

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

NÚBIA BELEM LEMOS

**EXPOSIÇÃO AGUDA A BAIXA
CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE
MERCÚRIO INDUZ DISFUNÇÃO ENDOTELIAL
EM AORTA DE RATOS**

**Vitória
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

NÚBIA BELEM LEMOS

**EXPOSIÇÃO AGUDA A BAIXA
CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE
MERCÚRIO INDUZ DISFUNÇÃO ENDOTELIAL
EM AORTA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha

**Vitória
2009**

NÚBIA BELEM LEMOS

**EXPOSIÇÃO AGUDA A BAIXA
CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE
MERCÚRIO INDUZ DISFUNÇÃO ENDOTELIAL
EM AORTA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em __/__/2009, por:

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

Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha- Co-orientadora, UFES

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – UFES

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira – UFES

Coordenador do PPGCF: _____

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar sempre o meu caminho, me dando proteção.

Aos meus pais, Ednilson e Rosalina, pelo incentivo, carinho, cuidado, paciência e pelo amor incondicional. Às minhas irmãs, Claudia e em especial Aline pelo apoio neste trabalho. Aos meus sobrinhos, Vitor e Yuri, pela alegria e carinho que sempre trazem quando vêm ao meu encontro. Aos meus cunhados Vinícius e Mario Sérgio pelo incentivo. AMO VOCÊS.

Ao Léo pela paciência, carinho, ajuda e apoio em todos os momentos do Mestrado.

À minha amiga Clarissa pelo apoio dado desde o início da execução deste trabalho.

À minha orientadora, Ivanita Stefanon, pela oportunidade, apoio principalmente nos momentos difíceis, pela orientação, paciência, carinho e disponibilidade. Tenho muita admiração por você.

À Alessandra, minha co-orientadora, pela idéia do projeto, pelos conselhos, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade.

Ao Dalton, amável “chefe”, que também idealizou este projeto. Agradeço pelo carinho, atenção, orientação, alegria, generosidade e disponibilidade.

Pela amizade e ajuda de toda turma do LEMC: Alessandra, Aurélia, Edna, Eduardo, Fabiana, Fernanda, Franck, Guilherme, Guilia, Jhuli Keli, Juliana, Karina, Larissa, Lélia, Lili, Lorena, Luciana, Mirian, Nelson, Neto, Priscila, Rogério e Thaís.

À Jhuli Keli, que me ensinou a técnica de preparação dos anéis isolados de aorta e pela paciência.

À Priscila pelo apoio, amizade e por ter sido a minha companheira de longas horas até a noite no laboratório.

Aos meus amigos da fisioterapia da UNIMED pelo apoio e pela ajuda, mesmo de forma indireta, através das trocas de plantões. Ao hospital UNIMED pelo apoio.

Aos funcionários Cláudia e Fonseca pelo apoio técnico.

À equipe de higienização, por sua simpatia e educação.

Ao CNPq, CAPES e FAPES/ FUNCITEC pelo apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 MERCÚRIO.....	17
1.2 O ENDOTELIO VASCULAR.....	37
1.2.1 Fatores de contração derivados do endotélio	38
1.2.1.1 Prostaglandinas vasoconstritoras.....	38
1.2.1.2 Endotelina.....	39
1.2.1.3 Sistema Renina Angiotensina.....	39
1.2.1.4 Espécies reativas de oxigênio.....	41
1.2.2 Fatores relaxamento derivados do endotélio	42
1.2.2.1 Óxido Nítrico.....	42
1.2.2.2 Prostaciclina.....	44
1.2.2.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).....	45
2 OBJETIVOS	48
2.1 OBJETIVO GERAL.....	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	50
3.2. METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA.....	50
3.2.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)	51
3.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio	52
3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	53
3.3.1 Efeito da administração aguda do cloreto de mercúrio (HgCl₂, 6 nM) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	53
3.3.2 Avaliação da administração aguda do cloreto de mercúrio (6 nM) na resposta de relaxamento dependente do endotélio	53

3.3.3 Avaliação da administração aguda do cloreto de mercúrio (6 nM) na resposta de relaxamento independente do endotélio.....	54
3.3.4 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito do cloreto de mercúrio (6 nM) sobre a resposta à fenilefrina na aorta.....	54
3.3.4.1 Influência de 6 nM do cloreto de mercúrio na liberação basal de NO.....	55
3.3.4.2 Envolvimento de radicais livres no efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina na aorta torácica.....	56
3.3.4.3 Envolvimento da Angiotensina II local sobre o efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina na aorta torácica.....	56
3.3.4.4 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre o efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina na aorta torácica.....	56
3.4. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
3.5. FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	57
4 RESULTADOS.....	60
4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO CLORETO DE MERCÚRIO (6nM) SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.....	60
4.2 MODULAÇÃO ENDOTELIAL DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO CLORETO DE MERCÚRIO (6 NM) SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	62
4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO CLORETO DE MERCÚRIO (6 NM) SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	65
4.4 ANÁLISE DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO (6 NM) SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	67
4.5 ESTUDO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CLORETO DO MERCÚRIO (6 NM) SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	69
4.5.1 Efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na via do Óxido Nítrico.....	69

4.5.2 Efeito de agentes antioxidantes sobre a ação do cloreto de mercúrio (6 nM) na resposta contrátil à fenilefrina nos anéis isolados de aorta.....	72
4.5.2.1 Influência da administração de apocinina, um inibidor da enzima NADPH oxidase.....	72
4.5.2.2 Participação do ânion superóxido (O_2^-) na resposta contrátil à fenilefrina.....	74
4.5.3 Participação da Angiotensina II local sobre o efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina nos anéis isolados de aorta.....	76
4.5.3.1 Efeito agudo de 6 nM do cloreto de mercúrio sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA).....	76
4.5.3.2 Efeito agudo do cloreto de mercúrio sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT_1	78
4.5.4 Efeito agudo de 6 nM de cloreto de mercúrio sobre os prostanóides derivados da cicloxigenase.....	80
5 DISCUSSÃO.....	83
5.1 EFEITOS DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NA AORTA.....	83
5.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO.....	86
5.3 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A RESPOSTA A FENILIFRINA.....	87
5.3.1 Efeito de cloreto de mercúrio na via do Óxido Nítrico.....	87
5.3.2 Via dos radicais livres.....	89
5.3.3 Participação da Angiotensina II local sobre o efeito do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina.....	92
5.3.4 Efeito do cloreto de mercúrio sobre os prostanóides derivados da ciclooxigenase.....	94
6 CONCLUSÃO.....	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do mercúrio	20
Figura 2: Garimpo do Rio Guacamayo	22
Figura 3: Toxicidade do mercúrio gera disfunção mitocondrial.....	35
Figura 4: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “ <i>in vitro</i> ”.....	51
Figura 5: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio.....	52
Figura 6: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais.....	55
Figura 7: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos no controle (CT E+) e após a administração aguda de 6 nM de HgCl ₂ , por 45 min (HgCl ₂ E+).	61
Figura 8: Efeito da remoção do endotélio (E-) na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos antes (CT E-) e após incubação com 6 nM de HgCl ₂ , por 45 min (HgCl ₂ E-)......	62
Figura 9: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos: (A) antes (CT E+) e após (CT E-) a retirada do endotélio; (B) efeito do HgCl ₂ antes (HgCl ₂ E+) e após a retirada do endotélio (HgCl ₂ E-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo, na ausência (azul) e na presença (vermelho) de HgCl ₂	64
Figura 10: Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis isolados de aorta de ratos no controle (ACh CT) e após a administração aguda de 6 nM de HgCl ₂ , por 45 min (ACh+ HgCl ₂)......	66
Figura 11: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis isolados de aorta de ratos na condição controle (NPS CT) e após a administração aguda de 6 nM de HgCl ₂ , por 45 min (NPS+ HgCl ₂)......	68
Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (L-NAME CT) a incubação com L-NAME; (B) efeito do HgCl ₂ antes (HgCl ₂ E+) e após (L-NAME + HgCl ₂) a incubação com L-NAME; (C) Comparação da diferença percentual da área abaixo da curva no controle (azul) e na presença (vermelho) de HgCl ₂	71

Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (Apocinina CT) a incubação com apocinina; (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após (Apocinina + HgCl₂) a incubação com apocinina; (C) Comparação da diferença percentual da área abaixo da curva no controle (azul) e na presença (vermelho) de HgCl₂.....73

Figura 14: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (SOD CT) incubação com superóxido dismutase (SOD); (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após (SOD + HgCl₂) a incubação com SOD; (C) Diferença percentual da área abaixo da curva na condição controle (azul) e na presença (vermelho) de HgCl₂75

Figura 15: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após a incubação com enalapril (Enalapril CT); (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após a incubação com enalapril (Enalapril + HgCl₂).....77

Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após a incubação com losartan (Losartan CT); (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após a incubação com losartan (Losartan + HgCl₂).....79

Figura 17: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (INDO CT) a incubação com indometacina; (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após (INDO + HgCl₂) a incubação com indometacina; (C) Diferença percentual da área abaixo da curva na ausência (azul) e na presença (vermelho) de HgCl₂.....81

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta intactos de ratos Wistar na ausência (CT E+) e na presença do $HgCl_2$ 6 nM ($HgCl_2$ E+).....60
- Tabela 2:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) à fenilefrina em anéis isolados de aorta sem endotélio na ausência (CT E-) e na presença de $HgCl_2$ ($HgCl_2$ E-).....62
- Tabela 3:** Efeito do $HgCl_2$ sobre a resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e a sensibilidade (pD_2) à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar na presença e ausência do endotélio.....63
- Tabela 4:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais controle (ACh CT) e na presença de $HgCl_2$ (ACh+ $HgCl_2$).....65
- Tabela 5:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pelo nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta intactos de animais controle (NPS CT) e na presença de $HgCl_2$ (NPS + $HgCl_2$).....67
- Tabela 6:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem $HgCl_2$ e na presença e na ausência de L-NAME70
- Tabela 7:** Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem $HgCl_2$ e na presença e na ausência de Apocinina72
- Tabela 8:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem $HgCl_2$, na presença e na ausência de SOD.....74
- Tabela 9:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem $HgCl_2$ e na presença e na ausência de enalapril.....76
- Tabela 10:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem $HgCl_2$ e na presença e na ausência de losartan.....78
- Tabela 11:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem $HgCl_2$ e na presença e na ausência de indometacina (INDO).....80

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Adenilato ciclase

Ach: Acetilcolina

ADP: Adenosina difosfato

AMPC: Adenosina Monofosfato Cíclico

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BH₄: Tetrahidrobiopterina

BK_{Ca}: Canais de K⁺ de larga condutância ativados por alterações de cálcio intracelular

Ca²⁺: Cálcio

Cd⁺⁺: Cádmio

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CH₃CH₃Hg⁺: Etilmercúrio

COX : Ciclooxygenase

CT: Controle

Cu/ZnSOD: Enzima cobre-zinco superóxido dismutase

% Daac: Diferença percentual da área abaixo da curva

DAG: Diacilglicerol

DHPR: Dihidropteridina redutase

DMPS: 2,3-Dimercaptopropano-1-sulfônico

DMSA: Meso-2,3-dimercaptosuccínico

DTT: Ditioneitol

E-: Endotélio ausente

E+: Endotélio intacto

ECA : Enzima conversora de angiotensina

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

Enos: Óxido nítrico sintase endotelial

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ET : Endotelina

EU: União Europeia

FAD: Flavina Adenina dinucleotídeo

FDA: *Food and Drug Administration*

FMN: Flavina mononucleotídeo
GMP_c: Monofosfato cíclico de guanosina
GPx: Glutathione peroxidase
GTP: Trifosfato de guanosina
Hg: Mercúrio
Hg⁺⁺: Mercúrio inorgânico divalente
Hg⁰: Mercúrio líquido
Hg₂²⁺: Íon mercurioso
Hg²⁺: Íon mercúrico
HgCl₂: Cloreto de mercúrio
Hg₂Cl₂: Cloreto mercurioso ou calomelano
Hg(CNO)₂: Fulminato de mercúrio
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
HgS: Sulfeto de mercúrio
INDO: Indometacina
K_{ATP}: Canais de K⁺ sensíveis a ATP
KCl: Cloreto de potássio
Kca: Canais de potássio dependente de Ca²⁺
K_{ir}: Canais de K⁺ retificador
K_v: Canais de K⁺ voltagem dependente
L-NAME: N^o-nitro-L-arginina metil éster
MAPK: *Mitogen-activated protein*
MeHg: Metilmercúrio
MLCK: Cadeia leve da miosina
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NKA: Na⁺K⁺ATPase
NO: Óxido nítrico
NOS: Enzima óxido nítrico sintase
iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzível
nNOS: Óxido Nítrico Sintase neuronal
NPS: Nitroprussiato de Sódio
O₂⁻: Ânion superóxido
ONOO⁻: Peroxinitrito
OMS: Organização Mundial da Saúde

Pb⁺⁺: Chumbo

pD₂: -log EC₅₀, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima

PdfVE: Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PLA₂: Fosfolipase A₂

PLC: Fosfolipase C

PGD₂: Prostaglandina D₂

PGE₂: Prostaglandinas E₂

PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}

PGG : Prostaglandina G₂

PGH₂: Prostaglandina H₂

PGI₂: Prostaglandinas I₂

PKG: Quinase dependente de GMP cíclico

R_{máx}: Resposta máxima

– SH: Grupo sulfidril

SERCA: *Sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase*

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SNC: Sistema nervoso central

SOD: Enzima superóxido dismutase

TAS: *Total Antioxidant Status*

TXA₂: Tromboxano A₂

UNEP: *United Nations Environmental Program*

U.S EPA: *United State Environmental Protection Agency*

U.S. FDA: *United State Food and Drug Administration*

VAERS: *Vaccine Adverse Events Reporting System*

WKY: Wistar Kyoto

RESUMO

Os efeitos tóxicos do mercúrio e de seus derivados são extremamente variados, abrangendo desde efeitos sobre as células do aparelho reprodutivo até as do neurológico, sendo já bem esclarecidos. No entanto, sua ação sobre o sistema vascular, em pequenas concentrações, semelhantes às aquelas encontradas no sangue após exposição ocupacional, não está bem elucidada. Assim, este estudo propõe avaliar os efeitos da administração aguda, após 45 min, de 6 nM de cloreto de mercúrio (HgCl_2) sobre a reatividade vascular. Foram usados anéis isolados de aorta de ratos Wistar (200- 300g) para investigar a reatividade vascular à fenilefrina, na ausência (controle) e na presença de HgCl_2 (6 nM). A reatividade vascular à fenilefrina (10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M) foi avaliada na presença (E+) e na ausência do endotélio (E-). Para analisar os possíveis fatores endoteliais envolvidos no efeito do HgCl_2 , foram realizadas curvas de concentração-resposta à fenilefrina com: L-NAME (100 μM), losartan (10 μM), enalapril (10 μM), indomentacina (10 μM), superóxido dismutase (SOD, 150 U/ml) e apocinina (Apo, 100 mM). A integridade endotelial foi avaliada através da curva de relaxamento induzida pela acetilcolina (ACh, 10^{-10} - $3 \cdot 10^{-4}$ M), e a integridade do músculo liso vascular foi testada pela curva de nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-11} - $3 \cdot 10^{-7}$ M), em artérias pré-contraídas com fenilefrina (10^{-6} M). O HgCl_2 aumentou a resposta máxima (R_{max} - controle: $93,5 \pm 2,5$ vs HgCl_2 : $117 \pm 3,4$ %) e a sensibilidade à fenilefrina (pD_2 - controle: $-6,47 \pm 0,08$ vs HgCl_2 : $-6,77 \pm 0,1$ M). Este aumento foi abolido após a lesão endotelial. A administração de L-NAME promoveu aumento de $R_{\text{máx}}$ e pD_2 à fenilefrina, tanto na ausência quanto na presença de HgCl_2 . A magnitude desse efeito (analisada pela dAUC) foi menor na presença de HgCl_2 ($\text{dAUC}\%$ - controle: 134 ± 22 vs HgCl_2 $64,89 \pm 11\%$). A vasodilatação induzida pela ACh e NPS não foi modificada pela adição de HgCl_2 . Entretanto, a administração do losartan, do enalapril, da indometacina, da SOD e da apocinina foram capazes de reverter o aumento da reatividade vascular à fenilefrina provocado pelo HgCl_2 . Os resultados sugerem que o aumento da reatividade à fenilefrina, em anéis isolados de aorta, induzido por 6 nM de HgCl_2 , é mediado pelo endotélio vascular. Tal efeito envolve a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) local, a liberação de prostanoídes vasoconstritores, o aumento da liberação de espécies reativas do oxigênio e a redução da biodisponibilidade de NO. Palavras chave: Mercúrio, aorta, disfunção endotelial.

