da ECA provocou melhora da disfunção endotelial de ratos mais velhos por inibir produtos derivados da COX (Mukai *et al.*, 2002).

Considerando que neste modelo experimental a apocinina reduziu a disfunção endotelial e a hiperreatividade a fenilefrina, e que as ações da angiotensina II são frequentemente mediadas pela maior ativação da NADPHoxidase (Doughan *et al.*, 2008), é possível hipotetizar sobre a possibilidade de que a maior ativação do sistema renina-angiotensina seja o mecanismo principal pelo qual a exposição ao mercúrio promoveu as alterações observadas neste modelo experimental. Os experimentos desenvolvidos neste estudo não permitem que esta hipótese seja confirmada, no entanto, tornam-na factível e evidenciam a necessidade de desenvolvimento de experimentos para testá-la.

Neste estudo também foi notado que a exposição ao mercúrio promove aumento da expressão protéica da EC-SOD. Anteriormente havia sido observado que a infusão de angiotensina II durante 7 dias provocava aumento da expressão protéica da EC-SOD na artéria aorta de camundongos, sem alterar a expressão da CuZn-SOD e da Mn-SOD, e este efeito foi anulado pelo tratamento com Losartan, antagonista do receptor AT₁ (Fukai *et al.*, 1999) Considerando que neste modelo experimental foi observado que a exposição ao mercúrio aumenta a atividade do sistema renina-angiotensina, não pode ser descartada a possibilidade de que a maior expressão da EC-SOD esteja associada a maior ativação do sistema renina-angiotensina.

5.8 Efeito da exposição ao mercúrio sobre a estrutura da artéria

A observação de que neste modelo animal a exposição ao HgCl₂ promoveu importantes alterações funcionais na artéria aorta tornou necessário investigar se a

estrutura da artéria também sofria algum tipo de alteração. Através da imunohistoquímica com microscopia confocal foi observado que os segmentos arteriais dos ratos expostos ao mercúrio apresentavam redução da espessura da parede e também menor número de células. Este resultado sugere que esta alteração está relacionada ao efeito tóxico do mercúrio que provoca apoptose.

Já foi observado em experimentos “*in vitro*” (Dieguez-Acuña *et al.*, 2004; Eichler *et al.*, 2006; Belyaeva *et al.*, 2008) e “*in vivo*” (Fouda *et al.*, 2008) que o mercúrio promove apoptose. Dentre os mecanismos tóxicos através dos quais o mercúrio promove apoptose destacam-se: a redução da ativação do NF-κB aumentando a sensibilidade das células a estímulos apoptóticos induzidos por outros agentes (Dieguez-Acuña *et al.*, 2004), maior ativação da caspase-8 que participa da via de sinalização da apoptose (Eichler *et al.*, 2006) e a maior produção de espécies reativas do oxigênio (Fouda *et al.*, 2008).

Apesar de neste estudo ter sido observada alteração estrutural das artérias de ratos expostos ao HgCl₂ não foram desenvolvidos experimentos na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis por estas alterações. No entanto, considerando que neste modelo de exposição ao mercúrio foi notada maior produção de ânion superóxido e que estes podem provocar apoptose, não podemos descartar a possibilidade de que esta seja uma das vias pelas quais o mercúrio promoveu esta alteração vascular.

5.9 Atualidades e perspectivas futuras

A importância deste estudo reside no fato de que os resultados encontrados permitem compreender melhor os mecanismos pelos quais o mercúrio exerce efeito tóxico sobre o sistema cardiovascular. Além disso, deve ser ressaltada a importância do modelo experimental utilizado, pois pela primeira vez foi criado um modelo de exposição crônica controlada a baixas doses de mercúrio, onde ao final da exposição foi realizada medida dos níveis de mercúrio no sangue. No entanto, mais importante do que conhecer os níveis de mercúrio no sangue do animal foi observar que estes níveis eram compatíveis com os encontrados em humanos que vivem expostos ao mercúrio, seja pela exposição ocupacional ou por consumir peixe contaminado. Isto permite com que afirmemos que este é, até o momento, o melhor modelo experimental de exposição crônica ao mercúrio.

Com este estudo demonstrou-se pela primeira vez que a exposição crônica a baixas doses de HgCl_2 provocou disfunção endotelial e alteração na reatividade e na estrutura da artéria aorta. Além disso, demonstrou que estas alterações podem ser atribuídas, ainda que parcialmente, ao aumento do estresse oxidativo, redução da biodisponibilidade do NO, maior ativação da via da COX-2 com conseqüente aumento na produção dos prostanóides vasoconstritores PGE_2 e TXA_2 e maior ativação do sistema renina-angiotensina.

De fato os resultados deste estudo ajudaram a esclarecer os efeitos tóxicos e os mecanismos através dos quais o mercúrio atua sobre o sistema cardiovascular. Além disso, estes resultados geraram hipóteses que precisam ser confirmadas posteriormente. Considerando que uma linha de pesquisa dura anos, ou mesmo toda uma vida, este talvez seja mais um indicativo de que este trabalho cumpriu o objetivo de não somente gerar informações, mas também o de servir como fonte de idéias para pesquisas futuras.

Não há dúvida que o desenvolvimento de experimentos que permitam responder as várias hipóteses levantadas no decorrer deste estudo dará subsídios para que em um futuro próximo os efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular possam ser não só conhecidos, mas também evitados e tratados.

Infelizmente desde a revolução industrial a atividade humana tem provocado cada vez mais contaminações ambientais que tem exposto os homens a vários tipos de agentes tóxicos, dentre eles o mercúrio. A exposição humana ao mercúrio, seja ela ocupacional, por uso de vacinas ou de restaurações com amálgama ou mesmo pelo consumo de alimento contaminado parece ser muito comum e ainda não são bem conhecidas as conseqüências sobre a saúde.

Os resultados deste estudo tornam evidente que a exposição crônica a baixas doses de mercúrio afeta sobremaneira o leito vascular alterando a sua função e estrutura. O impacto destas alterações pode ser comparado ao promovido por outros fatores de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão. Ainda não se sabe se a exposição ao mercúrio pode potencializar o efeito de outros fatores de risco cardiovascular, mas certamente o mercúrio deve ser considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

VI CONCLUSÕES

O modelo experimental animal desenvolvido neste estudo apresentou, ao final do tratamento, baixas concentrações sanguíneas de mercúrio, concentrações estas semelhantes às apresentadas por humanos expostos a este metal;

A exposição crônica a baixas concentrações de mercúrio não promoveu alteração dos níveis de pressão arterial sistólica, mas alterou a reatividade vascular promovendo aumento da resposta contrátil a fenilefrina e disfunção endotelial em segmentos de aorta;

A disfunção endotelial observada neste modelo experimental deve-se, mesmo que parcialmente, a redução da biodisponibilidade do NO causada pelo aumento da produção das espécies reativas de oxigênio produzidos pela NADPHoxidase;

O aumento da resposta contrátil a fenilefrina está associado a menor modulação do endotélio nesta resposta e a maior participação do ânion superóxido, dos prostanóides contráteis derivados da COX-2 (PGE₂ e TXA₂) e do sistema renina-angiotensina nesta resposta;

A exposição crônica ao mercúrio provocou aumento do estresse oxidativo, maior produção de ânion superóxido e aumento da expressão protéica da isoforma extracelular da SOD (EC-SOD);

O incremento na expressão gênica da COX-2 e a maior produção dos prostanóides contráteis derivados da COX-2 (PGE₂ e TXA₂) foi observado após exposição ao mercúrio;

Neste modelo experimental foi notado que a exposição ao mercúrio aumentou a atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina (ECA);

Redução do número de células e redução da parede da aorta foram as alterações da estrutura vascular observadas nos animais após exposição ao mercúrio;

Em conclusão, estes resultados demonstram que a exposição crônica ao HgCl₂ promove alterações vasculares semelhantes às produzidas por outros fatores de risco cardiovascular como hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão. E reforçam a hipótese de que o mercúrio deve ser considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedi-Valugerdi, M.** Mercury and silver induce B cell activation and anti-nucleolar autoantibody production in outbred mouse stocks: are environmental factors more important than the susceptibility genes in connection with autoimmunity? *Clinical and Experimental Immunology* 115: 117-1124, 2008.
- Adeagbo, AS; Zhang, X; Patel, D; Joshua, IG; Wang, Y; Sun, X; Igbo, IN; Oriowo, MA.** Cyclo-oxygenase-2 endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens* 115: 1025-1036, 2005.
- Ahlgvist, M; Bengtsson, C; Lapidus, L; Gergdahl, IA; Schutz, A.** Serum mercury concentration in relation to survival, symptoms, and disease: results from the prospective population study of women in Gothenburg, Sweden. *Acta Odontol Scand* 57: 168-74, 1999.
- Akagi, H; Malm, O; Kinj, Y; Harada, M; Branches, FGP; Pfeiffer, WC; Kato, H.** Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. *The Science of the Total Environment* 157: 85-95, 1995.
- Alfranca, A; Iñiguez, MA; Fresno, M; Redondo, JM.** Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: Role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 70: 446-456, 2006.
- Ally, A; Buist, R; Mills, P; Reuhl, K.** Effects of methylmercury and trimethyltin on cardiac platelet, and aorta eicosanoid biosynthesis and platelet serotonin release. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 555-563, 1993.
- Alvares, AP; Leigh, S; Cohn, J; Kappas, A.** Lead and methyl mercury effects of acute exposure on cytochrome P-450 and the mixed function oxidase system in the liver. *The J Exp Med.* 135: 1406-1409, 1972.
- Alvarez, Y; Briones, AM; Balfagón, G; Alonso, MJ. Salaices, M.** Hipertensión increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens* 23(4): 767-777, 2005.
- Alvarez, Y; Pérez-Giron, JV; Herranz, R; Briones, AM; García-Redondo, A; Beltrán, A; Alonso, MJ; Salaices, M.** Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 321(1): 381-388, 2007.

- American Academy of Pediatrics**, Committee on Infectious Diseases and Committee on Environmental Health. Thimerosal in vaccines: an interim report to clinicians. *Pediatrics* 104 (3 pt 1):570–574, 1999.
- Anderson, T.** Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 34: 631-638, 1999.
- Andrew, PJ; Mayer, B.** Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-531, 1999.
- Andrews, NP; Hussain, M; Dakak, N; Ouyyumi, AA.** Platelet inhibitory effect of nitric oxide in the human coronary circulation: impact of endothelial dysfunction. *JACC* 37: 510-516, 2001.
- Andrews, N; Miller, E; Grant, A; Stowe, J.** A Retrospective Cohort Study in the United Kingdom Does Not Support a Causal Association. *Pediatrics* 114: 584-591, 2004.
- Antman, EM; DeMets, D; Loscalzo, J.** Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 112: 759-770, 2005.
- Appleton, JD; Williams, TM; Breward, N; Apostol, A; Miguel, J; Miranda, C.** Mercury contamination associated with artisanal gold mining on the island of Mindanao the Philippines. *Sci Total Environ* 228(2-3): 95-109, 1999.
- Arthur, JR.** The glutathione peroxidases, *Cell Mol Life Sci* 57: 1825-1835, 2000.
- Aschner, M; Yao, CP; Allen, JW, Tan, KH.** Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem In* 37: 199-206, 2000.
- Azevedo, F. A de.** Toxicologia do Mercúrio. São Carlos: RiMa, 2003.
- Bagenstose, LM; Salgame, P; Monestier, M.** IL-12 down-regulates autoantibody production in mercury-induced autoimmunity *J Immunol* 160, 1612–1617, 1998.
- Bagenstose, LM; Salgame, P; Monestier, M.** Murine mercury-induced autoimmunity: a model of chemically related autoimmunity in humans. *Immunol Res* 20: 67-68, 1999.
- Bakir, F; Damluji, SF; Amin-Zaqi, L; Murtadha, N; Khalidi, A; al-Rawi, NY; Tikriti, S; Dahahir, HI; Clarkson, TW; Smith, JC; Doherty, RA.** Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181: 230-241, 1973.
- Ball LK, Ball R, Pratt RD.** An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. *Pediatrics* 107(5):1147–1154, 2001.

- Bando, I; Reus, MI; Andrés, D; Cascales, M.** Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. *J Biochem Mol Toxicol* 19: 154–161, 2005.
- Barregard, L; Hultberg, B; Schutz, A; Sallsten, G.** Enzyuria in workers exposed to inorganic mercury. *Int Arch Environ Health* 61: 65-69, 1988.
- Beal, MF.** Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32: 797-803, 2002.
- Becker, C; Becker, E; Maher, JF; Schreiner, GE.** Nephrotic syndrome after contact with mercury. *Arch Intern Med* 110: 178-186, 1962.
- Beckman, JS; Koppenol, WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437, 1996.
- Bedard, K; Krause, KH.** The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245–313, 2007.
- Beltrán, AE; Briones, AM; García-Redondo, AB; Rodríguez, C; Miguel, M; Alvarez, Y; Alonso, MJ; Martínez-González, J; Salaices, M.** p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 27(1):142-54, 2009.
- Belyaeva, EA; Dymkowska, D; Wieckowski, MR; Wojtczak, L.** Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-300D cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 231(1): 34-42, 2008.
- Bernard, A; Lauwerys, R.** Epidemiological application of early markers of nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 46: 293-306, 1989.
- Bevan, JA; Laher, I.** Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J* 5: 2267-273, 1991.
- Bidani, A; Churchill, PC; Gleischmann, L; Becker-McKenna, B.** HgCl₂-induced acute renal failure in the developing rat. *Pediatr Res* 14(3): 183-186, 1980.
- Bidone, ED; Castilhos, ZC; Cid de Souza, TM; Lacerda, LD.** Fish contamination and human exposure to mercury in the Tapajós river basin, Para state, Amazon, Brazil: A screening approach. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 29: 194-201, 1997.
- Bjorkman, L; Pedersen, NL; Lichtenstein, P.** Physical and mental health related to dental amalgam fillings in Swedish twins. *Community Den Oral Epidemiol* 24: 260-267, 1996.

- Blanco-Rivero, J; Cachofeiro, V; Lahera, V; Aras-Lopez, R; Márquez-Rodas, I; Salaices, M; Xavier, FE; Ferrer, M; Balfagón, G.** Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 46(1): 107-112, 2005.
- Boening, DW.** Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40: 1335-1351, 2000.
- Boffeta, P; Sallsten, G; Garcia-Gomez, M; Pompe-Kim, V; Zaridze, D; Bulbulyan, M; Caballero, JD; Ceccareli, F; Kobal, AB; Merler, E.** Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med* 58(7): 461-466, 2001.
- Bohets, HH; Van Thielen, MN; Van Der Biest, I; Van Landeghem, GF; D'Haese, PC; Nouwen, EJ; De Broe, ME; Dierlickx, PJ.** Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK₁, MDCK and human proximal tubular cells. *Kidney Int* 47: 395-403, 1995.
- Bohm, F; Pernow, J.** The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Circulation* 76: 8-18, 2007.
- Brawer, JR; McCarthy, GF; Gornitsky, M; Frankel, D; Mehindate, K; Schipper, HM.** Mercuric chloride induces a stress response in cultured astrocytes characterized by mitochondrial uptake of iron. *Neurotoxicology* 19: 767-776, 1998.
- Bredt, DS; Hwang, PM; Glatt, CE; Lowenstein, C; Reed, RR; Snyder, SH.** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714-718, 1991.
- Boffetta, P; Sallsten, G; Garcia-Gómez, M; Pompe-Kim, V; Zaridze, D; Bulbulyan, M; Caballero, JD; Ceccarelli, F; Kobal, AB; Merler, E.** Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med* 58: 461-466, 2001.
- Briones, AM; Alonso, MJ; Marín, J; Balfagón, G; Salaices, M.** Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 131 (2): 185-194, 2000.
- Briones, AM; Alonso, MJ; Hernanz, R; Tovar, S; Vila, E; Salaices, M.** Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide

- anions in lipopolysaccharid effects on small mesenteric arteries. *Life Sci* 71(17): 1997-2017, 2002.
- Briones, AM; Salices, M; Vila, E.** Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1beta in mesenteric resistance arteries. *Mech Ageing Dev* 126: 710-721, 2005.
- Brookes, N.** In vitro evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology* 76: 245 -256, 1992.
- Bryan, RM; You, J; Golding, EM; Marrelli, SP.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology* 102:1261-1277, 2005.
- Buchet, JP; Roels, H; Bernard, A; Lauwerys, R.** Assesment of renal function of workers to inorganic lead, cadmium or mercury vapor. *J Occup Med* 2: 741-750, 1980.
- Buñag, RD.** Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol* 34(2):279-282, 1973.
- Burton, CA; Hatlelid, K; Divine, K; Carter, DE; Fernando, Q; Brendel, K; Gandolfi, AJ.** Glutathione effects on toxicity and uptake of mercuric chloride and sodium arsenite in rabbit renal cortical slices. *Environ Health Perspec* 103 (Suppl. 1): 81-84, 1995.
- Cai, H; Harrison, DG.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidante stress. *Circ Res* 87: 840-844, 2000.
- Cai, H.** Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovas Res* 68: 26-36, 2005.
- Cannon III, RO.** Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry* 44(8B): 1809-1819, 1998.
- Carey, RM; Siragy, HM.** Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. *Endocrine Reviews* 24: 261–271, 2003.
- Carmignani, M; Boscolo, P.** Cardiovascular homeostasis in rats chronically exposed to mercuric chloride. *Arch Toxicol Suppl* 7: 383-388, 1984.
- 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 inorganix mercury in rats. *Br J Ind Med* 49(4): 226-232, 1992.