ABSTRACT

The toxic effects of mercury and its derivatives vary extremely involving effects from the reproductive until the neural cells, the last ones being very well known. However, its action on the vascular system, at small concentrations, similar to the ones found in the blood after occupational exposure, are not completely elucidated yet. Therefore, this study was performed to study the effects for 45 min of acute administration of 6 nM HgCl₂ on the vascular reactivity. Isolated aortic rings from Wistar rats (200- 300 g) were used to investigate the vascular reactivity to phenylephrine in the absence (control) and presence of 6 nM HgCl₂. Vascular reactivity to phenylephrine (10⁻¹⁰ to 3.10⁻⁴ M) was evaluated in the presence (E+) and absence (E-) of endothelium. To investigate putative factors involved in HgCl₂ actions concentration-response curves to phenylephrine were performed with and without HgCl₂ with 100 μM L-NAME, 10 μM losartan, 10 μM enalapril, 10 μM indometacine, superóxide dismutase (SOD, 150 U/ml) and apocinine (Apo, 100 mM). Endothelial integrity was evaluated with the acetylcholine (ACh, 10⁻¹⁰ – 3.10⁻⁴ M) induced relaxation and the smooth muscle integrity with the relaxation produced by sodium nitroprusside (NPS, 10⁻¹¹ - 3.10⁻⁷ M) in rings precontracted with 10⁻⁶ M phenylephrine. HgCl₂ increased the maximal response (Rmax – control: 93,5 ± 2,5 vs HgCl₂: 117 ± 3,4 %) and sensitivity to phenylephrine (pD₂– control: -6,47 ± 0,08 vs HgCl₂: -6,77 ± 0,1 M). This increment was abolished after endothelial damage. L-NAME administration increased R_{max} and pD₂ of phenylephrine reactivity both in the presence and absence of HgCl₂. The magnitude of this effect (evaluated by dAUC) was reduced in the presence of HgCl₂ (dAUC% - control: 134 ± 22 vs HgCl₂ 64,89 ± 11%). The vasodilatation induced by Ach and NPS was not changed after HgCl₂ administration. However, losartan and enalapril, indomethacine, SOD and apocinine administration reverted the increased reactivity to phenylephrine induced by HgCl₂. Results suggested that the increased phenylephrine reactivity of aortic rings induced by 6 nM HgCl₂ is endothelium mediated. Such effect involves activation of the local renin-angiotensin system, vasoconstrictor protanoids release, increased release of oxygen reactive species and the reduced bioavailability of NO.

Keywords: Mercury, aorta, endothelial dysfunction.



INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 MERCÚRIO

O mercúrio tem sido considerado um poluente ambiental de alto risco à saúde pública devido a sua elevada toxicidade e mobilidade nos ecossistemas, portanto tem sido alvo de muitas pesquisas e estudos, especialmente, no que se refere a mecanismos de toxicidade, proteção e indicadores de disfunção, que buscam averiguar os aspectos clínicos e anatomopatológicos (Davis *et al.*, 1994; Alexandre, 2006). A sua alta toxicidade decorre de várias formas químicas (compostos orgânicos e inorgânicos), elevada volatilidade e solubilidade em água e lipídios, o que facilita a transposição desse metal pesado através dos alvéolos pulmonares e da barreira hematoencefálica, ocasionando efeitos adversos ao sistema nervoso central, renal, sistema cardiovascular, imunológico, reprodutivo, dentre outros (*World Health Organization*, 1991; Faria, 2003). Sua exposição pode ocorrer através de atividades profissionais (dentistas, garimpeiros, trabalhadores de indústrias que usam mercúrio e outros), de forma acidental, como quebra de termômetro caseiro, e no nosso dia a dia na ingestão de água e alimentos contaminados e ainda por contato dérmico (Hahn *et al.*, 1990).

Pertencente ao grupo II B da Tabela Periódica, cuja abreviatura é Hg, devido ao nome grego que, posteriormente, foi convertido ao latim como *Hidrargyrum* que significa prata líquida, por se apresentar na fase líquida a 24 °C (Español Cano, 2001).

A exposição ao mercúrio é proveniente de várias fontes abrangendo desde as fontes naturais, até as fontes artificiais derivadas de inúmeras atividades humanas. Dentre as fontes naturais, a liberação do mercúrio no meio ambiente pode ocorrer por meio das emissões de gases da crosta terrestres, atividades vulcânicas, terremotos, erosão e evaporação de água (*World Health Organization*, 1990; Boening, 2000; Swain *et al.*, 2007). No entanto, as fontes artificiais são mais diversificadas do que as naturais e a aplicabilidade varia de acordo com as propriedades químicas do metal (Swain *et al.*, 2007).

O mercúrio existe em diversas formas químicas e é dividido em espécies inorgânicas e orgânicas. Na forma inorgânica inclui o mercúrio elementar metálico ou mercúrio líquido (Hg^0) o qual é designado de forma primária, ou seja, não é combinado com outros elementos. Este é liberado na atmosfera por processos naturais, tais como a atividade vulcânica (ATSDR, 2006). Quando exposto, o mercúrio elementar volatiliza à temperatura ambiente e forma o vapor de mercúrio, que pode ser absorvido pelo pulmão (Clarkson *et al.*, 2003 e 2007; Rooney, 2007).

O mercúrio metálico, por possuir expansão volumétrica uniforme em ampla faixa de temperatura, alta tensão superficial e não possuir aderência às superfícies vítreas, é utilizado em aparelhos de mensurar pressão e temperatura como termômetros, manômetros e barômetros. Além disso, por possuir baixa resistência elétrica e alta condutividade térmica, é empregado em materiais eletro-eletrônicos. Também apresenta alto potencial de oxidação, por isso é usado em operações eletroquímicas como na indústria de cloro e soda. Devido à facilidade de formação de amálgamas com outros metais é utilizado na indústria metalúrgica, na odontologia e no garimpo (Micaroni *et al.*, 2000).

O mercúrio inorgânico também pode ser encontrado sob dois diferentes estados de oxidação: o íon mercurioso (Hg_2^{2+}), forma pouco estável em sistemas naturais, e o íon mercúrico (Hg^{2+}). Esses metais combinam com outros elementos químicos formando compostos de sais, os mais importantes são: cloreto de mercúrio (HgCl_2); cloreto mercurioso ou calomelano (Hg_2Cl_2); fulminato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{CNO})_2$ - detonador usado em explosivos) e sulfeto de mercúrio (HgS - de cor vermelha, usado em tintas) (Azevedo, 2003; ATSDR, 2006).

No meio ambiente os minérios que contêm sulfeto frequentemente possuem concentrações significativas de mercúrio inorgânico, por apresentarem elevada afinidade química entre o Hg e o enxofre. Dentre estes, o minério cinábrio (HgS) contém maior percentual de mercúrio (86,2%) e tem sido, por milhares de anos, a principal fonte de Hg (Boening, 2000; Swain, 2007). O cinábrio é encontrado em rochas próximas de atividades vulcânicas, em fraturas minerais e em áreas próximas de fontes de águas termais, cujas maiores reservas encontram-se em Almaden (Espanha) e na Itália (Micaroni *et al.*, 2000; Azevedo, 2003).

Nas origens antropogênicas, os compostos inorgânicos, por apresentarem propriedades de alta estereoespecificidade, são empregados nas indústrias para

catálise de polímeros sintéticos (Micaroni *et al*, 2000). São utilizados também em soluções para preservar coletas de amostras biológicas, como reagente nas reações de química analítica, fotografia e gravuras (ATSDR, 2006).

A forma orgânica é derivada a partir da biotransformação do íon mercúrico em metilmercúrio (CH_3Hg^+) e etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$) (Johnson, 2004). As trocas de espécies inorgânicas para as formas metiladas são o primeiro passo nos processos aquáticos de bioacumulação. Considera-se que estes processos ocorram tanto na água quanto no sedimento. O mecanismo do metilmercúrio ainda não foi completamente elucidado (Bisinoti & Jardim, 2004). Uma vez formado o metilmercúrio, este entra na cadeia alimentar através da rápida difusão e forte ligação com as proteínas da biota aquática por um fenômeno chamado bioamplificação, isto é, a concentração do metal aumenta à medida que avança nos níveis tróficos. Portanto, por ter a capacidade de permanecer por longos períodos nos tecidos do organismo, este elemento poderá ser encontrado nos peixes predadores da extremidade da cadeia alimentar em concentrações elevadas, sendo, por esta razão, a principal fonte de intoxicação do homem por metilmercúrio (Boening, 2000; Clarkson, 2002; Virtanen *et al.*, 2007). Já o etilmercúrio, sua principal fonte de exposição, é por contato direto de alguns produtos empregados pelo próprio homem. Por apresentar o poder de assepsia por oxidação de matéria orgânica é usado como inseticidas, bactericidas e fungicidas. O mesmo composto ainda é utilizado para prevenir a contaminação por bactérias e fungos em conservantes de drogas biológicas como vacinas (timerosal), um composto a base de mercúrio (50% de Hg) (Micaroni *et al*, 2000; ATSDR, 2006; Mckelvey, 2007; U.S. FDA, 2008).

A utilização do mercúrio tem como consequência o aumento do mesmo no meio ambiente. Existem dois ciclos biogeoquímicos genéricos nos quais o metilmercúrio e os compostos de Hg^{2+} , etilmercúrio e Hg^0 são interconvertidos nos sistemas atmosféricos, aquáticos e terrestres (Figura 1). Estes ciclos estão envolvidos no transporte, distribuição de mercúrio no ambiente e seu enriquecimento biológico. Um deles é em âmbito global e envolve a circulação atmosférica de vapor de mercúrio elementar a partir evaporação de água da crosta terrestre que retorna para superfície, rios e oceanos através da sua precipitação. O segundo ciclo é de âmbito local e ocorre nos oceanos, rios e lagos onde sucede a biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio, principalmente a partir de fontes antropogênicas (Boening, 2000; Clarkson, 2002; Houston, 2007).

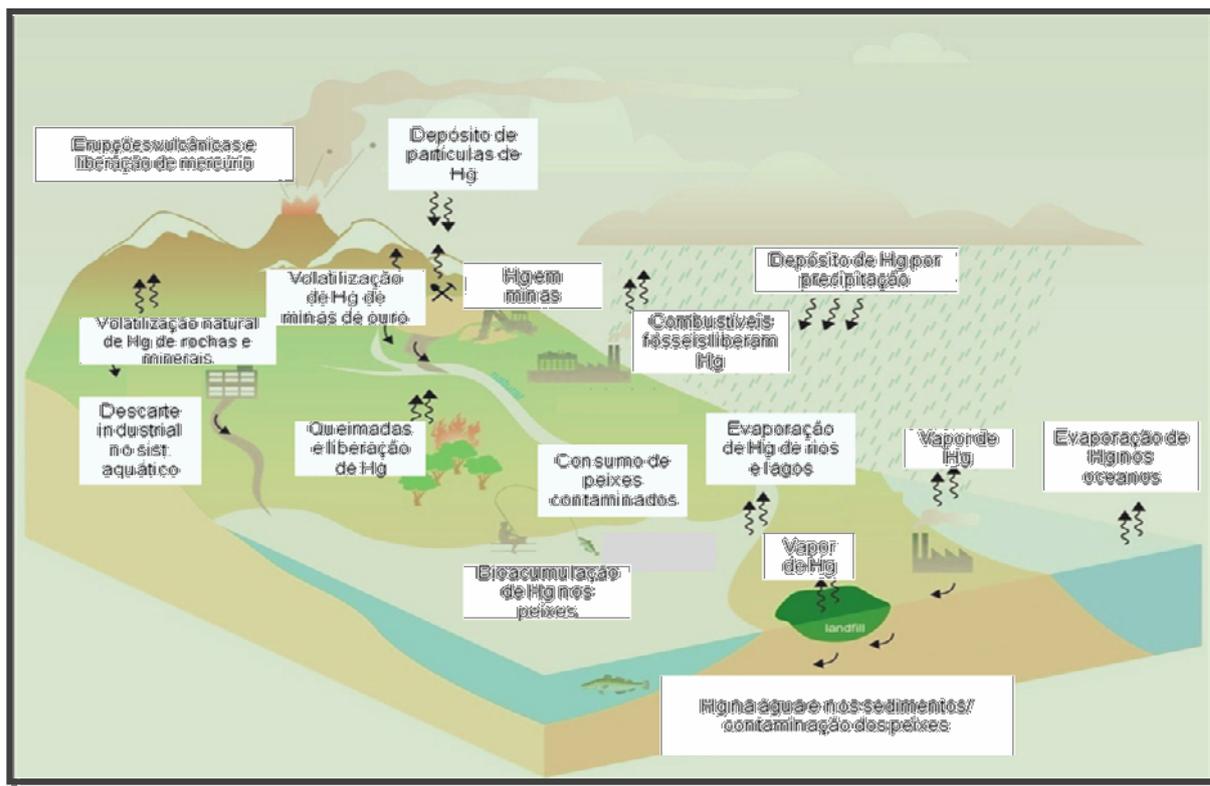


Figura 1: Ciclo do mercúrio. Modificado de Rekacewicz, 2004.

Estudos têm mostrado que o mercúrio metálico liberado nos sistemas aquáticos ou na atmosfera pode ser oxidado em Hg^{2+} e posteriormente convertido ao metilmercúrio por diversos mecanismos, principalmente por bactérias sulfato-redutoras. Em adição a esta metilação, as bactérias presentes no sedimento podem também desmetilar o metilmercúrio, via reação reversa (Bisinoti & Jardim, 2004; Baughman, 2006; Flora *et al.*, 2008). O mercúrio confinado nos sedimentos de rios, lagos e oceanos poluídos torna-se perigoso porque pode permanecer ativo como substrato para a metilação por cerca de 100 anos, mesmo quando a fonte é eliminada (Bisinoti & Jardim, 2004).