- Castoldi, AF; Barni, S; Turin, I; Gandini, C; Manzo, K.** Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J Neurosci Res* 60: 775-787, 2000.
- Castoldi, AF; Coccini, T; Manzo, L.** Neurotoxic and Molecular Effects of Methylmercury in Humans. *Reviews on Environmental Health* 18(1): 19-30, 2003.
- Ceriello, A; dello-Russo, P; Amstad, P; Cerutti, P.** High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 471, 1996.
- Chade, AR; Krier, JD; Rodriguez-Porcel, M; Breen, JF; McKusick, MA; Lerman, A; Lerman, L.** Comparison of acute and chronic antioxidant interventions in experimental renovascular disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F1079-F1086, 2004.
- Chan, HM e Egeland GM.** Fish Consumption, Mercury Exposure and Heart Diseases. *Nutr Rev* 62: 68-72, 2004.
- Chatterjee, A; Catravas, JD.** Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology* 49 (4-6): 134-140, 2008.
- Chen, F; Castrovanova, V; Shi, X; Demers, LM.** New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor, in the initiation of diseases. *Clin Chem.* 45: 7-17, 1999.
- Chen, C; Qu, L; Li, B; Xing, L; Jia, G; Wang, T; Gao, Y; Zhang, P; Li, M; Chen, W; Chai, Z.** Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin Chem* 51: 759–767, 2005.
- Chisolm, GM; Steinberg, D.** The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28: 1815-1826, 2000.
- Choi, BH; Cho, KH; Lapham, LW.** Effects of methylmercury on human fetal neurons and astrocytes in vitro: a time-lapse cinematographic, phase, and electron microscopic study. *Environ Res* 24: 61-74, 1981.
- Choi, BH.** The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog Neurobiol* 32: 447-470, 1989.
- Chong, ZZ; Li, F; Maiese, K.** Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* 75: 207-246, 2005.

- Choy, CM; Yeung, QS; Briton-Jones, CM; Cheung, CK; Lam, CW; Haines, CJ.** Relationship between semen parameters and mercury concentrations in blood and in seminal fluid from subfertile males in Hong Kong. *Fertil Steril* 78:426–428, 2002.
- Clarkson, TW.** The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 34: 369-403, 1997.
- Clarkson TW; Magos L; Myers GJ.** The toxicology of mercury current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* 349: 1731-1737, 2003.
- Clarkson, TW; Magos, L.** The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 36: 609-662, 2006.
- Clements CJ, Ball LK, Ball R, Pratt RD.** Thimerosal in vaccines. *Lancet* 355(9211):1279–1280, 2000.
- Collins, R; Peto, R; MacMahon, S.** Blood pressure, stroke and coronary heart disease, part 2: short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 335:827–838, 1990.
- Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG.** Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79:984–991, 1996.
- Cox, C; Clarkson, TW; Marsh, DO; Amin-Zaki, L; Tikriti, S; Myers, GG.** Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methyl mercury: an application of a single compartment model to single-strand hair analysis. *Environ Res* 49:318-32, 1989.
- Crackower, MAS; Sarao, R; Oudit, GY; Yagil, C; Kozieradzki, I; Scanga, SE; Oliveira-dos-Santos, AJ; Zhang, L; Pei, Y; Scholey, J; Ferrario, CM; Manoukian, AS; Chappel, MC; Backx, PH; Yagil, Y; Penninger, JM.** Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417: 822–828, 2002.
- Cuvin-Aralar, ML; Furness, RW.** Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* (21): 348-364, 1991.
- da Cunha, V; Souza, HP; Rossoni, LV; França, AS; Vassallo, DV.** Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. *Arch Environ Contam Toxicol* 39(1): 124-130, 2000.
- Danbolt, NC.** Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1-105, 2001.
- Danilczyk, U; Penninger, JM.** Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res* 98: 463–471, 2006.

- Dare, E; Gotz, ME; Zhivotovsky, B; Manzo, L; Ceccatelli, S.** Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J Neurosci Res* 62: 557-565, 2000.
- Davidge, ST.** Prostaglandin H Synthase and Vascular Function. *Circ Res* 89: 650-660, 2001.
- Davidson, PW; Myers, GJ; Weiss, B; Shamlaye, DF; Cox, C.** Prenatal methyl mercury exposure from fish consumption and child development: a review of evidence and perspectives from the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology* 27(6): 1106-1109, 2006.
- Davis, ME; Cai, H; McCann, L; Fukai, T; Harrison, DG.** Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am J Physiol* 284: H1449–1453, 2003.
- Day, JJ.; Reed, MN. Newland, MC.** Neuromotor deficits and mercury concentrations in rats exposed to methyl mercury and fish oil. *Neurotoxicol Teratol* 24: 629 – 641, 2005.
- Deanfield, JE; Halcox, JP; Rabelink, TJ.** Endothelial function and dysfunction. *Circulation* 115: 1285-1295, 2007.
- de Freitas, AS; Funck, VR; Rotta, M dos S; Bohrer, D; Morschbacher, V; Puntel, RL; Nogueira, CW; Farina, M; Aschner, M; Rocha, JB.** Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull* 79(1): 77-84, 2009.
- Deschepper, CF.** Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int* 46:1561–1563, 1994.
- Dewailly, E; Blanchet, C; Gingras, S; Lemieux, S; Sauvé, L; Bergeron, J; Holub, BJ.** Relations between n-3 fatty acid status and cardiovascular disease risk factors among Quebecers. *Am J Clin Nutr* 74: 603-611, 2001.
- Dhaun, N; Goddard, J; Kohan, DE; Pollock, DM. Schiffrin, EL; Webb, DJ.** Role of Endothelin-1 in Clinical Hypertension. 20 years on. *Hypertension* 52: 452-459, 2008.
- Diatchuk, V; Lotan, O; Koshkin, V; Wikstroem, P; Pick, E.** Inhibition of NADPH oxidase by 4(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (20): 13292–13301, 1997.

- Doughan, AK; Harrison, DG; Dikalov, SI.** Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction. Linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 102: 488-496, 2008.
- Dieguez-Acuña, F; Ellis, ME; Kushleika, J; Woods, JS.** Mercuric ion attenuates nuclear factor-kappaB activation and DNA binding in normal rat kidney epithelial cells: Implications for mercury-induced nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 173: 176-187, 2001.
- Dieguez-Acuña, FJ; Polk, WW; Ellis, ME; Simmonds, PL; Kushleika, JV; Woods, JS.** Nuclear Factor kB Activity Determines the Sensitivity of Kidney Epithelial Cells to Apoptosis: Implications for Mercury-Induced Renal Failure. *Toxicol Sci* 82(1): 114-123, 2004.
- Drexler, H.** Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 39:287–324, 1997.
- Droge, W.** Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
- Ehara, S; Ueda, M; Naruko, T; Haze, K; Itoh, A; Otsuka, M; Komatsu, R; Matsuo, T; Itabe, H; Takano, T; Tsukamoto, Y; Yoshiyama, M; Takeuchi, K; Yoshikawa, J; Becker, AE.** Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103: 1955-1960, 2001.
- Eichler, T; Ma, Q; Kelly, C; Mishra, J; Parikh, S; Ransom, RF; Devarajan, P; Smoyer, WE.** Single and combination toxic metal exposures induce apoptosis in cultured murine podocytes exclusively via the extrinsic caspase 8 pathway. *Toxicol Sci* 90(2): 392-399, 2006.
- Environmental Protection Agency – EPA Swedish.** In: A safe mercury repository. 2001. Disponível em: <http://www.naturvardsverket.se>. Acesso em: 10 Fev. 2008.
- Environmental Protection Agency - USA.** Mercury Study Report to Congress. U.S. Environmental Protection Agency; Washington, DC, 1997.
- Eto K.** Minamata disease. *Neuropathology* 20: S14-19, 2000.
- Evans, DH; Weingarten, K.** The effect of cadmium and other metals on vascular smooth muscle of the dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Toxicolog*. 61: 275–281, 1990.
- Expert Panel on Mercury Atmospheric Processes: A Synthesis Report.** Report No. TR-104214, 1994.

- Faraci, FM; Didion, SP.** Vascular protection: Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 1367-1373 (2004).
- FDA** – United States Food and Drug Administration. Center for drug evaluation and research, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/fdama/mercuryreport.htm>. Acesso em: 20 Jan. 2009.
- Feigl, EO.** Coronary autoregulation. *J Hypertens* 7: S55-S58, 1989.
- Félétou, M; Vanhoutte, PM.** Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, Where Are We Now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26: 1215-125, 2008.
- Fishbein, L.** Chromatographic and biological aspects of organic mercury. *Chromatogr Rev* 15: 195-238, 1971.
- Fitzgerald, WF; Clarkson, TW.** Mercury and Monomethylmercury: Present and Future Concerns. *Envir. Health Perspec* 96:159-166, 1991.
- Flohe, L.** Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci.* 49: 663-668, 1988.
- Forstermann, U; Munzel, T.** Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708–1714, 2006.
- Fouda, AM; Daba, MH; Dahab, GM; Sharaf El-Din, OA.** Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(2): 109-118, 2008.
- Fowler, BA; Woods, JS.** Ultrastructural and biochemical changes in renal mitochondria during chronic oral methyl mercury exposure: The relationship to renal function. *Exptl Molec Pathol* 24: 403-412, 1977.
- Fraga, G; Shigenaga, MK; Park, JW; Degan, P; Ames, BN.** Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4533-4537, 1990.
- Franko, A; Budihna, MV; Dodic-Fikfak, M.** Long-term effects of elemental mercury on renal function in meners of the Idrija Mercury Mine. *Ann Occup Hyg* 49(6): 521-527, 2005.
- Freeman, EJ; Ruehr, ML; Dorman, RV.** Ang II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274(1Pt1): C282-288, 1998.
- Freitas, MR; Schott, C; Corriu, C; Sassard, J; Stoclet, JC; Andriatsitohaina, R.** Heterogeneity of endothelium-dependent vasorelaxation in conductance and resistance arteries from Lyon normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 21: 1505–1512, 2003.

- Friedland, J; Silverstein, E.** A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol* 66(2): 416-424, 1976.
- Fujimoto, Y; Yabuno, T; Kato, M; Nishioka, K; Fujita, T.** Effect of methyl mercury on prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla slices. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 54(1): 115-119, 1986.
- Fukai, T; Siegfried, MR; Ushio-Fukai, M; Griending, KK; Harrison, DG.** Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 85:23–28, 1999.
- Fukai, T; Folz, RJ; Landmesser, U; Harrison, DG.** Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 55: 239-249 (2002).
- Funk, CD.** Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-1875, 2001.
- Furchgott, RF; Vanhoutte, PM.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-2018, 1989.
- Ganther, HF; Goudie, C; Sunde, ML; Kopecky, MJ; Wagner, P.** Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Scienc.* 175: 1122-1124, 1972.
- Gao, L; Mann, GE.** Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signaling. *Cardiovasc Res* 82: 9-20, 2009.
- García Gómez, M; Boffetta, P; Caballero Klink, JD, Español, S; Gómez Quintana, J. J.** Cardiovascular mortality in mercury miners. *Med Clin (Barc)* 128: 766–771, 2007.
- Gasso, S; Cristofol, RM; Selema, G; Rosa, R; Rodriguez-Farre, E; Sanfeliu, C.** Antioxidant compounds and Ca²⁺ pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chlorid neurotoxicity. *J Neurosci Res.* 66: 135-145, 2001.
- Gaut, JP; Byun, J; Tran, HD; Lauber, WM; Carrol, JA; Hotchkiss, RS; Belaouaj, A; Heinecke, JW.** Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Inves.* 109: 1311-1319, 2002.
- Geiszt, M.** NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res* 71: 289-299, 2006.
- Geisterfer, AA; Peach, MJ; Owens, GK.** Angiotensin II induce hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62: 749–756, 1988.

- Girardi, G; Elías, MM.** Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Radic Biol Med* 18: 61–66, 1995.
- Gochfeld, M.** Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicol Environ Saf* 56(1): 174-179, 2003.
- Goligorsky, MS.** Endothelial lcell dysfunction:can't live with it, how to live without it. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288: F871-F880, 2005.
- Golpon, HA; Puchner, A; Barth, P; Welte, T; Wichert, P; Feddersen, CO.** Nitric oxide-dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. *Toxicology* 192(2-3): 179-188, 2003.
- Gongora, MC; Qin, Z; Laude, K; Kim, HW; McCann, L; Folz, JR; Dikalov, S; Fukai, T; Harrison, DG.** Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension* 48: 473-481, 2006.
- Gonzalvo, MC; Gil, F; Hernandez, AF; Villanueva, E; Pla, A.** Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact* 105: 169-179, 1997.
- Govers, R; Rabelink, TJ.** Cellular regulation of endothelial nitric oxidesynthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F193–F206, 2001.
- Graeme, AK; Pollack, CV.** Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine* 16(1): 45-56, 1998.
- Grandjean, P; Weihe, P; White, RF; Debes, F; Araki, S; Yokoyama, K; Murata, K; Sorensen, N; Dahl, R; Jorgensen, PJ.** Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19: 417-428, 1997.
- Grandjean, P; Budtz-Jorgensen, E; White, RF; Jorgensen, PJ; Whiee, P; Debes, F; Keiding, N.** Methylmercury exposure biomarkers as indicator of neurotoxicity in children aged 7 years. *Am J Epidemiol* 150: 301-305, 1999.
- Grandjean, P; Murata, K; Budtz-Jorgensen, E; Weihe, P.** Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *J Pediatr* 144(2): 169-176, 2004.
- Griedling, K; Lassegue, B; Alexander, RW.** Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 281–306, 1996.
- Griendling, KK; Sorescu, D; Ushio-Fukai, M.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494–501, 2000.

- Griendling, KK; FitzGerald, GA.** Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912-1916, 2003.
- Griendling, KK.** NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid Redox Signal* 8: 1443-1445, 2006.
- Gstraunthaler, G; Pfaller, W; Kotanko, P.** Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol* 32: 2969-1972, 1983.
- Gu, D; Chen, J; Wi. X; Duan, X; Jones, DW; Huang, JF; Chen, CS; Chen, JC; Kelly, TN; Whelton, PK; He, J.** Prehypertension and risk of cardiovascular disease in Chinese adults. *J Hypertens* 27(4): 721-729, 2009.
- Guallar, E; Sanz-Gallardo, I; 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. *N Engl J Med* 347: 1747-1754, 2002.
- Guo, Z; Su, W; Allen, S; Pang, H; Daugherty, A; Smart, E; Gong, MC.** COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db mice. *Cardiovasc Res* 67: 723-735, 2005.
- Gupta, M; Bansal, JK; Khanna, CM.** Blood mercury in workers exposed to the preparation of mercury cadmium telluride layers on cadmium telluride base. *Ind Health* 34: 421-425, 1996.
- Hackenthal, E; Ganten, PM; Taugner, R.** Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70: 1067-1116, 1990.
- Hallgren, CG; Hallman, G; Jansson, JH; Marklund, SL; Huhtasaari, F; Schutz, A; Strömberg, U; Vessby, B; Skerfving, S.** Markers of high fish intake are associated with decreased risk of a first myocardial infarction. *Br J Nutr* 86: 397-404, 2001.
- Hall, JE.** Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol* 24: 27-39, 2003.
- Halliwell, B.** Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59: 1609-1623, 1992.
- Hansen, JC; Danscher, G.** Organic mercury: an environmental threat to the health of dietary-exposed societies? *Rev Environ Health* 12(2): 107-116, 1997.

- Hansson, M; Abedi-Valugerdi, M.** Mercuric chloride induces a strong immune activation, but does not accelerate the development of dermal fibrosis in tight skin 1 mice. *Scand J Immunol* 59, 469–477, 2004.
- Harada, M.** Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25: 1-24, 1995.
- Harrison, DG.** Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 89 (Suppl. 1): 87-102, 1994.
- Harrison, R.** Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now: *Free Radic Biol Med* 33: 774-797, 2002.
- Heitzer, T; Krohn, K; Albers, S; Meinertz, T.** Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 43:1435–1438, 2000a.
- Heitzer, T; Brockhoff, C; Mayer, B; Warnholtz, A; Mollnau, H; Henne, S; Meinertz, T; Munzel, T.** Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res* 86: E36–E41, 2000b.
- Higashi, Y; Sasaki, S; Nadagawa, K; Matsuura, H.** Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 346: 1954-1962, 2002.
- Hodgson, S; Nieuwenhuijsen, MJ; Elliot, P; Jarup, L.** Kidney Disease Mortality and Environmental Exposure to Mercury. *Am J Epidemiol* 165: 72-77, 2007.
- Hovart, M; Liang, L; Bloom, NS.** Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methylmercury compounds in low level environmental samples. Part II: *Water. Analytica Chimica Acta* 282:153-168, 1993.
- Houser, MT; Milner, LS; Kolbeck, PC; Wei, SH; Stohs, SJ.** Glutathione monoethyl ester moderates mercuric chloride-induced acute renal failure. *Nephron* 61: 449-455, 1992.
- Houston, MC.** The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med* 13: S128-S133, 2007.
- HSDB – Hazardous Substances Data Bank.** Mercury. In: Toxicology, occupational medicine and environmental series. 2004. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov>. Acesso em: 6 Ago. 2007.