Um dos exemplos mais representativos do que o homem pode causar aos ciclos naturais foi o incidente ocorrido na Baía de Minamata, Japão, na década de 60, que ilustrou claramente o potencial tóxico do mercúrio. A contaminação ambiental foi causada pelo despejo de metilmercúrio (MeHg) como subproduto de uma indústria que produzia fertilizantes químicos, resinas sintéticas e plásticos diretamente na baía (Clarkson *et al.*, 2002 e 2007; Passos & Mergle, 2008). As pessoas expostas apresentaram neuropatias e tinham como sinais e sintomas: ataxia, deterioração da fala, constrição do campo visual, alterações sensoriais,

surdez, cegueira, tremores, movimentos involuntários, deficiência mental, coma e morte. Recém nascidos de mulheres contaminadas apresentaram paralisia cerebral. Foram relatados 2.520 casos de intoxicação, dentre os quais 1.043 resultaram em óbitos. Este caso ficou mundialmente conhecido como Doença de Minamata ou Síndrome *Hunter-Hussel* (Gochfeld, 2003).

Outros casos surgiram com sintomatologia semelhante no Paquistão (1963), Guatemala (1966), Iraque (1971) e Argentina (1980). Porém, desta vez, a contaminação verificada foi através da alimentação, causada pelo uso de metil e etilmercúrio como fungicida em tratamento de sementes e grãos. Estes relatos de intoxicações permitem confirmar o problema do uso intenso do mercúrio, principalmente na forma de compostos organomercuriais (Bakir *et al.*, 1973; Clarkson *et al.*, 1993; Saint-Phard & Dorsten, 2004).

Parte das nações industrializadas em vários países, inclusive o Brasil, proibiu o descarte de mercúrio em corpos hídricos e a utilização como fungicida em sementes de alimentos, restringiu a venda e otimizou a substituição de tecnologias (como exemplo as células de mercúrio na indústria cloro-soda) (Lacerda 1997; Alexandre, 2006; Srivastava *et al.*, 2006). O mercúrio começa a ser visto como material de risco que supera os benefícios nas sociedades industrializadas.

Assim, outros elementos menos deletérios que o mercúrio vêm sendo utilizados como, por exemplo, o uso do etanol na fabricação de termômetros (Goechfeld, 2003). Além disso, tem se procurado estabelecer o uso de equipamentos de proteção individual e técnicas no manuseio visando minimizar a exposição humana. Através de medidas como estas, ocorreu redução significativa nas áreas industriais que utilizam o mercúrio como, por exemplo, nos setores eletro-eletrônico (lâmpadas fluorescentes, baterias), na indústria de tintas e em outras indústrias químicas (Swain *et al.*, 2007).

Entretanto, as fontes difusas e geralmente não usuais de mercúrio têm substituído em importância as fontes industriais clássicas. Por exemplo, aterros sanitários, geração de energia e produção de aço utilizando sucata como matéria prima, despejo de esgoto sanitário, águas urbanas, queima de combustíveis e biomassa. Este quadro repete-se provavelmente nas principais regiões densamente urbanizadas do país. Essas fontes, ao contrário das indústrias emissoras típicas de mercúrio, são de difícil monitoramento e controle. Contudo, de um modo geral, tanto

as legislações específicas, quanto as autoridades ambientais no país, não se encontram preparadas para este fenômeno (Lacerda, 1997).

A mais preocupante forma de contaminação antropogênica do meio ambiente pelo mercúrio no Brasil é na área de garimpos de ouro (Passos & Mergler, 2008). Desde a década de setenta, várias técnicas de extração de ouro utilizando amalgamação com mercúrio têm sido desenvolvidas na Bacia Amazônica e em Minas Gerais (Passos & Mergler, 2008). O processo de amalgamação é um método arcaico o qual utiliza a queima direta do mercúrio metálico ligado ao cascalho para promover a separação do ouro gerando, como consequência desse procedimento, a emissão de grande quantidade de vapor de mercúrio para atmosfera (Niagru *et al*, 1992). Durante o processo, quantidades variáveis de mercúrio são perdidas na forma metálica para rios e solos e dejetos contaminados são deixados a céu aberto na maioria dos sítios de garimpo (Lacerda, 1997). Além disso, esta atividade deixou marcas de destruição na cobertura vegetal e no solo com consequente eliminação da camada orgânica. Em alguns locais foram deixadas enormes crateras onde a recuperação para replantio de florestas ou para a agricultura é impossível (Figura 2) (Lacerda, 1997; Hacon *et al.*, 2008).



Figura 2: Garimpo do Rio Guacamayo. Rios e florestas da fronteira Peru-Brasil sofrem impactos severos com o uso do mercúrio em garimpos. Ortiz, 2009.

Em associação com estas atividades de mineração, tem ocorrido desmatamento para o desenvolvimento da agropecuária na região Amazônica contribuindo direta e indiretamente para dispersão do mercúrio. Além disso, os grandes reservatórios formados para geração de energia hidroelétrica também favoreceram a mobilização desse metal (Gochfeld, 2003; Hacon *et al.*, 2008).

Existem evidências de que as mudanças climáticas estejam desencadeando novos vazamentos e reativando antigos depósitos de mercúrio, como resultado da erosão e do aumento da temperatura dos lagos e rios (*The Madison Declaration on Mercury Pollution*, 2007).

Estudos conduzidos na região do rio Tapajós, considerado o maior afluente do rio Amazonas, têm mostrado que os níveis de exposição ao metilmercúrio, quantificados na raiz dos cabelos de moradores das comunidades ribeirinhas, variavam de alguns $\mu\text{g/g}$ a até mais de $150 \mu\text{g/g}$ (Lebel *et al.*, 1998). Este índice está bem acima do normal indicado pela Organização Mundial de Saúde, que é $10 \mu\text{g/g}$ de cabelo (10 PPM). O patamar a partir do qual os primeiros sinais clínicos e sintomas de contaminação mercurial ocorrem é de $50 \mu\text{g/g}$ (IPCS, 1990). Entretanto, o diagnóstico da intoxicação mercurial é dificultado pela semelhança dos sintomas desta intoxicação com outros sinais atribuídos a demais doenças locais, como a malária, nas regiões de garimpo. Outra dificuldade neste diagnóstico é a falta de condições para que os profissionais de saúde locais possam estabelecer um diagnóstico diferencial entre a intoxicação mercurial (exames clínicos, bioquímicos e toxicológicos), e outros processos patológicos regionais (Lacerda, 1997; Hacon *et al.*, 2008).

O controle periódico dos níveis de mercúrio nas diversas espécies de pescado, utilizadas como alimento, pode prevenir e impedir uma possível situação de risco à saúde pública (Kitahara *et al.*, 2000). Visando assegurar a Saúde Pública, foram estabelecidos limites de segurança de mercúrio em alimentos. Para o pescado, tem sido apontado limites variando entre 0,4 a $1,0 \text{ mgHg/Kg}$. O Brasil fixou a tolerância em $0,5 \text{ mg/Kg}$ para pescado não-predador e $1,0 \text{ mg/Kg}$ para pescado predador (Decreto-lei nº 685, 1998). Da mesma forma foi estabelecida e recomendada, pela *United State Food and Drug Administration* (U.S. FDA, 2004), a ingestão semanal tolerável de consumo de metilmercúrio de $30 \mu\text{g/dia}$ para um adulto de 70 kg; enquanto a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, 1990) recomenda um valor de $0,47 \mu\text{g/kg/dia}$.

Outra forma de contaminação se dá através do uso de restaurações com amálgamas dentárias por meio do vapor de mercúrio (forma inorgânica) (*World Health Organization*, 1991, Clarkson *et al.*, 2003). Esta exposição pode resultar de forma direta (usuário), ocupacional (consultórios odontológicos) e ambiental (lançamentos de efluentes de consultórios dentários, incineração de resíduos odontológicos e gases de emissões durante a cremação) (Zeitz *et al.*, 2002; Swain *et al.*, 2007).

A amálgama dentária foi introduzida há mais de 150 anos como material restaurador. Apesar do surgimento de novos tipos de restaurações, hoje ainda é o método mais utilizado, principalmente no serviço público de saúde, por apresentar características importantes: fácil manipulação, baixo custo e resistência ao desgaste (Clarkson *et al.*, 2003, Patiño & Filho, 2005). Seu principal componente é o mercúrio, o qual corresponde 50% do conteúdo total. Além deste, também estão presentes outros elementos metálicos, como a prata (35%), o estanho (9%), o cobre (6%) e vestígios de zinco (Mason *et al.*, 2001).

A principal via de exposição é através do trato respiratório. Cerca de 80% do Hg inalado é absorvido no sangue através dos pulmões (Bjorkman *et al.*, 1997; *World Health Organization*, 2005). Por ser lipossolúvel e altamente difusível, penetra nos tecidos biológicos com grande facilidade. Uma vez dentro das células é oxidado em mercúrio inorgânico divalente (mercúrico- Hg^{++}), o qual é extremamente tóxico e, portanto, se liga covalentemente com grupos tióis (grupo sulfidríla -SH, como cisteína) de proteínas inibindo sua atividade biológica (Clarkson *et al.*, 2007; Mutter *et al.*, 2007; Rooney, 2007) e impede o seu retorno à circulação. Este comportamento o torna mais tóxico do que os outros metais como o chumbo (Pb^{++}) e o cádmio (Cd^{++}) que formam ligações reversíveis com as proteínas, uma vez que o mercúrio se liga de forma covalente com estas. Isto poderia explicar a meia-vida prolongada do mercúrio nos tecidos (anos a décadas) principalmente no sistema nervoso central e os rins (Sugita, 1978; Hargreaves *et al.*, 1988; Opitz *et al.*, 1996; Brodtkin *et al.*, 2007).

O mercúrio liberado da amálgama também pode ser transformado em compostos orgânicos por microorganismos no trato gastrointestinal (Heintze *et al.*, 1983; Yannai *et al.*, 1991; Leistevuo *et al.* 2001). Leistevuo e colaboradores (2001) encontraram uma concentração três vezes maior de metilmercúrio em indivíduos

portadores de amálgama, em comparação com pessoas sem amálgama, embora a frequência e o tipo de consumo de peixes tenham sido idênticos em ambos os grupos.

Portanto, diversos pesquisadores apontam que a amálgama dentária é a principal fonte da concentração total de mercúrio no corpo humano (Hahn *et al.*, 1989, 1990; Danscher *et al.*, 1990; Lorscheider e Vimy, 1991; Lorscheider *et al.*, 1995; Galic *et al.* 1999, 2001). Foi observado um aumento, aproximadamente, de 2 a 5 vezes do nível de mercúrio no sangue e urina, bem como 2 a 12 vezes em vários tecidos corporais de indivíduos que possuem restaurações de amálgama quando comparados àqueles sem este tipo de restauração (Becker *et al.*, 2002; Pizzichini *et al.*, 2003; Levey *et al.*, 2004; Guzzi *et al.*, 2002, 2006). Também existem dados que demonstram a relação da liberação de mercúrio presentes na liga de amálgama com a mastigação e com o bruxismo (Leistevuo *et al.*, 2001; Berlin, 2003). Alguns órgãos americanos afirmam que é seguro o uso desse tipo de material (American Dental Association, 2003). Entretanto, Mutter e colaboradores (2007) afirmam que existem falhas metodológicas em alguns estudos que concluem que as amálgamas dentárias são seguras para os seres humanos.

Em muitos países o uso de amálgama como um material restaurador tem diminuído ao longo das últimas décadas. Por exemplo, o Reino Unido, a Alemanha e a Suécia já recomendam que não se deve colocar ou remover restaurações em mulheres no período gestacional bem como durante a amamentação (Vimy *et al.*, 1990; Oskarsson *et al.*, 1996; Bjorkman *et al.*, 1997; British Dental Health Foundation, 2003; Sato *et al.*, 2006). Esta limitação se deve ao aumento significativo da concentração de mercúrio nos tecidos, cabelos de fetos e recém-nascidos (Drasch *et al.*, 1994; Vather *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2001, 2003; Yoshida *et al.* 2002, 2004). Estudos também mostram que, de acordo com a quantidade de amálgamas das mães, as medições demonstram relação direta com os níveis de mercúrio no líquido amniótico (Luglie *et al.*, 2003) e no leite materno (Oskarsson *et al.*, 1996; Vimy *et al.*, 1997; Drasch *et al.*, 1998).

Há crescentes evidências de que as concentrações de mercúrio no sangue e na urina não representam adequadamente os níveis de mercúrio no organismo e nos tecidos (Mutter *et al.*, 2007). Muitos experimentos realizados com animais e

seres humanos mostraram níveis normais ou baixos de mercúrio no sangue, cabelo e urina, entretanto, encontraram níveis elevados no cérebro e nos rins (Hahn *et al.*, 1989, 1990; Danscher *et al.*, 1990; Vimy *et al.*, 1990; Lorscheider *et al.*, 1995; Opitz *et al.*, 1996; Drasch, 1997; Holmes *et al.*, 2003).

Também de acordo com esses relatos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve que não existem, atualmente, quaisquer meios adequados que indiquem corretamente as concentrações de mercúrio inorgânico nos órgãos críticos como o cérebro e os rins (*World Health Organization*, 1991). Afirma também que após cessar a exposição de mercúrio, as concentrações na urina ou no sangue podem ser bastante baixas, apesar das concentrações nos órgãos críticos continuarem elevadas (*World Health Organization*, 1991 e 2005).

Durante as últimas décadas houve um aumento alarmante da concentração de mercúrio no meio ambiente. A UNEP (*United Nations Environmental Program*, 2002) relata que o limiar de mercúrio quintuplicou ao longo dos últimos 25 anos. Na União Europeia (UE), o uso de restaurações de amálgama é de aproximadamente 70 mil toneladas anuais. Cálculos realizados por Hylander e colaboradores (2006a,b,c) mostraram que existem 40 toneladas de mercúrio (amálgama) nos dentes da população da Suécia, o qual resulta em excreção de 100 kg de mercúrio por ano nas águas residuais.

Como já mencionado, outro meio de exposição humana ao mercúrio é o uso do timerosal como conservante em vacinas (Clarkson *et al.*, 2003). O timerosal é um composto orgânico de mercúrio que é metabolizado no corpo humano e degradado em etilmercúrio e tiosalicilato (Geier & Geier, 2003). A sua utilização teve início em 1930 e desde então vem sendo utilizado como conservante em drogas biológicas, como vacinas e em produtos farmacêuticos cujas concentrações variam de 0,003 à 0,01% (30-100 µg/ml) (Ball *et al.*, 2001). Este composto mantém a linha de produção biológica estéril, pois impede o crescimento microbiano, como bactérias e fungos, durante a armazenagem e utilização (*World Health Organization*, 2004; U.S. FDA, 2008).

Durante vários anos, este fármaco foi utilizado como agente bacteriostático e fungistático tópico, geralmente indicado para antissepsia de pequenas escoriações e ferimentos (Prado *et al.*, 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), através da Resolução 528 de 17 de abril de 2001, proibiu o uso deste composto nos medicamentos, alegando se tratar de uma substância organomercurial e, seguindo

diretrizes internacionais, o mercúrio poderia causar risco de toxicidade aos usuários. No entanto, por falta de opção de um substituto, o timerosal ainda continua a ser empregado em vacinas por recomendação da OMS (*World Health Organization*, 2004), enquanto ainda se aguarda a escolha de um substituto que possa reunir maior eficácia e menor risco (Prado *et al.*, 2004).