- Hu, ZW; Kerb, R; Shi, XY; Wei-Lavery, T; Hoffman, BB.** Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2 implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303(2): 563-573, 2002.
- Huang, YL; Cheng, SL; Lin, TH.** Lipid peroxidation in rats administrated with mercuric chloride. *Biol Trace Elem Res* 52: 193–206, 1996.
- Huang, CF; Hsu, CJ; Liu, SH; Lin-Shiau, SY.** Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na⁺/k⁺-ATPase involved. *Toxicol Lett* 176(3): 188-197, 2008.
- Hulthe, J; Fagerberg, B.** Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2: 1162-1167, 2002.
- Hussain, S; Rodgers, DA., Duhart, HM; Ali, SF.** Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *J Environ Sci Health B* 32: 395 – 409; 1997.
- Hussain, S; Atkinson, A; Thompson, S; Khan, A.** Accumulation of mercury and its effects on antioxidant enzymes in brain, liver and kidneys of mice. *J Environ Sci Health* 34:645–60, 1999.
- Hviid, A; Stellfeld, M; Wohlfahrt, J; Melbye, M.** Association Between Thimerosal – Containing Vaccine and Autism. *JAMA* 290 (13): 1763-1766, 2003.
- Jansson, G; Harms-Ringdahl, M.** Stimulating effects of mercuric-and silver ions on the superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Res Commun* 18: 87-98, 1993.
- Jie, XL; Jin, GW; Cheng, JP; Wang, WH; Lu, J; Ou, LY.** Consumption of mercury-contaminated rice induces oxidative stress and free radical aggravation in rats. *Biomed Environ Sci* 20(1): 84-89, 2007.
- Kanazawa, K; Kawashima, S; Mikami, S; Miwa, Y; Hirata, K; Suematsu, M; Hayashi, Y; Itoh, H; Yokoyama, M.** Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol* 148 (6): 1949-1956, 1996.
- Kawashima, S; Yokoyama, M.** Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 998-1005, 2004.

- Kazantzis, G.** Mercury exposure and early effects: An overview. *Med. Lav* 93, 139–147, 2002.
- Kim, SH; Sharma, RP.** Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 196:47–57, 2004.
- Kim, J; Montagni, M; Koh, KK; Quon, MJ.** Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: Molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113: 1888-1904, 2006.
- Kingman, A; Albertini, T; Brown, LJ.** Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US military population. *J Dent Res.* 77: 461-71, 1998.
- Kisseleva, T; Bhattacharya, S; Braunstein, J; Schindler, CW.** Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285: 1-24, 2002.
- Kishimoto, T; Oguri, T; Tada, M.** Effect of methylmercury (CH₃HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells. *Toxicology* 103: 1–7, 1995.
- Kobal, A; Flisar, Z; Miklavcic, V; Dizdarevic, T; Sesek-Briski, A.** Renal function in miners intermittently exposed to elemental mercury vapour. *Arh Hig Rada Toksikol* 51: 369-380, 2000.
- Kobal, AB; Horvat, M; Prezelj, M; Briski, AS; Krsnik, M; Dizdarevic, T; Mazej, D; Falnoga, I; Stibilj, V; Arneric, N; Kobal, D; Osredkar, J.** The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol* 17: 261–274, 2004.
- Koh, KK.** Effects of estrogen on vascular wall: vasomotor function and inflammation. *Cardiovasc Res* 55:714–26, 2002.
- Koh, KK; Oh, PC; Wuon, MJ.** Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovascular Research* 81: 649-659, 2009.
- Kohan, DE.** Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kidney Dis* 29:2–26, 1997.
- Konigsberg, M; Lopez-Diazgerrero, NE; BucioL; Gutierrez-Ruiz, MC.** Uncoupling effect of mercuric chloride on mitochondria isolated from an hepatic cell line. *J Appl Toxicol* 21: 323 329, 2001.

- Koppenol, WH; Moreno, JJ; Pryor, WA; Ischiropoulos, H; Beckman, JS.** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5: 834-842, 1992.
- Kozma, L; Lenkey, A; Varga, E; Gomba, S.** Induction of renin release from isolated glomeruli by inorganic mercury(II). *Toxicol Lett* 85(1): 49-54, 1996.
- Kretz-Remy, C; Mehlen, P; Mirault, P; Arrigo, AP.** Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol* 133: 1083-1093, 1996.
- Kunimoto, M; Suzuki, T.** Migration of granule neurons in cerebellar organotypic cultures is impaired by methylmercury. *Neurosci Lett* 226: 183-186, 1997.
- Lamas, S; Marsden, PA; Li, GK; Tempst, P; Michel, T.** Endothelial nitric oxide synthase molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci US.* 89: 6348-6352, 1992.
- Landmesser, U; Spiekermann, S; Preuss, C; Sorrention, S; Fisher, D; Manes, C; Mueller, M; Drexler, H.** Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(4): 943-948, 2007.
- Lassegue, B; Clempus, RE.** Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol* 285: R277-R297, 2003.
- Lavi, S; Yang, EH; Prasad, YA; Mathew, V; Barsness, GW; Rihal, CS; Lerman, LO; Lerman, A.** The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in human. *Hypertension* 51: 127-133, 2008.
- LeBel, CP; Ali, SF; Bondy, SC.** Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 112:161-165, 1992.
- Lee, C-H; Wei, Y-H.** Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* 232: 592-606, 2007.
- Leonard, WJ & O Shea, JJ.** Jaks and STATs-biological implications. *Annu Rev Immunol* 16: 293-322, 1998.
- Leong, CC; Syed, NI; Lorscheider, FL.** Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following *in vitro* exposure to mercury. *Neuroreport* 12: 733-77, 2001.

- Lerman, LO; Nath, KA; Rodriguez-Porcel, M; Krier, JD; Schwartz, RS; Napoli, C; Romero, JC.** Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hipertensión* 37: 541-546, 2001.
- Lindberg, SE; Bullock, OR; Ebinghaus, R; Engstron, DR; Feng, X; Fitzgerald, WF; Pirrone, N; Prestbo, E; Seigneur, C.** A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio*. 36: 19-32, 2007.
- Lindqvist, O.** Mercury in forest lake ecosystems - Bioavailability, bioaccumulation and biomagnification. *Water Air Soil Pollu* 55:131-157, 1991.
- Liu, ML; Ylitalo, K; Salonen, R; Salonen, JT; Taskinen, MR.** Circulating oxidized low-density lipoprotein and its association with carotid intima-media thickness in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(8): 1492-1497, 2004.
- Love, MP; Ferro, CJ; Haynes, WG; Plumpton, C; Davenport, AP; Webb, DJ; McMurray, JJ.** Endothelin receptor antagonism in patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 47:166-72, 2000.
- Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randal, RJ.** Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275, 1951.
- Lund, BO; Miller, DM; Woods, SJ.** Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 45: 2017-2024, 1993.
- MacFarlane DE.** The effects of methyl mercury on platelets. Induction of aggregation and release via activation of the prostaglandin synthesis pathway. *Molecular Pharmacology* 19:470-476, 1980.
- 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* 24: 92-97, 2007.
- Mackness, M; Mackness, B.** Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radic Biol Med* 37: 1317-1323, 2004.
- Magos, L.** Physiology and toxicology of mercury. *Met Ions Biol Syst* 34: 321-370, 1997.

- Magos, L; Clarkson, TW.** Overview of the clinical toxicity of mercury. *Ann Clin Biochem* 43: 257-268, 2006.
- Mahaffey, KR.** Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. *Environ Res* 95:414-428, 2004.
- Mahboob, M; Shireen, KF; Atkinson, A; Khan, AT.** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B* 36: 687-697, 2001.
- Maher, P; Schubert, D.** Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 57: 1287-1305, 2000.
- Malm, O; Branches, FJ; Akagi, H; Castro, MB; Pfeiffer, WC; Harada, M; Bastos, WR; Kato, H.** Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin Brazil. *Sci Total Environ* 11(2): 141-150, 1995.
- Mardini, IA; FitzGerald, GA.** Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a group class of anti-inflammatory drugs. *Mol Interv* 1: 30-38, 2001.
- Mason, RP; Fitzgerald, WF.** The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Resch* 40(9):1897-1924, 1993.
- Mason, RP; Fitzgerald, WF; Morel, FMM.** The Biogeochemical Cycling of Elemental Mercury: Anthropogenic Influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58(15):3191-3198, 1994.
- Mason, RP; Morel, F; Egmond, H.** The role of microorganisms in elemental mercury formation in natural waters. *Water Air Soil Pollut* 80:775-787, 1995.
- Massaroni, L; Oliveira, EM; Stefanon, I; Vassallo, DV.** Effects of mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Braz J Med Biol Res* 25(8): 861-864, 1992.
- Mathieson, PW.** Mercuric chloride-induced autoimmunity. *Autoimmunity* 13: 243-247, 1992.
- Maturana, MA; Irigoyen, MC; Spritzer, PM.** Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics* 62: 77-866, 2007.
- Mayer, B; Hemmens, B.** Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 2: 47-481, 1997.
- Mazerik, JN; Hagele, T; Sherwani, S; Ciapala, V; Butler, S; Kuppusamy Hunter, MML, Kuppusamy, P; Marsh, CB; Parinandi, NL.** Phospholipase A₂ activation