A preocupação governamental sobre o timerosal como conteúdo das vacinas surgiu primeiro na Europa e nos Estados Unidos no final da década de 90. Estes países recomendaram a eliminação dos conservantes organomercuriais em vacinas utilizadas para lactentes e crianças, com objetivo de limitar a exposição cumulativa do etilmercúrio a partir de uma gama de fontes, incluindo alimentos e medicamentos (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products/EMEA*, 1999). A exposição ao feto ou lactente nos primeiros 6 meses após o nascimento é de particular preocupação devido à susceptibilidade do desenvolvimento do sistema nervoso a toxicidade de mercúrio (*National Research Council*, 2000).

O *Vaccine Adverse Events Reporting System* (VAERS) é uma base de dados epidemiológica que tem sido mantida pelos Estados Unidos através do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) desde 1990 como uma ferramenta de vigilância para avaliar a segurança do conteúdo das vacinas. Foram identificados muitos estudos que associaram o uso do timerosal em vacinas com distúrbios neurológicos em crianças como: autismo (133 estudos), retardo mental (143 estudos), distúrbio de personalidade (124 estudos), ataxia (41 estudos) e perturbações em geral do desenvolvimento neurológico (374 estudos) (Geier *et al.*, 2008).

O etilmercúrio, após a administração *in vivo*, atravessa as membranas celulares e se acumula em muitos órgãos vitais, preferencialmente no cérebro, onde é convertido em mercúrio inorgânico. Este tipo de mercúrio, por apresentar um transporte menos eficiente em toda barreira hematoencefálica, resulta em maior exposição no sistema nervoso central (SNC) (Magos, 2001). Outros pesquisadores demonstraram que o Hg^{2+} apresenta meia vida biológica prolongada no SNC por vários anos, contrastando com o mercúrio orgânico que tem meia vida de dias ou semanas (Aschner & Aschner, 1990). Outro estudo, baseado em autópsias humanas, relatou que a meia-vida de Hg^{2+} no cérebro era de aproximadamente 20 anos (Sugita, 1978).

Evidências emergentes apóiam a teoria de que alguns transtornos neurológicos como o autismo podem ser resultado de uma combinação genética com a susceptibilidade bioquímica, especificamente com a redução da capacidade de excretar o mercúrio, e da sua exposição em períodos críticos de desenvolvimento infantil (Geier *et al.*, 2008). Chauhan & Chauhan (2006) sugerem que a fisiopatologia do autismo pode estar relacionada ao aumento do estresse oxidativo resultante da redução de níveis de enzimas antioxidantes provocado pelo acúmulo de Hg^{2+} no SNC.

Em contraponto com esses estudos, outros investigadores mostraram que o etilmercúrio apresenta meia vida muito mais curta que o metilmercúrio (Pichichero *et al.*, 2002). A meia vida de metilmercúrio no sangue é geralmente de 50 dias. Contudo, em crianças que receberam vacinas com timerosal, a meia vida de etilmercúrio no sangue foi de 7 a 10 dias (Smith *et al.*, 1996). Clarkson e colaboradores (2003) sugerem que o risco de danificar o cérebro como resultado da meia-vida curta de etilmercúrio é remota. Corroborando esses resultados um estudo de revisão desenvolvido por Parker e colaboradores (2004) confirmou que a meia vida de etilmercúrio é significativamente menor quando comparado com o metilmercúrio e que não há associação entre o uso de timerosal em vacinas com o autismo. Pichichero e colaboradores (2002) analisaram os níveis de mercúrio em amostras de sangue de crianças que foram vacinadas com esse composto e averiguaram que os níveis de mercúrio não excediam os limites de segurança determinado pela OMS. Além disso, eles observaram que os lactentes excretavam quantidades significativas de mercúrio nas fezes após exposição de timerosal, assim, conseguem eliminar o mercúrio de seus organismos.

Portanto, existe na literatura estudos bastante controversos em relação a maneira que timerosal e o metilmercúrio são distribuídos, metabolizados e excretados (Parker *et al.*, 2004).

A OMS (*World Health Organization*, 2004) é clara sobre essas questões e continua a recomendar o uso de vacinas contendo timerosal em programas de imunizações globais. A justificativa seria que os benefícios da utilização de tais produtos de longe superam qualquer risco teórico de toxicidade. Enfatiza a OMS que as preocupações sobre a toxicidade do timerosal são teóricas e que não existem provas científicas de um problema de segurança relacionadas com a sua utilização em vacinas, embora a percepção pública de risco tenha sido relatada em alguns

países. Em virtude das preocupações levantadas sobre o uso de timerosal em vacinas, a U.S. FDA (2008) tem trabalhado com os fabricantes para reduzir ou eliminar timerosal do seu conteúdo.

Nos Estados Unidos e Europa, desde 2002, as vacinas infantis utilizadas não contêm timerosal. Após sua retirada, diminuíram em 35% as notificações de autismo e doenças do desenvolvimento neurológico (Geier & Geier, 2006). No Canadá, a exposição dos lactentes nos primeiros 6 meses de vida pelo timerosal, foi eliminada. Porém, uma série de outras vacinas contendo este composto é licenciada e utilizada em circunstâncias especiais (Canada Communicable Disease Report/CCDR, 2002). No Brasil, de acordo com o Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais publicado em 2006, o timerosal faz parte do conteúdo de muitas vacinas como aquelas contra a varicela, vacina dupla infantil (antígenos contra difteria e tétano), *influenza* (gripe), hepatite B e vacina tríplice acelular (antígenos contra difteria, tétano e coqueluche). Tais preocupações de segurança têm conduzido às iniciativas no Brasil de eliminar, reduzir ou substituir esse conservante em vacinas. Frise-se que as três últimas vacinas citadas anteriormente já existem no mercado isentas de timerosal.

A população em geral pode estar exposta a concentrações muito baixas de Hg no ar, na água, e nos alimentos (*World Health Organization, 2008*). Mesmo em baixas concentrações, este metal pesado pode ser considerado potencialmente tóxico ao organismo humano (Azevedo, 2003). Os efeitos adversos dependem da forma química, do nível e do tempo de exposição (Zavariz & Glina, 1992; Zalups, 2000). Novas investigações são necessárias para averiguar os efeitos da exposição desse metal pesado nos tecidos e órgãos com doses semelhantes às aquelas encontradas em indivíduos que estão em contato direto e/ou indireto com peixes contaminados, amálgamas dentárias e vacinas com timerosal (Clarkson *et al.*, 2003).

O mercúrio é reconhecido como um importante problema de saúde pública há mais de 40 anos, principalmente devido aos seus efeitos sobre o desenvolvimento do sistema nervoso, conforme ocorreu nos casos trágicos de intoxicações humanas no Japão e no Iraque (Hacon *et al.*, 2008). O órgão alvo da ação do metilmercúrio é o SNC, podendo causar ou agravar doenças degenerativas (Mutter *et al.*, 2007). Este tipo de mercúrio é geralmente transportado por meio do complexo cisteína, o qual favorece o seu transporte para o interior das células endoteliais dos vasos cerebrais (Simmons-Willis *et al.*, 2002). O principal

determinante da toxicidade do mercúrio é a alta afinidade com os grupamentos sulfidrílicos (SH), presentes nos diversos sistemas enzimáticos das células, que causam danos estruturais em proteínas (Nascimento & Chasin, 2001), inibição de vários receptores e bloqueio do canal de Ca^+ em neurônios ganglionares (Weinsberg *et al.*, 1995). O mercúrio pode influenciar a atividade da colinesterase e monoamino oxidase, enzimas importantes na síntese e degradação de neurotransmissores (Basu *et al.*, 2007). Além disso, estudos correlacionaram a neurotoxicidade do mercúrio com o estresse oxidativo (Chanez *et al.*, 1989; Rajanna *et al.*, 1990; Skanker *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008). Foram encontradas em cultura de astrócitos, contendo mercúrio, elevadas concentrações extracelulares de glutamato, disfunção mitocondrial e prejuízo no estado antioxidante (Skanker *et al.*, 2005).

O sistema renal é também afetado pela ação tóxica do mercúrio, principalmente a sua forma inorgânica. O mecanismo de transporte e absorção nos rins provavelmente se dá pela sua união à glutatona, à cisteína e a outros mecanismos (Zalups, 2000). Uma das principais alterações promovidas pelo mercúrio é a perda da função glomerular (Carmignani *et al.*, 1992) e vários estudos os têm associado com alto risco de mortalidade por insuficiência renal (Zalups, 2000; Hodgson *et al.*, 2007). O mecanismo de ação pode ser relacionado com o seu acúmulo nas células epiteliais dos túbulos proximais e com a ligação no meio intracelular ou ainda na membrana plasmática dos grupos sulfidrílica, carboxila e fosforila (Girardi & Elias, 1995; Goyer, 1996). Os resultados destas interações são: inativação enzimática, inibição da síntese proteica (Bohets *et al.*, 1995), inibição da multiplicação celular, diminuição da absorção da uridina e timidina, fragmentação de DNA (Nakazawa *et al.*, 1975), indução de estresse oxidativo, peroxidação lipídica (Girardi & Elias, 1995), disfunção mitocondrial, apoptose e necrose celular (Zalups & Lash, 1994; Zalups, 2000; Carranza-Rosales *et al.*, 2005; Stacchiotti *et al.*, 2006).

Um estudo realizado em células epiteliais tubulares, isoladas de rins de cães, revelou que o mercúrio em altas concentrações é um potente indutor de apoptose via ativação de caspase-3 (Lee *et al.*, 2006). Em ratos, os efeitos nefrotóxicos de baixas concentrações de mercúrio também já foram descritos e parece envolver a atenuação da ativação do NF-kappa por esse metal (Dieguez-Acuña *et al.*, 2001). Em porcos, a exposição crônica de Hg levou ao acúmulo desse metal principalmente

no fígado e nos rins, com aumento de enzimas antioxidantes (Chen *et al.*, 2006). Pesce e colaboradores (1977) referem que indivíduos que ingeriram até 37 mg HgCl₂/kg apresentaram toxicidade renal auto-imune com glomerulonefrite, hematúria e proteinúria.

Muitos estudos têm demonstrado que os ácidos 2,3-Dimercaptopropano-1-sulfônico (DMPS) e meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), que são ditiois quelantes de metal, reduzem significativamente e eficientemente a concentração corporal de mercúrio e, por sua vez, também diminuem o risco de desenvolver insuficiência hepática e renal (Aposhian *et al.*, 1992; Zalups *et al.*, 1992; Bridges *et al.*, 2008; Zalups & Bridges, 2009). Esses quelantes agem de forma unidirecional removendo os íons de mercúrio que se localizam no interior das células do túbulo proximal do rim para o compartimento luminal do nefron. Esta extração promove uma via eficaz para a eliminação dos íons de mercúrio na urina. Até o momento, somente a U.S. FDA aprovou o uso do DMSA em humanos (Zalups & Bridges, 2009).

Outros órgãos e sistemas também podem ser afetados pelo mercúrio. Em estudos com animais tratados com cloreto de mercúrio, Rao e colaboradores (2001) verificaram queda na função reprodutiva, infertilidade, motilidade e alteração da quantidade de espermatozóides. Outro sistema que também pode ser afetado é o respiratório, em que os efeitos da intoxicação aguda pela exposição aos vapores de Hg podem ser: edema pulmonar, pneumonia intersticial, fibrose, congestão (Bluhm *et al.*, 1992; Taueg *et al.*, 1992). Os sintomas gastrointestinais da intoxicação aguda são bem documentados e se caracterizam principalmente por um quadro de gastroenterite aguda seguida de fortes dores abdominais, diarreia, hemorragia digestiva, estomatite, náuseas e vômitos (Pinheiro *et al.*, 2007). Há ainda relatos de danos no sistema hematológico, imunológico, dérmico, hepático e alguns estudos relacionam a exposição ao metal com aumento da incidência de câncer (Gleichmann *et al.*, 1989; Crespo-Lo'pez *et al.*, 2007). Inúmeros estudos sobre os efeitos tóxicos do mercúrio têm sido demonstrados em animais e em humanos sobre o sistema cardiovascular, nos últimos 20 anos.

Tradicionalmente as populações consomem peixes por associarem benefícios à saúde, pois estudos mostram que reduz a taxa de mortalidade por doenças cardíacas por apresentarem uma fonte rica de ácidos graxos poliinsaturados (Omega 3), proteínas, vitamina D e selênio (Burr *et al.*, 1989; Oomen *et al.*, 2000;

Kris-Etherton *et al.*, 2002; Mozaffarian & Rimm, 2006). A ingestão de peixes contaminados com mercúrio pode contrabalancear os efeitos benéficos, uma vez que estudos demonstram que níveis elevados atenuam o efeito cardioprotetor dos ácidos graxos (Rissanen *et al.*, 2000; Virtanen *et al.*, 2005 e 2007). Em um estudo prospectivo populacional realizado na região oriental da Finlândia, onde tradicionalmente há elevado consumo de peixe, foi observada forte correlação positiva entre os níveis de Hg encontrado no cabelo e na urina, com a deficiência de selênio e a peroxidação lipídica, o que provoca acelerada progressão da aterosclerose em carótidas e risco do IAM (Salonen *et al.*, 1991, 1992, 1995 e 2000). Já em outro estudo europeu, foi observada uma relação direta entre as concentrações de mercúrio e o risco do IAM, medido em amostras de unha (Guallar *et al.* 2002). Outra pesquisa realizada com a população local da Amazônia observou o aumento da pressão arterial sistólica com níveis de mercúrio no cabelo acima de 10 µg/g (Fillion *et al.*, 2006). Choi e colaboradores (2009) confirmaram que mariscos contaminados por MeHg podem promover o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estudos têm demonstrado que a exposição crônica a baixas doses de MeHg pode estar associado à hipertensão arterial, mantendo-se por muitos meses após cessada a exposição (Boffetta *et al.*, 2001). Efeitos cardiovasculares também têm sido observados em crianças. Sørensen e colaboradores (1999) relataram aumento da pressão arterial sistólica e diastólica em crianças de 7 anos de idade quando comparadas a exposição pré-natal ao MeHg.

A U.S EPA (*United State Environmental Protection Agency*, 2005) e Organização mundial da saúde (*World Health Organization*, 2008) afirmaram que os dados científicos sobre o impacto do metilmercúrio com o risco de eventos cardiovasculares continuam incertos, não os considerando adequados para esta avaliação, alegando que o consumo de peixes traz benefícios cardiovasculares. Os resultados apresentados por Hallgren e colaboradores (2001) mostraram que os efeitos protetores do ômega 3 são superiores ao possível efeito tóxico do mercúrio sobre o sistema cardiovascular. Da mesma forma, não foi encontrada correlação entre mercúrio e doença arterial coronariana através da análise coletada nas unhas dos profissionais da saúde (Yoshizawa *et al.*, 2002). König e colaboradores (2005) observaram que o consumo de pequenas quantidades de peixes está associado com a redução do risco de infarto agudo do miocárdio (IAM).

Trabalhos realizados com a exposição de outras formas de mercúrio e com concentrações variadas também foram relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Oka *et al.*, 1979; Su & Chen, 1979; Carmignani *et al.*, 1983; Rhee & Choi, 1988; Massaroni *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1994; Salonen *et al.*, 1995; Rossoni *et al.*, 1999; Vassallo *et al.*, 1999; National Research Council, 2000; Cunha *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2003; de Assis *et al.*, 2003; Falcochio *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2009).