- regulates cytotoxicity of methylmercury in vascular endothelial cells. *Int J Toxicol* 26: 553–569, 2007.
- McIntyre, M; Bohr, DF; Dominiczak, AF.** Endothelial function in Hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension* 34: 539-545, 1999.
- McKelvey, W; Gwyn, RC; Jeffry, N; Kass, D; Thorpe, LE; Garg, RK; Palmer, CD; Parsons, PJ.** A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York City adults. *Environ Health Perspect* 115: 1435–1441, 2007.
- Meeker, JD; Rossano, MG; Protas, B; Diamond, MP; Puscheck, E; Daly, D; Paneth, N; Wirth, JJ.** Cadmium, Lead, and Other Metals in Relation to Semen Quality: Human Evidence for Molybdenum as a Male Reproductive Toxicant. *Environmental Health Perspectives* 116(11): 1473-1479, 2008.
- Mellander, S.** Functional aspects of myogenic vascular control. *J Hypertens* 7: S21-S30, 1989.
- Melo, LG; Gneccchi, M; Pachori, AS; Kong, D; Wang, K; Liu, X; Pratt, RE, Dzau, VJ.** Endothelium-targed gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1761-1774, 2004.
- Methaa, PK; Griendling, KK.** Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82–C97, 2007.
- Metso, S; Loimaala, A; Merucry, MF; Nenonem, A; Vuori, I; Oja, P; Bond, MG; Laine, S; Rontu, R; Lehtimäki, T.** Circulating oxidizes low-density lipoprotein and common carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *J Biomed Sci* 11: 356-361, 2004.
- Meyer, JW; Holland, JA; Ziegler, LM; Chang, MM; Beebe, G; Schmitt, ME.** Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells: a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium* 7(1): 11–22, 1999.
- Miller, DM; Woods, JS.** Urinary porphyrins as biological indicators of oxidative stress in the kidney. Interaction of mercury and cephaloridine. *Biochem Pharmacol* 46: 2235–2241, 1993.
- Milstien, S; Katusic, Z.** Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263:681–68, 1999.

- Moncada, S; Higgs, EA; Vane, JR.** Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* 1: 18-20, 1977.
- Moncada, S; Palmer, RM; Higgs, EA.** Nitric oxide physiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
- Monroe, RK; Halvorsen, SW.** Cadmium blocks receptor-mediated Jak/STAT signaling in neurons by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 41: 493-502, 2006.
- Mottet, NK; Vahter, ME; Charleston, JS; Friberg, LT.** Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. *Met Ions Biol Syst* 34: 371-403, 1997.
- Moulin, M; Bergaman, B; Marklund, SL; Schutz, A; Skerfving, S.** Mercury, selenium, and glutathione peroxidase before and after amalgam removal in man. *Acta Odontol Scand* 48: 189-202, 1990.
- Mueller, CF; Laude, K; McNally, JS; Harrison, DG.** Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2: 274-278, 2005.
- Mukai, Y; Shimokawa, H; Higashi, M; Morikawa, K; Matoba, T; Hiroki, J; Kunihiro, I; Talukder, HMA; Takeshita, A.** Inhibition of rennin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction associated with aging in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1445-1450, 2002.
- Mutter, J; Naumann, J; Sadaghiani, C; Schneider, R; Walach, H.** Alzheimer disease: mercury as pathogenic factor and apolipoprotein E as a moderator. *Neuro Endocrinol Lett* 25: 331-339, 2004.
- Naganuma, A; Koyama, Y; Imura, N.** Behavior of methylmercury in mammalian erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 54: 405-410, 1980.
- Nakae, D; Kobayashi, Y; Akai, H; Andoh, N; Satoh, H; Ohashi, K; Tsutsumi, M; Konishi, Y.** Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. *Cancer Res* 57:1281-1287, 1997.
- National Academy of Sciences.** Toxicological effects of methylmercury. Washington, DC. National Research Council, 2000.
- Nielsen, KC; Owman, C.** Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res* 27(1): 33-42, 1971.

- Ninomiya, T; Ohomori, H; Hashimoto, K; Tsuruta, K; Ekino, S.** Expansion of methylmercury poisoning outside of Minamata: An epidemiological study on chronic methylmercury poisoning outside of Minamata. *Environ Res* 70: 47-50, 1995.
- NIOSHI** – National Institute for Occupational Safety and Health. Safety and health topic: Mercury. 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/topics/mercury/>. Acesso em: 10 Ago. 2008.
- Nishi, K; Itabe, H; Uno, M; Kitazato, KT; Horigochi, H; Shino, K; Nagahiro, S.** Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1649-1654, 2002.
- Ohnaka, K; Numaguchi, K; Yamakawa, T; Inagami, T.** Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35(1Pt1): 68-75, 2000.
- Ohtsu, H; Frank, GD; Utsunomiya, H; Eguchi, S.** Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: mechanistic insights and its pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 7: 1315–1326, 2005.
- Oka, T; Matsukura, M; Okamoto, M; Harada, N; Kitano, T; Miike, T; Futatsuka, M.** Autonomic nervous functions in fetal type Minamata disease patients: assessment of heart rate variability. *Tohoku J Exp Med* 198: 215-21, 2003.
- Olivero, J; Navas, V; Perez, A; Solano, B; Acosta, I; Arguello, E; Salas, R.** Mercury levels in muscle of some fish species from the Dique Channel, Colômbia. *Bull Environ Contam Toxicol* 58 (6): 865-870, 1997.
- Omata, S; Momose, Y; Ueki, H; Sugano, H.** In vivo effect of methylmercury on protein synthesis in peripheral nervous tissues of the rat. *Arch Toxicol* 49: 203-214, 1982.
- Oomen, CM; Feskens, EJ; Rasanen, L; Fidanza, F; Nissinen, AM; Menotti, A; Kok, FJ; Kromhout, D.** Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy, and Netherlands. *Am J Epidemiol* 151: 999-1006, 2000.
- Palmer, RMJ; Ferrige, AG; Moncada, S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- Park, EJ; Park, K.** Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. *Toxicol In Vitro* 21(5): 789-794, 2007.

- Park, ST; Lim, KT; Chung, YT; Kim, SU.** Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology* 17: 37-45, 1996.
- Passerini, AG; Polacek, DC; Shi, C; Francesco, NM; Manduchi, E; Grant, GR; Pritchard, WF; Powell, S; Chang, GY; Stoeckert, CJ Jr; Davies, PF.** Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(8): 2782-2487, 2004.
- Passos, CJ; Mergler, D.** Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saude Publica Suppl* 4: s503-s520, 2008.
- Passow, H; Rothsteins, A; Clarkson, TW.** The general pharmacology of heavy metals. *Pharmacol Rev* 13: 185-224, 1961.
- Pauletto, P; Rattazzi, M.** Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant* 21(4): 850-853, 2006.
- Pelletier, L; Hirsch, F; Rossert, J; Druet, E; Druet, P.** Experimental mercury-induced glomerulonephritis. *Spreinger Semin Immunopathol* 9: 359-369, 1987.
- Persson, PB; Skalweit, A; Thiele, BJ.** Controlling the release and production of renin. *Acta Physiol Scand* 181: 375-381, 2004.
- Pfeiffer, WC; Lacerda, LD; Malm, O; Souza, CM; da Silveira, EG; Bastos, WR.** Mercury concentrations in inland waters of gold-mining áreas in Rondônia, Brazil. *Sci Total Environ* 87-88: 233-240, 1989.
- Philbert, MA; Beiswanger, CM; Waters, DK; Reuhl, KR; Lowndes, HE.** Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: Histochemical localization by mercury orang and o-phthaldialdehyde-induced histofluorescence. *Toxicol Appl Pharmacol* 107: 215-227, 1991.
- Ponce, RA; Kavanagh, TJ; Mottet, NK; Whittaker, SG; Faustman, EM.** Effects of methyl mercury on the cell cycle of primary rat CNS cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 127: 83-90, 1994.
- Quinn, SJ; Williams, GH.** Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 50: 409-426, 1988.
- Raes, M; Michiels, C; Remacle, J.** Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase. *Methods Free Radic Biol Med* 3: 3-7, 1987.

- Rajagopalan, S; Kurz, S; Munzel, T; Tarpey, M; Freeman, GA; Griending, KK; Harrison, DG.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916–1923, 1996.
- Rayman, MP.** The importance of selenium to human health. *Lancet*. 356: 233-241, 2000.
- Raymond, LJ; Ralston, NVC.** Mercury: selenium interactions and health implications. *Seychelles Med Dental J* 7: 72-77, 2004.
- Remuzzi, G; Bertani, T.** Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Eng J Med* 339: 1448-56, 1998.
- Reus, IS; Bando, I; Andrés, D; Cascales, M.** Relationship between expression of HSP70 and metallothionein and oxidative stress during mercury chloride induced acute liver injury in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 17:161–168, 2003.
- Rice, DC.** Evidence of delayed neurotoxicity produced by methylmercury. *Neurotoxicology* 17: 583-596, 1996.
- Rice, DC.** The US EPA reference dose for methylmercury sources of uncertainty. *Environ Res* 95: 406–413, 2004.
- Rissanen, T; Voutilainen, S; Nyyssonen, K; Lakka, TA; Salonen, JT.** Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* 102: 2677-2699; 2000.
- Ritchie, KA; Gilmour, WH; Macdonald, EB; Burke, FJT; McGowan, DA; Dale, IM.** Health and neuropsychological functioning of dentists exposed to mercury. *Occup Environ Med* 59: 287-93; 2002.
- Rodriguez-Porcel, M; Lerman, A; Best, PJM; Krier, JD; Napoli, C; Lerman, LO.** Hipercholesterolemia impairs myocardial perfusion and permeability: role of oxidative stress and endogenous scavenging activity. *J Am Coll Cardiol* 37: 608-615, 2001.
- Rolfus, K., Fitzgerald, W.** Linkages between atmospheric mercury deposition and the methylmercury content of marine fish. *Water Air Soil Pollution* 80:291-297, 1995.