Estudos realizados em aposentados mineiros na Espanha, Eslovênia, Itália e Ucrânia sugerem uma possível associação entre o emprego do mercúrio na mineração e refinação com alguns grupos de risco doenças cardiovasculares (Kosta *et al.*, 1975; Boffetta *et al.*, 2001). Achados semelhantes foram relatados sobre dentistas aposentados da Suécia (Nylander & Weiner, 1991).

Após a exposição ao vapor de mercúrio e, posteriormente, à remoção de amálgama dentária, a concentração sanguínea pode atingir de 5 a 18 nM (Langworth *et al.*, 1997; Bjorkman *et al.*, 1997). Estudos realizados com pequenas concentrações como estas para avaliar se há risco de exposição ocupacional são escassos principalmente no sistema vascular. São encontrados estudos com concentrações acima desses níveis, os quais deparam-se com alterações fisiopatológicas. A exposição aguda ao mercúrio (HgCl_2) favorece o aparecimento de arritmias, reduz a atividade eletromecânica, a condução atrioventricular, a pressão sistólica e aumenta a atividade neurotransmissora autonômica em corações isolados a concentrações micromolares (0.5, 1, 2 e 10 μM) (Massaroni *et al.*, 1992 e 1995; Vassallo *et al.*, 1999).

Não foi observada alteração na pressão arterial sistólica após tratamento crônico com pequenas concentrações de mercúrio (29 nM) (Wiggers *et al.*, 2008b) e, na administração aguda com concentrações maiores em ratos anestesiados, foram encontrados níveis reduzidos de pressão arterial (Rhee & Choi, 1988; Massaroni *et al.*, 1995), apesar da vasoconstrição arterial induzida pelo mercúrio (da Cunha *et al.*, 2000). Esta questão foi explicada pela deterioração da função mecânica cardíaca (Oliveira *et al.*, 1994; Su & Chen, 1979; Halbach, 1990) e hipertensão pulmonar observada (Rossoni *et al.*, 1999). No entanto, Machado e colaboradores (2007) mostraram que a exposição aguda ao HgCl_2 (20 nM) aumenta a pressão arterial sistólica e diastólica, a frequência cardíaca e a reatividade pressórica à fenilefrina.

Os autores sugerem que este aumento da reatividade pode ser devido à formação de radicais livres.

O mercúrio é conhecido por exercer os seus efeitos, combinado com grupamento -SH (Halbach *et al.*, 1981; Halbach, 1990; Clarkson, 1993), que são essenciais para a função normal de várias proteínas que constituem as enzimas, canais iônicos ou receptores (Aoki *et al.*, 1985; Abramson & Salama, 1989; Halbach, 1990; Hulme *et al.*, 1990; Prabhu & Salama, 1990; Boraso & Williams, 1994; Chiamvimonvat *et al.*, 1995;).

Dentre as alterações funcionais promovidas pelo mercúrio muitas delas vêm acompanhadas de um ou mais processos envolvidos no mecanismo de acoplamento excitação-contração. O mercúrio inibe a atividade da Na⁺K⁺ATPase (NKA) na membrana celular (Halbach *et al.*, 1981; Anner *et al.*, 1990,1992; Anner & Moosmayer, 1992; Carmignani *et al.*, 1992), inibe a Ca⁺⁺ATPase miosínica (Moreira *et al.*, 2003); inibe a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (Hechtenberg & Beyersmann, 1991); e a Ca⁺⁺-Mg⁺⁺-ATPase (Shamoo & MacLennan, 1975). A inibição da NKA promove acúmulo de sódio intracelular. Este, por sua vez, reduz a atividade do trocador Na⁺/Ca⁺⁺, o que diminui o efluxo de Ca²⁺. A consequência final é o aumento de cálcio citosólico, principal determinante do inotropismo cardíaco (Blaustein, 1988). Tal mecanismo apresenta consistência com trabalhos que apontam que pequenas concentrações de mercúrio aumentam a resposta do miocárdio a intervenções inotrópicas (Falcochio *et al.*, 2004). Alguns estudos mostraram que a inibição da ATPase miosínica é revertida pela ação de glutatona e ditioneitol (DTT) (Moreira *et al.*, 2003; de Assis *et al.*, 2003) e pela cisteína (Vassallo *et al.*, 1999).

Em corações isolados e perfundidos pela técnica de Langendorff, a exposição aguda ao HgCl₂ (20 nM) promove um aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo (de Assis *et al.*, 2003) e um aumento, dose-dependente (0,1 a 3 µM de HgCl₂), desse parâmetro no ventrículo direito (Cunha *et al.* 2001). O mercúrio também promove uma diminuição da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo imediatamente após 30 minutos de exposição a 20 nM (de Assis *et al.* 2003). Um estudo recente realizado com esta mesma concentração, mas por meio da exposição crônica, descreveu que o mercúrio foi capaz de promover um déficit de relaxamento no ventrículo esquerdo de corações de ratos anestesiados, efeito inotrópico negativo em corações isolados, aumento da atividade ATPásica da

miosina e inibição da NKA (Furieri, 2008). A autora sugere que a inibição da atividade da NKA teria participação no aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE) em ratos anestesiados e no efeito inotrópico negativo em corações isolados, possivelmente, pelos efeitos nocivos promovidos pela sobrecarga de cálcio. E, possivelmente, a atividade específica da Ca^{2+} -ATPase miosínica aumentou como mecanismo compensatório ao “déficit” de contratilidade.

Numerosos estudos têm revelado que o mercúrio gera espécies reativas de oxigênio (EROs), induz estresse oxidativo (Wiggers *et al.*, 2008a,b) e disfunção mitocondrial (Lund *et al.*, 1993; Peraza *et al.*, 1998). A principal disfunção mitocondrial ocorre na região da ubiquinona no citocromo B, com NADH desidrogenase promovendo o deslocamento de íons Fe^{++} e Cu^{+} no centro de A3Cub do citocromo C (Figura 3). Isto resulta em despolarização e auto-oxidação no interior da membrana mitocondrial com peroxidação lipídica e grave disfunção mitocondrial. Dentre as conseqüências incluem-se: aumento de peróxido de hidrogênio, esgotamento de glutatona mitocondrial por mais de 50%, aumento de marcadores de peroxidação lipídica, tais como TBARS, por mais de 70%, a oxidação da pirimidina, como a molécula NADPH, e alterações na homeostase de cálcio (Lund *et al.*, 1993; Peraza *et al.*, 1998; Shenker *et al.*, 1998). Esta grave disfunção mitocondrial aumenta o estresse oxidativo e reduz as defesas de antioxidantes, criando importantes implicações para a saúde (Houston, 2007).

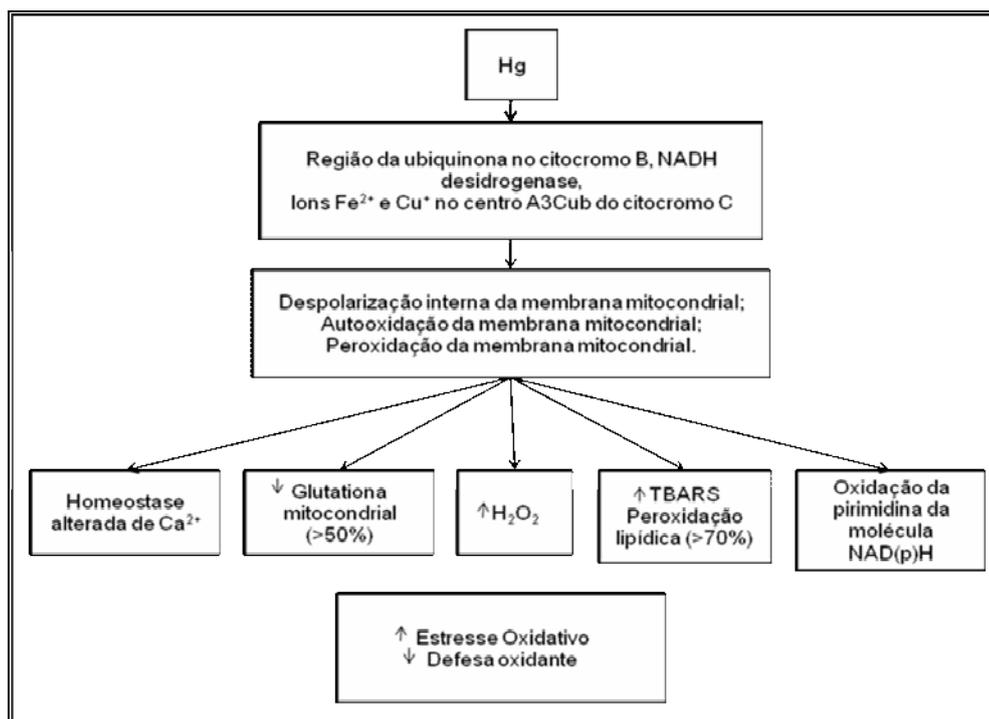


Figura 3: Toxicidade do mercúrio gera disfunção mitocondrial e induz estresse oxidativo. Modificado de Houston, 2007.

Outra forma de o mercúrio induzir a peroxidação lipídica inclui é a reação de Fenton, afinidade por grupos sulfidril e deficiência de selênio (Salonen *et al.*, 1995). O Hg serve como um catalisador direto nas reações de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$) e como um catalisador indireto, provavelmente, por ocupar o sítio do ferro, desencadeando a reação que culmina com a produção de radical hidroxil (OH^\bullet). Além disso, a união do grupo tiol promove destruição de componentes celulares como a glutaciona, conforme descrito anteriormente, resultando em diminuição tanto da glutaciona como da coenzima A e cisteína, que são importantes mecanismos celulares antioxidantes. Por último, a formação de complexos insolúveis de mercúrio com selênio reduz sua disponibilidade e prejudica a função antioxidante do mesmo, que é um cofator necessário para a atividade da glutaciona peroxidase para quebrar peróxidos de hidrogênio e de diversos outros produtos tóxicos da peroxidação (Houston, 2007; Virtanen *et al.*, 2007). Assim, a capacidade antioxidante no plasma e intracelular é reduzida (Salonen *et al.*, 1995). O endotélio vascular é altamente sensível ao estresse oxidativo. O estabelecimento deste pode causar disfunção endotelial, a qual é frequentemente observada em doenças cardiovasculares com hipertensão arterial e a arterosclerose (Touyz, 2004; Félétou & Vanhoutte, 2006).

O selênio tem-se mostrado eficaz na inativação do mercúrio no trato intestinal de ratos quando as duas substâncias foram administradas simultaneamente, ou seja, a absorção de mercúrio foi reduzida (Seppanen *et al.*, 1998). Este resultado pode ser importante para a saúde pública, pois o selênio pode regular os níveis de mercúrio no organismo (Virtanen *et al.*, 2007).

A exposição do mercúrio em concentrações nanomolares altera a função cardíaca, mas esses efeitos ainda precisam ser investigados no sistema vascular. Através do uso de concentrações variadas de mercúrio, em modelos animais, verificou-se que este metal pesado induz alteração no tônus vascular. Os efeitos agudos do mercúrio incluem a vasodilatação em artérias aorta e pulmonar quando expostas a concentrações milimolares (Golpon *et al.*, 2003). No entanto, estudos demonstraram que, em doses menores (0,5-10 μ M e 6 nM), o mercúrio induz a vasoconstrição em artérias caudais de ratos (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008a). Partes destes efeitos são mediadas pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, de prostanóides da via ciclooxigenase e da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008a).

Para compreender os efeitos da exposição ao mercúrio nos vasos sanguíneos, é necessária uma breve revisão sobre o endotélio vascular e das substâncias liberadas que participam na regulação do tônus vascular.

1.2 O ENDOTÉLIO VASCULAR

O endotélio é constituído por uma monocamada de epitélio pavimentoso localizada entre o sangue e a camada média do músculo liso vascular. Está estrategicamente situado na parede vascular para atuar como sensor de alterações hemodinâmicas; transmitir sinais que recebe de células e da matriz extracelular; produzir mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte de células; manter as alterações adaptativas para a adequação às necessidades circulatórias (Carvalho *et al.*, 2001). O endotélio tem papéis múltiplos e importantes em eventos fisiológicos e fisiopatológicos, respondendo a forças mecânicas e a agentes neurohumorais, e liberando fatores contráteis e relaxantes (Vanhoutte, 2009).

Uma das principais funções do endotélio é manter a tonicidade da musculatura lisa vascular, pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina. Entre os fatores contráteis, os principais são os metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, como tromboxano A_2 (TXA₂), prostaglandinas H_2 e $F_{2\alpha}$ (PGH₂ e PGF_{2 α}) (Frolich & Forstermann, 1989, Vanhoutte, 1993); a angiotensina II; a endotelina-1 e o ânion superóxido (Schiffrin, 2001; Maturana *et al.*, 2007)

As células endoteliais, ainda secretam mediadores vasodilatadores em resposta a substâncias liberadas a partir de nervos autonômicos e sensitivos (acetilcolina, norepinefrina, ATP, substância P), hormônios circulantes (catecolaminas, vasopressina, insulina), derivados da coagulação e produtos plaquetários (serotonina, ADP, trombina), ou autacóides produzidos pelo endotélio e célula do músculo liso vascular (ADP/ ATP/ UDP) (Vanhoutte, 1999). Além disso, alterações no “shear-stress” evidenciam uma vasodilatação dependente do endotélio e de fluxo (Scott-Burden & Vanhoutte, 1993).

1.2.1 Fatores de contração derivados do endotélio

1.2.1.1 Prostaglandinas vasoconstritoras

O ácido araquidônico é formado a partir de fosfolipídios de membrana, sob ação da enzima fosfolipase A_2 (PLA₂). Uma vez liberado pode ser metabolizado pela ciclooxigenase (COX) resultando na síntese de prostaglandinas e tromboxano A_2 . Existem duas isoformas da COX, a tipo 1 (COX-1) e tipo 2 (COX-2). A COX-1 é a isoforma constitutiva, expressada pela maioria dos tecidos, sintetiza pequenas quantidades de prostaglandinas (Smith *et al.*, 1996). A COX-2 é a isoforma induzida por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores mitogênicos e endotoxinas e tem expressão relacionada principalmente com processos inflamatórios (Wu, 1995; Antman *et al.*, 2005). As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em prostaglandina H_2 (PGH₂). A PGH₂ possui atividade direta sobre a musculatura lisa vascular e quando liberada causa vasoconstrição através de sua ligação a receptores específicos na superfície da membrana, acoplados a proteína G

(Narumiya *et al.*, 1999). Esta prostaglandina é a precursora de todos os demais prostanóides, sendo vasoconstritores ou vasodilatadores (Smith *et al.*, 1996).

A PGH_2 , por ação de sintases específicas, é convertida em prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina I_2 (PGI_2), prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) ou tromboxano A_2 (TXA_2), sendo as duas últimas vasoconstritoras e as demais vasodilatadoras (Mardini & FitzGerald, 2001). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ e TXA_2 estimulam a atividade contrátil da célula muscular lisa agindo através de receptores de endoperóxidos e tromboxano acoplados a proteína Gq que levam ao aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio bem como o aumento de cálcio intracelular (Wright *et al.*, 2001).

Existe um equilíbrio da formação de prostanóides gerados pela COX para a manutenção do tônus vascular. No entanto, em algumas doenças vasculares, como na hipertensão e diabetes, foi encontrado um aumento na expressão da COX-2 (Vanhoutte *et al.*, 2005). Desta forma, pode resultar em uma maior liberação de prostanóides vasoconstritores e também de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (ânion superóxido) (Wolin *et al.*, 2000). Parece que a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela COX ocorre durante a conversão da PGH_2 em TXA_2 (Rosen & Freeman, 1984).

1.2.1.2 Endotelina

A endotelina (ET) é sintetizada pelas células endoteliais e musculares lisas. Foram identificadas três diferentes isoformas: a endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). Cada ET exerce seus efeitos após unir-se a seu receptor específico e atualmente são conhecidos três tipos de receptores denominados ET_A , ET_B e ET_C e, através de ensaios farmacológicos, alguns subtipos foram identificados: ET_{A1} , ET_{A2} , ET_{B1} e ET_{B2} . O receptor ET_A , que apresenta maior afinidade para ET-1, é expresso principalmente em células dos músculos liso vascular e cardíaco, enquanto o tipo ET_B , que tem afinidade para as 3 isoformas de ET, é expresso em células endoteliais, renais e também no músculo liso vascular. Ambos os receptores são acoplados às proteínas G. Sua ativação promove despolarização da membrana plasmática, aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , contração vascular, liberação de fatores endoteliais, síntese de DNA e crescimento celular. A ET-1 é o mais potente vasoconstritor descrito até o momento,

tanto em vasos de maior calibre quanto na microcirculação (Abassi *et al.*, 2001; Tostes *et al.*, 2008). Na célula endotelial, as ETs promovem vasodilatação e é mediada pela ativação de receptores ET_B (Kurihara *et al.*, 1994). A isoforma ET-3 e os receptores ET_B são importantes para o desenvolvimento normal dos neurônios mioentéricos (Carvalho *et al.*, 2001).

1.2.1.3 Sistema Renina Angiotensina

Outra substância vasoconstritora liberada pelos vasos é a angiotensina II, um octapeptídeo derivado da proteína precursora do angiotensinogênio através da ação sequencial de várias enzimas (Álvarez *et al.*, 2005). A cascata de produção de angiotensina II é de forma cíclica, tendo seu início com a pré-pró-renina que é um peptídeo não ativo que se transforma em pró-renina e através da proteólise celular transforma-se em renina. Esta, quando liberada, age sobre o angiotensinogênio, precursor dessa cadeia, que é clivado gerando angiotensina I que, por sua vez, sofre ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) originando a angiotensina II, um potente vasoconstrictor. Essas reações ocorrem no plasma e em vários tecidos como rins, cérebro, glândulas adrenais, ovários, músculo liso vascular e células endoteliais (Bader *et al.*, 2001; Lavoie & Sigmund, 2003). A angiotensina II é capaz de estimular a liberação de catecolaminas das terminações nervosas, a secreção de aldosterona, reduzir a diurese, natriurese e promover o crescimento do músculo liso vascular e do músculo cardíaco (Morishita *et al.*, 1992; Yamazaki *et al.*, 1996). Foi identificada outra enzima participante desse sistema, uma carboxipeptidase, denominada enzima conversora da angiotensina II (ECA II), que cliva tanto a angiotensina I como a angiotensina II em um metabólico chamado angiotensina 1-7, que tem seus efeitos opostos ao da angiotensina II (Ferreira & Santos, 2005; Lavoie & Sigmund, 2003). Outras peptidases também podem degradar a angiotensina II em angiotensina III e angiotensina 3-8 (Carey & Siragy, 2003).

A maioria dos efeitos fisiológicos da angiotensina II é mediada pela ativação de receptores do tipo 1 (AT₁), presentes nas células lisas musculares e adventícias dos vasos. Os receptores AT₂ são expressos especialmente durante o desenvolvimento fetal, e o mecanismo pelo qual exercem suas ações está relacionado à liberação de NO promovendo vasodilatação (Hourichi *et al.*, 1999) e podem também envolver a resposta inflamatória renal pela ativação de NFκB

(Esteban *et al.*, 2004). O receptor AT₄ liga-se à angiotensina IV e o receptor MAS se liga à angiotensina 1-7 (Touys & Schiffrin, 2000; Santos *et al.*, 2003; Ferreira & Santos, 2005).

Grande parte das ações exercidas no músculo liso vascular pela angiotensina II se dá através da estimulação do receptor AT₁, o qual está acoplado a proteína G_s. Assim, esses receptores ativam a fosfolipase C (PLC), formando diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃). O IP₃ eleva a concentração de Ca²⁺ intracelular e promove contração do músculo liso vascular. A DAG ativa a PKC que fosforila a bomba de Na⁺/K⁺, o trocador Na⁺/H⁺, Na⁺/Ca⁺⁺, aumentando a concentração de Na⁺ e Ca²⁺ intracelular culminando com vasoconstrição (Touyz & Schiffrin, 2000).

A angiotensina II também exerce efeito sobre o leito vascular por meio da ativação da NADPH oxidase, liberando radicais livres (Suzuki *et al.*, 2005), e também estimula a liberação de prostaglandinas através da ativação da fosfolipase A₂ (Freeman *et al.*, 1998).

1.2.1.4 Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em todas as células aeróbicas e caracterizam-se por ter elétrons desemparelhados. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados, possuem uma instabilidade elétrica muito grande e, por esta razão, apresentam grande capacidade reativa. A fim de captar um elétron para sua estabilização, é capaz de reagir com qualquer composto que esteja próximo independente de ser uma molécula, uma célula, ou tecido do organismo. Desse modo, acontecem as reações em cadeia de lesão celular. Devido a esta característica, é denominado de substância oxidante. O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. A formação de EROs pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessárias no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias, a fim de gerar o ATP (energia). Também existem outras fontes geradoras de EROs como as xantinas oxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases, NOS na falta de substratos ou cofatores e pela NADPH oxidase (NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Mueller *et al.*, 2005; Bedard & Krause, 2007; Koh *et al.*, 2009). O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário. Portanto, são dependentes do

balanço entre o sistema oxidante e antioxidante (Soccio *et al.*, 2005; Szasz *et al.*, 2007).

A produção $O_2^{\cdot-}$ ocorre pela redução de um elétron do oxigênio molecular e mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantina oxidase. O $O_2^{\cdot-}$ pode agir como um agente oxidante, sendo reduzido a H_2O_2 enzimaticamente ou espontaneamente, ou pode agir como agente redutor, doando o seu elétron extra ao NO para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (Ellis & Triggle, 2003). Em condições fisiológicas, diferentes isoformas de enzima superóxido dismutase (SOD) asseguram que a primeira reação ocorra preferencialmente (Beckman *et al.*, 1994), sendo a isoforma SOD extracelular (ECSOD) mais encontrada nos vasos. Contudo, em condições de estresse oxidativo, quando as células são expostas a níveis excessivos de EROs, quantidades significativas de $O_2^{\cdot-}$ reagem com o NO para formar $ONOO^-$ (Rubany & Vanhoutte, 1986). Nesse caso, haverá uma diminuição da biodisponibilidade de NO endotelial, diminuindo o seu efeito vasorrelaxante, somado ao próprio efeito vasoconstritor do $O_2^{\cdot-}$ (Auch-Schwelk *et al.*, 1989; Cosentino *et al.*, 1994), além das conseqüências deletérias do $ONOO^-$ (Beckman *et al.*, 1994). O $O_2^{\cdot-}$ pode atuar diretamente causando vasoconstrição através da ativação da PKC (Knapp & Klann, 2000), da estimulação da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, da inibição da Ca^{2+} -ATPase da membrana celular e do aumento da afinidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} (Wolin *et al.*, 2002). O $ONOO^-$, no endotélio vascular, estimula a COX, aumentando a síntese de prostaglandinas vasoconstritoras (Zou *et al.*, 1999). Além disso, o $ONOO^-$ pode gerar radicais livres como o radical hidroxil (OH^{\cdot}) que são altamente tóxicos e reativos (Wolin *et al.*, 2002). Existem evidências na literatura de que, em condições patológicas, como na hipertensão arterial, a produção de NO não é alterada, mas sim a sua biodisponibilidade devido à inativação oxidativa resultante da excessiva produção de $O_2^{\cdot-}$ na parede vascular (Kojda & Harrison, 1999).

O H_2O_2 é hidrolisado pela ação da glutathiona peroxidase (GPx) ou da catalase e pode ser precursor de outros radicais como o OH^{\cdot} . Trabalhos realizados em animais e humanos evidenciaram que o H_2O_2 pode induzir vasoconstrição ou vasodilatação dependendo do tecido, da condição experimental e da concentração estudada (Ellis & Triggle, 2003). Esse radical livre atua como um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Matoba *et al.*, 2000; Shimokawa *et al.*, 2005) por ativar canais de potássio dependente de Ca^{2+} (Kca) (Barlow & White, 1998,

2000; Hayabuchi *et al.*, 1998), canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) (Wei *et al.*, 1996) e pela ativação da guanilato ciclase no músculo liso vascular (Wolin, 2000). Porém, o H_2O_2 também pode induzir contração dependendo do leito vascular e das condições experimentais estudadas (Sheenan *et al.*, 1993; Jin & Rhoades, 1997). Essa ação é mediada pela ativação das tirosinas quinases em artérias pulmonares de ratos (Jin & Rhoades, 1997), várias formas de fosfolipases em artérias pulmonares de coelho (Sheenan *et al.*, 1993), as quais são precursores dos produtos da ciclooxygenase (Gao & Vanhoutte, 1993; Natarajan *et al.*, 1998). Assim como a H_2O_2 , o OH^- tem ação vasodilatadora mediada pela PKC e vasoconstritora pela ação na guanilato ciclase solúvel (Marín & Rodríguez-Martínez, 1995).

1.2.2 Fatores relaxamento derivados do endotélio

1.2.2.1 Óxido Nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki descobriram que o endotélio liberava um fator capaz de modular o tônus vascular, através da liberação de algum fator vasodilatador difusível, o qual chamaram de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Estudos subsequentes realizados pelo próprio Furchgott em 1984 e confirmados posteriormente por Palmer e colaboradores (1987), admitiram que o EDRF era NO.

Dentre as substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio, o NO representa um dos mais importantes participantes da regulação do tônus vascular. Além de ser um potente vasodilatador, possui uma ação inibitória sobre a agregação e adesão plaquetária à parede vascular e inibe a proliferação celular (Kubes *et al.*, 1991; Moncada *et al.*, 1991; Heller *et al.*, 1999).

O NO é um radical livre em estado gasoso que se difunde facilmente pelas membranas celulares promovendo efeitos vasodilatadores. Esse radical livre é sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, o qual é convertido em L-citrulina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991). Para que ocorra esta reação, as NOS utilizam como cofatores a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida – NADPH), a tetrahydrobiopterina (BH_4), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina

mononucleotídeo (FMN) (Palmer *et al.*, 1987; Angus & Cocks, 1989; Moncada *et al.*, 1991).

Existem três diferentes isoformas conhecidas da NOS: a NOS endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS) (Forstemann *et al.*, 1993, 1994). Tanto a eNOS quanto a nNOS são expressas de maneira constitutiva e sua ativação é dependente da formação do complexo cálcio-calmodulina (Long & Stone, 1985). Já a iNOS se expressa principalmente sob condições patológicas, tais como em processos inflamatórios, e sua ativação é independente do aumento intracelular de cálcio, uma vez que ela se encontra fortemente ligada à calmodulina (Cho *et al.*, 1992).

A produção do NO via ativação da eNOS pode ser estimulada por ação de moléculas de sinalização como a acetilcolina, catecolaminas, adenosina difosfato (ADP), substância P, agregação plaquetária, e por estímulos físicos, como a força de cisalhamento (*shear stress*) (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991; Marín & Rodríguez-Martínez, 1997). O NO liberado pelas células endoteliais se difunde rapidamente para o músculo liso vascular e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel que converte a trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c) (Carvajal *et al.*, 2000). Este, por sua vez, estimula a quinase dependente de GMP cíclico (PKG) que por diversos mecanismos promove um relaxamento da musculatura lisa vascular (Rapoport & Murod, 1983; Ignarro & Kadowitz, 1985). A PKG ativa canais de K⁺ dependentes de Ca²⁺ que inibem a entrada de Ca²⁺ do conteúdo extracelular pelos canais para cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana e promovendo o relaxamento (Lincoln *et al.*, 2001).

A PKG pode atuar na Ca²⁺ATPase da membrana plasmática ativando a saída de cálcio e no retículo sarcoplasmático (SERCA) estimulando sua recaptação. A PKG fosforila a cadeia leve da miosina (MLCK) inibindo sua atividade e diminuindo a contração muscular lisa vascular (Marín & Rodríguez, 1997; Lincoln *et al.*, 2001).

O NO, após a liberação, possui meia-vida curta e, como mencionado anteriormente, pode reagir com O₂^{•-} e resultar em perda da sua atividade vasodilatadora (Gryglewski *et al.*, 1986; Rubanyi & Vanhoutte, 1986) pela formação de ONOO⁻ e OH⁻ (Beckman *et al.*, 1990; Hui & Padmaja, 1993).

1.2.2.2 Prostaciclina

A prostaciclina (PGI_2) é um eicosanóide derivado do metabolismo do ácido araquidônico. Sob ação da COX, o ácido araquidônico livre é convertido a prostaglandina G_2 (PGG_2) e posteriormente a prostaglandina H_2 (PGH_2). Esta, por sua vez, sofre ação de enzimas específicas e dá origem às demais prostaglandinas. Sob ação da prostaciclina sintase, ela é convertida em PGI_2 . Sua síntese é estimulada por estiramento da parede vascular, acetilcolina, bradicinina, substância P, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e trombina (Gryglewski *et al.*, 1988). A atividade depende da presença de receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular. A estimulação dos receptores da PGI_2 induz a ativação da adenilato ciclase e, conseqüentemente, ao aumento de AMPc (mono fosfato cíclico de adenosina). Além desses, também estimula a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) no músculo liso vascular. A PKA tem um efeito semelhante a PKG, podendo ativar canais de K^+ sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização e estimular a saída de Ca^{2+} do citosol inibindo a maquinaria contrátil. Além da função vasodilatadora, possui grande atividade anti-plaquetária (Parkington *et al.*, 1995; Davidge, 2001).

1.2.2.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Além do NO e da PGI_2 , o endotélio vascular libera um terceiro fator relaxante que produz hiperpolarização no músculo liso vascular, resistente a inibidores da ciclooxigenase e da NOS (Bolotina *et al.*, 1994; Félétou & Vanhoutte, 1996). A contribuição de EDHF para a vasodilatação dependente do endotélio é maior nos vasos sanguíneos de resistência do que nas grandes artérias (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997). Em geral, a liberação de EDHF pode ser estimulada pelo aumento do cálcio intracelular e que, uma vez liberado, induz vasodilatação por meio da abertura de canais para potássio ativado por cálcio (Félétou & Vanhoutte, 2006). Em seqüência, essa hiperpolarização endotelial é transmitida para o músculo liso vascular através do acoplamento elétrico direto das junções mioendoteliais (*gap junctions*) e/ou por liberação de íons K^+ pelo endotélio ativando canais de K^+ de larga condutância ou da ativação da bomba de Na^+K^+ -ATPase do músculo liso vascular (Félétou & Vanhoutte, 2006).