- Rosen, P; Ballhausen, T; Bloch, W; Addicks, K.** Endothelial relaxation is disturbed by oxidative stress in the diabetic rat heart: influence of tocopherol as antioxidant. *Diabetologia* 38: 1157, 1995.
- Rossoni, LV; Salaices, M; Marín, J; Vassallo, DV; Alonso, MJ.** Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺K⁺ATPase in ouabain-induced hypertesion. *Br J Pharmacol* 135(3): 771-781, 2002.
- Rossoni, LV; Cunha, V; França, A; Vassallo, DV.** The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 34: 887-892, 1999.
- Rowens, B; Guerrero-Betancourt, D; Gottlieb, CA; Boyes, RJ; Eichenhorn, MS.** Respiratory failure and death following. Acute inhalation of mercury vapor. A clinical and histological perspective. *Chest* 99: 185-190, 1991.
- Rubany, GM; Vanhoute, PM.** Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250: H82-H827, 1986.
- Rungby, J; Ernst, E.** Experimentally induced lipid peroxidation after exposure to chromium, mercury or silver: interactions with carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol* 70(3): 205-207, 1992.
- Sager, PR; Aschner, M; Rodier, PM.** Persistent differential alterations in developing cerebellar cortex of male and female mice after methylmercury exposure. *Brain Res* 314: 1-11, 1984.
- Sallsten, G; Thoren, J; Barregarde, L; Schutz, A; Sharping, G.** Long-term use of nicotine chewing gum and mercury exposure from dental amalgam fillings. *J Dent Res* 75: 594-98, 1996.
- Salonen, JT, Seppanen, K; Nyyssonen, K; Korpela, H; Kauhanen, J; Kantola, M; Tuomilehto, J; Esterbauer, H; Tatzber, F; Salonen, R.** Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation* 91: 645-655, 1995.
- Salonen, JT; Seppanen, K; Lakka, TA; Salonen, R; Kaplan, GA.** Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis* 148: 265 – 273, 2000.

- Sapin, CE; Druet, E; Druet, P.** Induction of anti-glomerular basement membrane antibodies in the Brown-Norway rat by mercuric chloride. *Clin. Exp Immunol* 28: 173–179, 1977.
- Sarafian, TA.** Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. *Met Ions Biol Syst* 36: 415-444, 1999.
- Sarkis, A; Lopez, B; Roman, RJ.** Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13: 205–214, 2004.
- Saxe, SR; Snowdon, DA, Wekstein, MW; Henry, RG; Grant, FT; Donegan, SJ; Wekstrein, DR.** Dental amalgam and cognitive function in older women: findings from the Nun Study. *J Am Dent Assoc* 126: 1495-501, 1995.
- Schechter, AN; Gladwin, MT.** Hemoglobin and the paracrine and endocrine function of nitric oxide. *N Engl J Med* 348: 1483-1485, 2003.
- Schiffrin, EL.** Vascular endothelin in hypertension. *Vasc Pharmacol* 43:19-29, 2005.
- Schonbeck, U; Sukhova, GK; Graber, P; Coulter, S; Libby, P.** Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 155:1281–1291, 1999.
- Sirois, JE; Atchison, WD.** Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 167: 1-11, 2000.
- Sha, WC; Lion, HC; Toumanen, EL; Baltimore, D.** Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80: 321-330, 1995.
- Shumilla, JA; Wetterhahn, KE; Barchowsky, A.** Inhibition of NF-kappa B binding to DNA by chromium, cadmium mercury, zinc, and arsenite in vitro: evidence of a thiol mechanism. *Arch Biochem Biophys* 349: 356-362, 1998.
- Simionescu, M; Simionescu, N; Palade, GE.** Segmental differentiations of cell junction in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol* 67: 863-865, 1975.
- Sindhu, RK; Ehdaie, A; Farman, F; Dhaliwal, KK; Nguyen, T; Zhan, CD; Roberts, CK; Varizi, ND.** Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta.* 1743: 86-92, 2005.
- Smith, WL; Garavito, RM; DeWitt, DL.** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157–33160, 1996.

- Sorensen, N; Murata, K; Budtz-Jorgensen, E; Weihe, P; Grandjean, P.** Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiology* 10: 370-375, 1999.
- Sraer, JD; Baud, L; Sraer, J; Delarue, F; Ardaillou, R.** Stimulation of PGE2 synthesis by mercuric chloride in rat glomeruli and glomerular cells in vitro. *Kidney Int Suppl* 11: S63-68, 1982.
- Stacchiotti, A; Borsani, E; Rodella, L; Rezzani R, Bianchi R; Lavazza, A.** Dose-dependent mercuric chloride tubular injury in rat kidney. *Ultrastruct Pathol* 27:253–259, 2003.
- Stacchiotti, A; Lavazza, A; Rezzani, R; Borsani, E; Rodella, L; Bianchi, R.** Mercuric chloride-induced alterations in stress protein distribution in rat kidney. *Histol Histopathol* 19:1209–1218, 2004.
- Steckelings, UM; Kaschima, E; Unger, T.** The AT2 receptor: a matter of love and hate. *Peptides* 26: 1401–1409, 2005.
- Stefanska, J; Pawliczak, R.** Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm* 2008: 1-10, 2008.
- Stern, AH.** A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment. *Environ Re.* 98: 133-142, 2005.
- Stralin, P; Karlsson, K; Johansson, BO; Marklund, SL.** The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 2032-2036, 1995.
- Stroes, E; Kastelein, J; Cosentino, F; Erkelens, W; Wiver, R; Koomans, H; Luscher, T; Rabelink, T.** Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 99: 41-46, 1997.
- Su, L; Wang, M; Yin, ST; Wang, HL; Chen, L; Sun, LG; Ruan, DY.** The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Exotoxicol Environ Saf* 70(3): 483-489, 2008.
- Suzuki, H; Motley, ED; Frank, GD; Utsunomiya, H; Eguchi, S.** Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3: 305–322, 2005.
- Swensson, A; Ulfvarsson, V.** Toxicology of organic mercury compounds used as fungicides. *Occup Health Rev* 15: 5-11, 1963.

- Szasz, T; Thakali, K; Fink, GD; Watts, SW.** A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. *Exp Biol Med* 232: 27-37, 2007.
- Szerafin, T; Erdei, N; Fulop, T; Pasztor, ET; Édes, I; Koller, A; Bagi, Z.** Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circ Res* 99: e12-e17, 2006.
- Szocs, K; Lassegue, B; Sorescu, D; Hilenski, LL; Valppu, L; Couse, TL; Wilcox, JN; Quinn, MT; Lambeth, JD; Griending, KK.** Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 21-27, 2002.
- Taberner, A; Schneider, F; Potenza, MA; Randriamboavonjy, V; Chasserot, S; Wolf, P; Mitolo-Chieppa, D; Stoclet, JC; Andriantsitohaina, R.** Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immuno-localization and influence on vascular tone. *Intensiv Care Med* 29(2): 262-270, 2003.
- Takeuchi, T; Eto, K; Kinjo, Y; Tokunaga, H.** Human brain disturbance by methylmercury poisoning, focusing on the long-term effect on brain weight. *Neurotoxicology* 17: 187-190, 1996.
- Tamarat, R; Silvestre, JS; Durie, M; Levy, BI.** Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor-and inflammation-related pathways. *Lab invest* 82(6): 747-756, 2002.
- Taniyama, Y; Griending, KK.** Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42: 1075-1081, 2003.
- Torres, AD; Rai, AN; Hardiek, ML.** Mercury intoxication and arterial hypertension: report of two patients and review of the literature. *Pediatrics* 105: E34, 2000.
- Toshima, S; Hasegawa, A; Kurabayashi, M; Itabe, H; Takano, T; Sugano, J; Shimamura, K; Kimura, J; Michishita, I; Suzuki, T; Nagai, R.** Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(10): 2243-2247, 2000.
- Touyz, RM; Schiffrin, EL.** Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev* 52: 639-672, 2000.
- Triggle, CR; Hollenberg, M; Anderseon, TJ; Ding, H; Jiang, Y; Ceroni, L; Wiehler, WB; Ng, ES; Ellis, A; Andrews, K; McGuire, JJ; Pannirselvam, M.**