Foram detectados quatro tipos de canais de K^+ expressos no músculo liso vascular: os canais de K^+ voltagem dependente (K_V); os canais de K^+ de larga

condutância ativados por alterações de cálcio intracelular (BK_{Ca}), os canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) e os canais de K^+ retificador (K_{ir}) (Félétou & Vanhoutte, 2006). Esses canais contribuem para a manutenção do potencial de membrana, por meio do efluxo de K^+ , resultando na hiperpolarização da membrana. Esse efeito é seguido do fechamento de canais de Ca^{2+} voltagem dependente e, desta forma, da redução da entrada de Ca^{2+} e vasodilatação (Nelson & Quayle, 1995), assim como a inibição desses canais de K^+ levam à despolarização da membrana e à vasoconstrição. As substâncias que promovem a hiperpolarização do músculo liso vascular através do estímulo desses canais são: o NO, a PGI_2 , a substância P, a bradicinina, o peptídeo natriurético tipo C, o H_2O_2 , o potássio, os metabólicos da via do ácido araquidônico-lipoxigenases e da via do ácido araquidônico-citocromo P450 (ácidos epoxieicosatrienóicos, EETs) (Félétou & Vanhoutte, 2006).

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio preciso entre a liberação de todos esses fatores, sendo mais importante a produção dos fatores relaxantes mais importantes, sobrepujando o efeito dos agentes contráteis. Esse equilíbrio é alterado com uma conseqüente atenuação dos efeitos vasodilatadores do endotélio em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, na diabetes mellitus, na aterosclerose (Triggle *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2004). A redução desse relaxamento constitui umas das causas de disfunção endotelial. Os mecanismos implicados na disfunção endotelial são multifatoriais e podem ser devidos à diminuição na liberação de NO, prostaciclina e/ou EDHF; a redução da sensibilidade no músculo liso vascular a estas substâncias; a disfunção na via de transdução de sinais dos fatores relaxantes endoteliais; ao aumento da produção de fatores contráteis derivados do endotélio e dentre outras (Carvalho *et al.*, 2001; Maturana *et al.*, 2007).

Em síntese, foi relatado que as intoxicações com o mercúrio podem causar danos ao sistema cardiovascular (Vassallo *et al.*, 1999; da Cunha *et al.*, 2000; Assis *et al.* 2003; Furieri, 2008). Estudos realizados em diferentes tipos de leitos vasculares verificaram que a exposição a este metal pesado promove aumento do estresse oxidativo e conseqüentemente disfunção endotelial (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008b). Esses autores verificaram também que a intoxicação induz alterações vasculares comparadas àquelas produzidas pelos fatores de risco cardiovascular como diabetes e hipertensão.

Muito embora a maioria dos estudos avalie o efeito tóxico do mercúrio em altas concentrações (milimolares), pouca atenção tem sido dada às suas ações em concentrações menores. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos considera segura as concentrações sanguíneas de até 5,8 ng/ml (21 nM) (National Academy of Sciences, 2000; Rice, 2004; Stern, 2005). Entretanto, alguns estudos relataram que a exposição de indivíduos a concentrações aproximadas, como 20 nM e 29 nM, ocasiona danos celulares (Furieri, 2008; Wiggers *et al.*, 2008b).

Sabe-se que a população em geral está exposta ao mercúrio por 3 principais fontes: o consumo de peixes contaminados, o uso e manipulação de amálgamas dentárias e o timerosal contido em vacinas. Dessa forma, os indivíduos estão expostos continuamente a concentrações baixas de mercúrio, sendo que pouco se sabe sobre seus efeitos no organismo. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o uso de concentrações bem menores do que as consideradas atóxicas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Para tanto, foi realizada uma exposição aguda de baixa concentração de mercúrio (6 nM) em aorta de ratos visando investigar possíveis danos vasculares.



OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito agudo de 6 nM de HgCl₂ sobre a reatividade vascular na aorta de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar efeitos da exposição aguda a 6 nM de HgCl₂ em segmentos isolados de aorta torácica sobre:

- A reatividade vascular à fenilefrina;
- A participação endotelial na resposta vascular à fenilefrina;
- O relaxamento dependente e independente do endotélio;
- A participação do óxido nítrico, das espécies reativas do oxigênio, do sistema renina angiotensina e dos prostanóides derivados da COX na reatividade vascular à fenilefrina.



MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 250 e 300 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Tais animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da EMESCAM- CEUA 004/2007.

3.2. METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Amental[®]) na dose de 50 mg/kg intraperitoneal e, em seguida, eutanaziados e exangüinados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Esta solução foi mantida com pH 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3,5 a 4 mm de comprimento. Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a 36 ± 0,5 °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que

fiquem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (GRASS® Force-displacement transducer FT03, Mass) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA) e este a um computador (PC Pentium) (Figura 4).

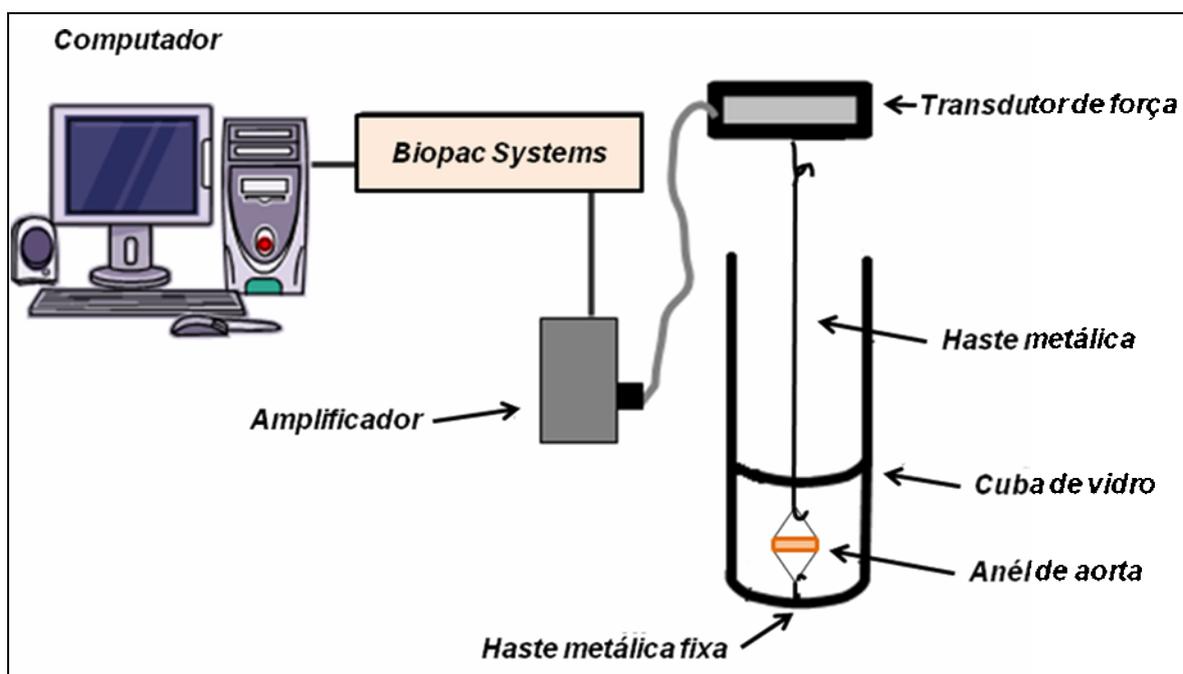


Figura 4: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular *in vitro*. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado de Dias, 2007).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,9 a 1,3 gramas, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura 5 A).

3.2.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 5 B, C). Assim, os anéis

que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 5 D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de aproximadamente 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 5 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (0.9 a 1,3 gramas) e, depois de 30 minutos (Figura 5 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

3.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M (concentração que induziu aproximadamente 75 % da contração máxima ao KCl 75 mM). Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (10^{-5} M) foi aplicada (Figura 5 I, J, L). Os anéis que relaxaram menos que 80% do platô eram descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10% ou até contraíram.

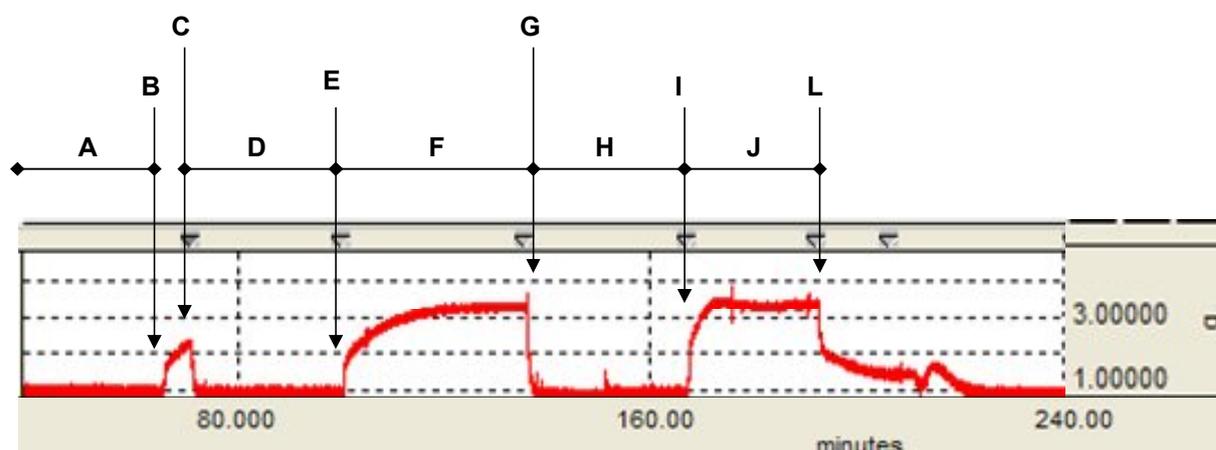


Figura 5: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. **Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl:** **A)** Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); **B)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **C)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **D)** Período de estabilização (30 min); **E)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **F)** Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); **G)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **H)** Período de estabilização (30 min). **Avaliação da integridade funcional do endotélio:** **I)** Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; **J)** Platô da contração induzida pela Fe; **L)** Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em

minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007).

3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, os anéis foram lavados três vezes para atingir o valor basal e depois de 30 minutos de estabilização era administrada ao banho uma pequena concentração do cloreto de mercúrio (HgCl_2 , 6 nM).

Para analisar o efeito da administração aguda de HgCl_2 , a amostra de um mesmo rato foi dividida em dois grupos: o grupo que recebeu o metal pesado e o grupo controle, sendo que ambos permaneceram por 45 minutos de estabilização e a partir daí foi dado início os protocolos experimentais.

3.3.1 Efeito da administração aguda do cloreto de mercúrio (HgCl_2 , 6 nM) sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Foi investigado o efeito do HgCl_2 na reatividade vascular à fenilefrina, calculada como o percentual de resposta ao KCl 75 mM. Para isto, foi realizada curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10^{-5} M induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina. A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentrações-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M).

3.3.2 Avaliação da administração aguda do cloreto de mercúrio (6 nM) na resposta de relaxamento dependente do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contraindidos com fenilefrina 10^{-6} M, concentração que foi capaz de induzir aproximadamente 50% da resposta máxima induzida pelo KCL (75 mM). Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10^{-10} a 10^{-4} M).

3.3.3 Avaliação da administração aguda do cloreto de mercúrio (6 nM) na resposta de relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraindidos com fenilefrina 10^{-6} M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta a esse agonista em concentrações de 10^{-11} a $3 \cdot 10^{-7}$ M.

3.3.4 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no efeito do cloreto de mercúrio (6 nM) sobre a resposta à fenilefrina na aorta

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste ponto, foram realizados da mesma forma. Após 15 minutos da administração do HgCl_2 , o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos, e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M). Assim, a permanência total da incubação com o HgCl_2 foi de 45 minutos (Figura 6). O efeito dos fármacos indicados acima foi avaliado simultaneamente na ausência de mercúrio em outro anel isolado de aorta torácica, obtido do mesmo rato.

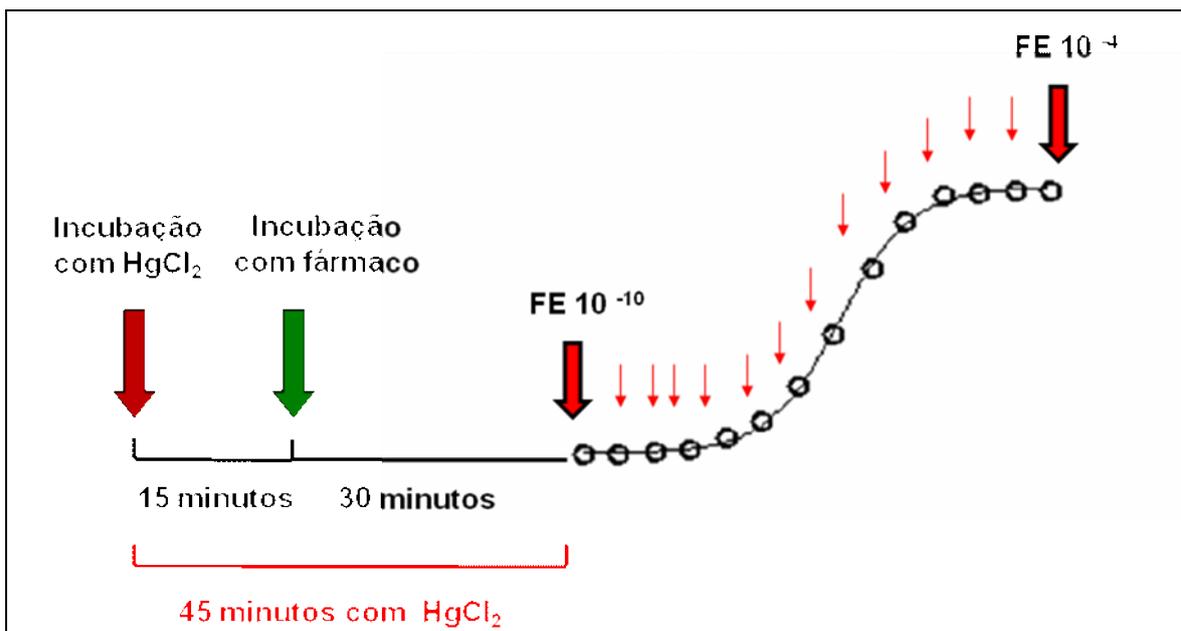


Figura 6: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com HgCl_2 após 15 minutos foi adicionado o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M). O efeito do fármaco em estudo foi simultaneamente avaliado na condição controle (ausência de HgCl_2). HgCl_2 (cloreto de mercúrio), FE (fenilefrina).

3.3.4.1 Influência de 6 nM do cloreto de mercúrio na liberação basal de óxido nítrico

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N^{O} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, $100 \mu\text{M}$). A liberação basal de óxido nítrico foi avaliada indiretamente pelo aumento, dependente do endotélio, na contração à fenilefrina induzida pelo L-NAME em relação ao seu controle. Foi, então, estimada da seguinte forma: considerando-se a contração à fenilefrina como sendo 100%, a quantidade de óxido nítrico liberado em condições basais foi a diferença entre a contração induzida pelo L-NAME e a induzida pela fenilefrina, corrigidos pela porcentagem. Para estimar a biodisponibilidade de NO, foi calculada a diferença das áreas abaixo da curva de fenilefrina, na ausência e na presença de HgCl_2 , associada ao L-NAME ($100 \mu\text{M}$) em relação à situação controle.