- The endothelium health and disease – a targeted for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res* 39: 249-267, 2003.
- Tsuzuki, Y.** Effect of chronic methylmercury exposure on activities of neurotransmitter enzymes in rat cerebellum. *Toxicol Appl Pharmacol* 60: 379-381, 1981.
- Tubbs, RR; Gephardt, GN; McMahon, JT; Pohl, MC; Vidt, DG; Barenberg, SA; Valenzuela, R.** Membranous glomerulonephritis associated with industrial mercury exposure. *Am J Clin Pathol* 77: 409-413, 1982.
- UNEP Chemicals.** Current exposure and impacts of mercury on human health. In: ___Global mercury assessment. Switzerland: UNEP, 2002. Disponível em: <http://www.chem.unep.ch/mercury/>. Acesso em: 10 Jul. 2008.
- Ursini, F; Maiorino, M; Brigelius-Flohe, R; Aumann KD; Roveri, A; Schomburg, D; Flohé, L.** Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252: 38-53, 1995.
- Ushio-Fukai, M; Alexander, RW; Akers, M; Lyons, PR; Lassegue, B; Griending, KK.** Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 55: 142–149 (1999).
- Valko, M; Rhodes, CJ; Moncol, J; Izakovic, M; Mazur, M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40, 2006.
- Vallega, GA; Canessa, ML; Berk, BC; Brock, TA; Alexander, RW.** Vascular smooth muscle Na⁺/H⁺ exchanger kinetics and its activation by angiotensin II. *Am J Physiol Cell Physiol* 254: C751–C758, 1988.
- Vane, JR; Botting, RM.** Formation by the endothelium of prostacyclin, nitric oxide and endothelin. *J Lipid Mediat* 6: 395-404, 1993.
- Vane, JR; Mitchell, JA; Appleton, I; Tomlinson, A; Bishop-Bailey, D; Croxtall, J; Willoughby, DA.** Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2046–2050, 1994.
- Van Vleet, T; Schnellmann, R.** Toxic nephropathy: environmental chemicals. *Semin Nephrol* 23:500–508, 2003.
- Vas, J; Monestier, M.** Immunology of mercury. *Ann N Y Acad Sci* 1143: 240-267, 2008.

- Vásquez-Vivar, J; Kalyanaraman, B; Martasek, P; Hogg, N; Masters, BS; Karoui, H; Tordo, P; Pritchard, KA.** Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9220-9225, 1998.
- Vassallo, DV; Moreira, CM; Oliveira, EM; Bertollo, DM; Veloso, TC.** Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 156(2): 113-118, 1999.
- Villar, CP; Alonso, CJG; Feldstein, CA; Juncos, LA; Romero, JC.** Role of Endothelin in the Pathogenesis of Hypertension. *Mayo Clin Proc* 80(1):84-96, 2005.
- Vincent, MA; Montagnani, M; Quon, MJ.** Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep* 3:279-88, 2003.
- Virtanen, JK; Voutilainen, S; Rissanen TH; Mursu, J; Tuomainen, TP; Korhonen, MJ; Valdonen, VP; Seppanen, K; Laukkanen, JA; Salonen, JT.** Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 228-233, 2005.
- Virtanen, JK; Rissanen, TH; Voutilainen, S; Tuomainen, TP.** Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem* 18(2): 75-85, 2006.
- Wakita, Y.** Hypertension induced by methyl mercury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 89(1): 144-147, 1987.
- Wallenfeldt, K; Farberg, B; Wikstrand, J; Hulthe, J.** Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically health men. *J Intern Me.* 256: 413-420, 2004.
- Weiss, B; Stern, S; Cox, C; Balys, M.** Perinatal and lifetime exposure to methylmercury in the mouse: behavioral effects. *Neurotoxicology* 26: 675-690, 2005.
- Widlansky, ME; Gokce, N; Keaney, JRJr; Vita, JA.** The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 42: 1149-1160, 2003.
- Wiggers, GA; Stefanon, I; Padilha, AS; Peçanha, FM; Vassallo, DV; Oliveira, EM.** Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147(2): 252-260, 2008a.

- Wiggers, GA; Peçanha, FM; Briones, AM; Pérez-Girón, Miguel, M; Vassallo, DV; Cachofeiro, V; Alonso, MJ; Salaices, M.** Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physio.* 295: H1033–H1043, 2008.
- Williams, SP; Campbell, AK; Roszell, N; Myatt, L; Leikauf, GD; Rapoport, RM.** Modulation of phorbol ester-induced contraction by endogenously released cyclooxygenase products in rat aorta. *Am J Physiol* 267: H1654-1662, 1994.
- Wojciechowski, J; Kowalski, W.** Cardiac and aortic lesions in chronic experimental poisoning with mercury vapors. *Pol Med Sci Hist Bull* 15(2): 255-260, 1975.
- Wolf, G.** Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep.* 2: 167-173, 2000.
- Wolf, MB; Baynes, JW.** Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals* 20(1): 73-81, 2007.
- Wong, SL; Leung, FP; Lau, CW; Au, CL; Yung, LM; Yao, X; Chen, ZY; Vanhoutte, PM; Gollasch, M; Huang, Y.** Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F₂α mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res* 104(2): 228-235, 2009.
- Woods, JS; Dieguez-Acuña, FJ; Ellis, MF; Kushlieka, J; Simmonds, PL.** Attenuation of nuclear factor kappa B (NF-κB) promotes apoptosis of kidney epithelial cells. A potential mechanism of mercury-induced nephrotoxicity. *Environ Health Perspect* 110(Suppl.5): 819-822, 2002.
- World Health Organization.** Methyl Mercury. V. 101. International Programme on Chemical Safety. Geneva, Switzerland, 1990,1991,1996.
- Wright, DH; Abran, D; Bhattacharya, M; Hou, X; Bernier, SG; Bouayad, A; Fouron, JC; Vázquez-Tello, A; Beauchamp, MH; Clyman, RI; Peri, K; Varma, DR; Chemtob, S.** Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1343-R1360, 2001.
- Wu, KK.** Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* 33:179–207, 1995.
- Wu, KK; Liou, J-Y; Cieslik, K.** Transcriptional Control of COX-2 via C/EBPβ. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 679-685, 2005.
- Xavier, FE; Rossoni, LV; Alonso, MJ; Balfagón, G; Vassallo, DV; Salaices, M.** Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in

- alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 143(1): 215-25, 2004.
- Xie, QW; Cho, HJ; Calaycay, J; Mumford, RA; Swiderek, KM; Lee, TD; Ding, A; Troso, T; Nathan, C.** Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from Mouse macrophages. *Science*. 256: 25-28, 1992.
- Xie, QW; Kashiwabara, Y; Nathan, C.** Role of transcription factor NF-kappa B/rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 4705-4708, 1994.
- Yamada, M; Minami, T; Yamada, G; Tohno, Y, Tohno, S; Ideda, Y; Tashiro, T; Kohno, Y; Kawakami, K.** Different elements ratios of red cosmetics excavated from ancient burials of Japan. *Sci Total Environ* 199(3): 293-298, 1997.
- Yanagisawa, M; Kurihara, H; Kimura, S; Tomobe, Y; Kobayashi, M; Mitsui, Y; Yazaki, Y; Goto, K; Masaki, T.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-15, 1988.
- Yanagisawa, H; Nodera, M; Kurihara, N; Wada, O.** Altered expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of rats with HgCl₂-induced acute renal failure. *Toxicol Lett* 98(3): 191-188, 1998.
- Yoshizawa, K; Rimm, EB; Morris, JS; Spate, VL; Hsieh, CC; Spiegelman, D; Stampfer, MJ; Willett, WC.** Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 347: 1755-1760, 2002.
- Zadnik, V; Pompe-Kirn, V.** Effects of 50-year mercury mining and milling on cancer incidence in the region of Idrija, Slovenia. *Coll Antropol* 31(3):897 – 903, 2007.
- Zalups, RK.** Method for studying the *in vivo* accumulation of inorganic mercury in segments of the nephron in the kidneys of rats treated with mercuric chloride. *J Pharmacol Methods* 26: 89-104, 1991a.
- Zalups, RK.** Autometallographic localization of inorganic mercury in the kidneys of rats. Effect of unilateral nephrectomy and compensatory renal growth. *Exp Mol Pathol* 54: 10-21, 1991b.
- Zalups, RK.** Early aspects of the intrarenal distribution of mercury after the intravenous administration of mercuric chloride. *Toxicology* 79: 215-28, 1993.
- Zalups, RK; Lash, LH.** Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J Toxicol Environ Health* 42: 1:44, 1994.
- Zalups, RK.** Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 52(1): 113-143, 2000.

-
- Zelko, IN; Mariani, TJ; Folz, RJ.** Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CnZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol Med* 33: 337-349, 2002.
- Zerrouk, A; Auguet, M; Chabrier, PE.** Augmented endothelium-dependent contraction to angiotensin II in the SHR aorta: role of an inducible cyclooxygenase metabolite. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: 525-533, 1998.
- Zheng, Y; Monestier, M.** Inhibitory signal override increases susceptibility to mercury-induced autoimmunity. *J Immunol* 171, 1596–1601, 2003.