3.3.4.2 Envolvimento de radicais livres no efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina na aorta torácica

Para verificar o envolvimento de EROs sobre a administração aguda de baixa concentração de HgCl_2 na resposta contrátil à fenilefrina foram utilizados dois agentes anti-oxidantes: a apocinina (Apo, 100 μM), é um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, ou seja, inibe uma das principais enzimas formadoras de radicais livres e a superóxido dismutase (SOD, 150 U ml^{-1}), é um importante anti-oxidante fisiológico que converte ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Para avaliar a liberação de radicais livres com uso de HgCl_2 , de maneira indireta usando os agentes anti-oxidantes citados acima, foi calculada a diferença das áreas abaixo da curva de fenilefrina em relação à situação controle.

3.3.4.3 Envolvimento da Angiotensina II local sobre o efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina na aorta torácica

Buscando averiguar uma possível participação da via da angiotensina II local no efeito agudo do HgCl_2 sobre a reatividade vascular à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M), foi utilizado o enalapril (10 μM), um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA).

Em seguida, mediante outro protocolo, foi avaliada a participação da ativação dos receptores AT_1 pela angiotensina II através do bloqueio farmacológico destes receptores com o losartan (10 μM).

3.3.4.4 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre o efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina na aorta torácica

Com a finalidade de estudar a participação de prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, os anéis isolados de aorta foram incubados com indometacina (10 μM), um inibidor não específico da enzima ciclooxigenase (COX).

Foi calculada a diferença das áreas abaixo da curva de fenilefrina em relação à situação controle para analisar o envolvimento dos prostanoídes sobre o efeito do HgCl₂ na resposta contrátil à fenilefrina.

3.4. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

As respostas contráteis ao KCl e à fenilefrina foram expressadas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, evocadas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina.

Para a determinação dos valores de resposta máxima (R_{máx}) e pD₂ (-log EC₅₀, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAAC) de concentração-resposta à fenilefrina. A dAAC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AAC (dAAC%) da curva controle correspondente.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

3.5. FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, Cloridrato (Sigma)
- Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma)

- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- Bicarbonato de Sódio (Merck)
- Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)
- Cloreto de Mercúrio (Sigma)
- Cloreto de Potássio (Merck)
- Cloreto de Sódio (Merck)
- Enalapril (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Glicose (Merck)
- Indometacina (Sigma)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Nitroprussiato de Sódio, Dihidratado (Fluka)
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado (Merck)
- Superóxido Dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)
- Tiopental Sódico (Amental[®])
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (Sigma)

Todas as soluções, com exceção da indometacina, foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C. A indometacina foi diluída em tampão Tris 0.1M.



RESULTADOS



4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO CLORETO DE MERCÚRIO (6 nM) SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS

A fenilefrina aumentou de maneira concentração-dependente o tônus basal de anéis isolados de aorta nos dois grupos estudados. A exposição aguda de HgCl₂, após 45 minutos, foi capaz de potencializar a resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) à fenilefrina em anéis isolados com endotélio intacto (E+), ou seja, aumentou a reatividade vascular à fenilefrina quando comparada ao grupo controle (Tabela 1; Figura 7).

Tabela 1: Valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta intactos de ratos Wistar na ausência (CT E+) e na presença do HgCl₂ 6 nM (HgCl₂ E+).

	R _{máx} (g)	pD ₂
CT E+	93,5 ± 2,52	6,47 ± 0,08
HgCl₂ E+	117 ± 3,45 *	6,77 ± 0,10 *

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. **p* < 0,05; pD₂ e R_{máx}: HgCl₂ E+ vs CT E+.

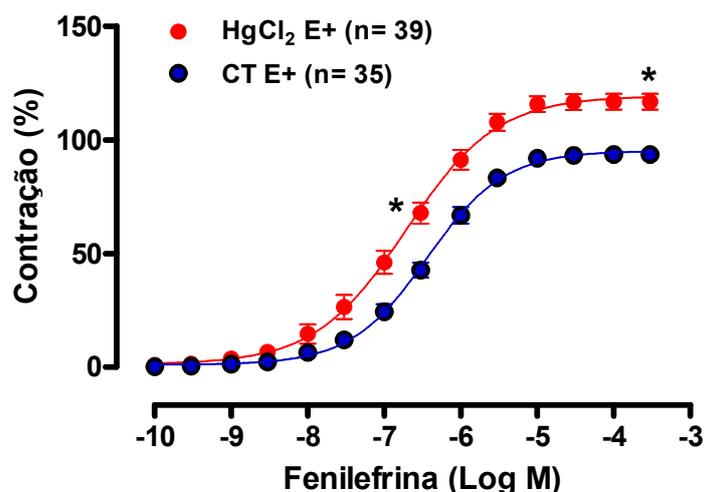


Figura 7: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar no controle (CT E+) e após a administração aguda de 6 nM de HgCl₂, por 45 min (HgCl₂ E+). O número de animais usados está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média ± EPM; Teste *t* não-pareado. **p* < 0,05 para pD₂ e R_{máx}: HgCl₂ E+ vs CT E+.

4.2 MODULAÇÃO ENDOTELIAL DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO CLORETO DE MERCÚRIO (6 nM) SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

Como esperado, a remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil à fenilefrina nos dois grupos estudados, porém não apresentou alteração da R_{máx} e da pD₂ após a incubação com HgCl₂ quando comparado ao grupo controle (Tabela 2; Figura 8).

Tabela 2: Resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) à fenilefrina em anéis isolados de aorta sem endotélio na ausência (CT E-) e na presença de HgCl₂ (HgCl₂ E-).

	R _{máx} (g)	pD ₂
CT E-	128 ± 3,08	8,06 ± 0,04
HgCl ₂ E-	129 ± 3,37	8,34 ± 0,24

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado. *p* > 0,05.

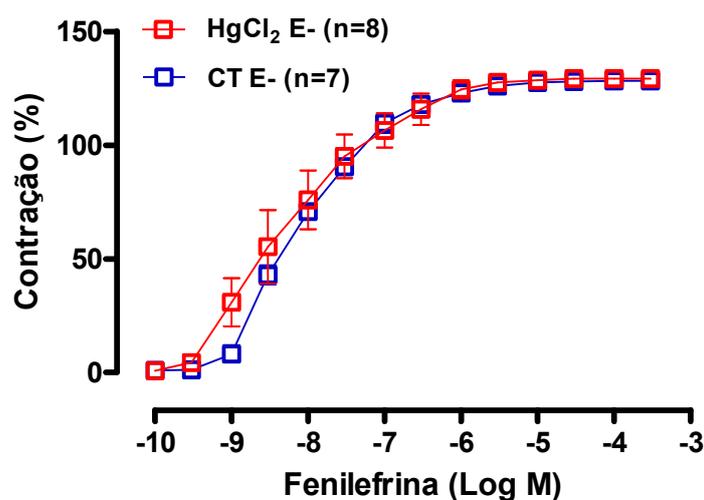


Figura 8: Efeito da remoção do endotélio (E-) na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar antes (CT E-) e após incubação com 6 nM de HgCl₂, por 45 min (HgCl₂ E-). O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média ± EPM. Teste *t* não-pareado. $p > 0,05$.

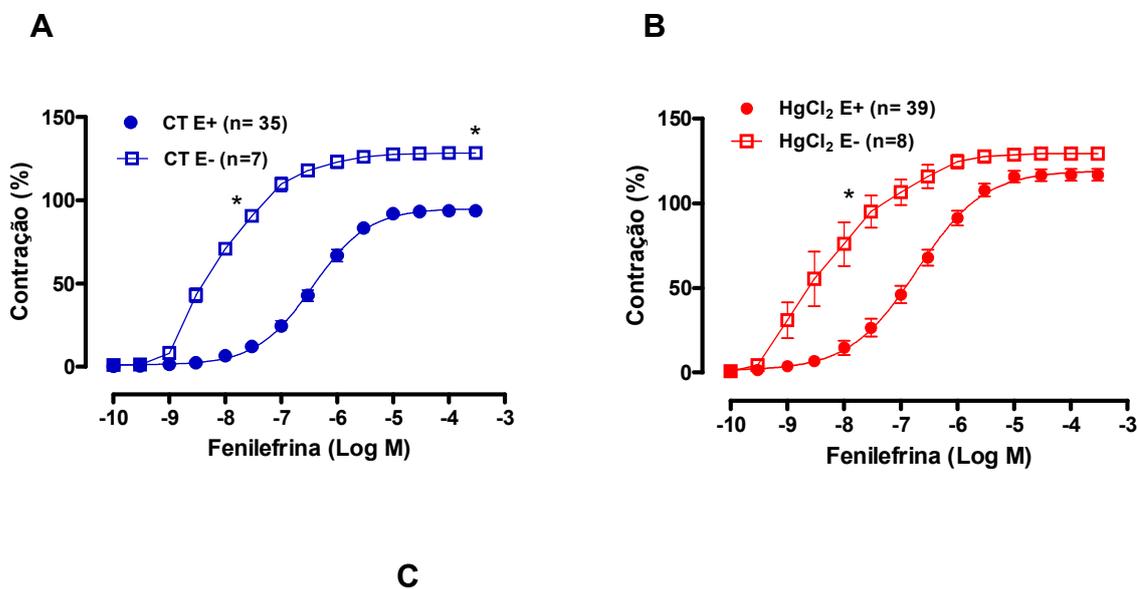
A remoção do endotélio nos anéis isolados de aorta desviou a curva concentração-resposta à fenilefrina para a esquerda. No grupo controle houve aumento tanto da R_{máx} quanto da pD₂ à fenilefrina (Tabela 3; Figura 9 A). Entretanto, no grupo que foi incubado com HgCl₂ ocorreu aumento somente da sensibilidade à fenilefrina (Tabela 3; Figura 9 B).

Esta diferença de resposta observada na presença de HgCl₂ está claramente representada no gráfico da figura 9 C. A análise da diferença percentual da área abaixo da curva (% dAAC) mostrou que modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina em presença de HgCl₂ é significativamente menor (% dAAC- CT 117,5 ± 7,3 vs HgCl₂ 66,9 ± 8 %, $p < 0,05$, Teste *t*).

Tabela 3: Efeito do HgCl₂ sobre a resposta máxima (R_{máx}, g) e a sensibilidade (pD₂) à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar na presença e ausência do endotélio.

	R _{máx}	pD ₂
CT E+	93,5 ± 2,52	6,47 ± 0,08
CT E-	128 ± 3,08 *	8,06 ± 0,04 *
HgCl ₂ E+	117 ± 3,45	6,77 ± 0,10
HgCl ₂ E-	129 ± 3,37	8,34 ± 0,24 *

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. **p* < 0,05; pD₂ e R_{máx}: CT E+ vs CT E- e pD₂: HgCl₂ E+ vs HgCl₂ E-.



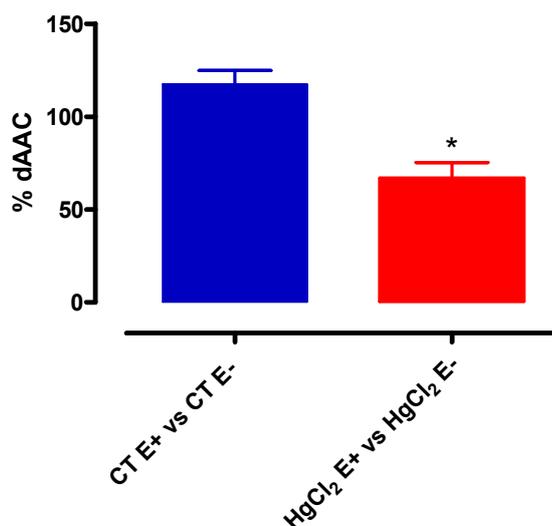


Figura 9: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (CT E-) a retirada do endotélio; (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após a retirada do endotélio (HgCl₂ E-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo, na ausência (azul) e na presença (vermelho) de HgCl₂. O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média \pm EPM. Teste *t* não-pareado **p* < 0,05 para pD₂ e Rmáx: Ct E+ vs Ct E-; pD₂: HgCl₂ E+ vs HgCl₂ E- e % dAAC- CT E+e E- vs HgCl₂ E+e E-.

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO CLORETO DE MERCÚRIO (6 nM) SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta à ACh. Como esperado houve relaxamento concentração-dependente em todos os anéis isolados de aorta. Não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa nos valores de Rmáx e pD₂ entre os grupos estudados (Tabela 4; Figura 10).

Tabela 4: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais controle (ACh CT) e na presença de HgCl₂ (ACh+ HgCl₂). A R_{máx} está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.

	R _{máx} (%)	pD ₂
ACh CT	96 ± 1,49	12,91 ± 5,44
ACh+ HgCl ₂	96,5 ± 1,18	11,92 ± 4,55

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado. *p* > 0,05.

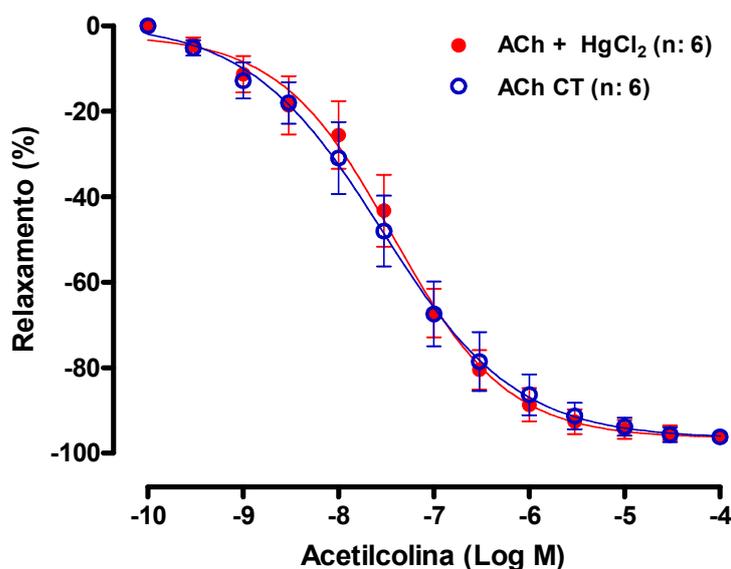


Figura 10: Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis isolados de aorta de ratos Wistar no controle (ACh CT) e após a administração aguda de 6 nM de HgCl₂, por 45 min (ACh+ HgCl₂). O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina. Teste *t* não-pareado. *p* > 0,05.

4.4 ANÁLISE DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO (6 nM) SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através do efeito induzido pelo nitroprussiato de sódio, que, de maneira concentração dependente inibiu a contração induzida pela fenilefrina (Figura 11).

A resposta de relaxamento induzida pelo nitroprussiato de sódio não foi diferente em nenhum dos grupos estudados, no que se refere à $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 ; tabela 5 e figura 11.

Tabela 5: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pelo nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta intactos de animais controle (NPS CT) e na presença de $HgCl_2$ (NPS + $HgCl_2$). A $R_{m\acute{a}x}$ está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com à fenilefrina.

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
NPS CT	$110 \pm 5,94$	$8,50 \pm 0,24$
NPS + $HgCl_2$	$104 \pm 7,24$	$8,56 \pm 0,27$

Valores expressos em média \pm EPM. Teste t não-pareado. $p > 0,05$.

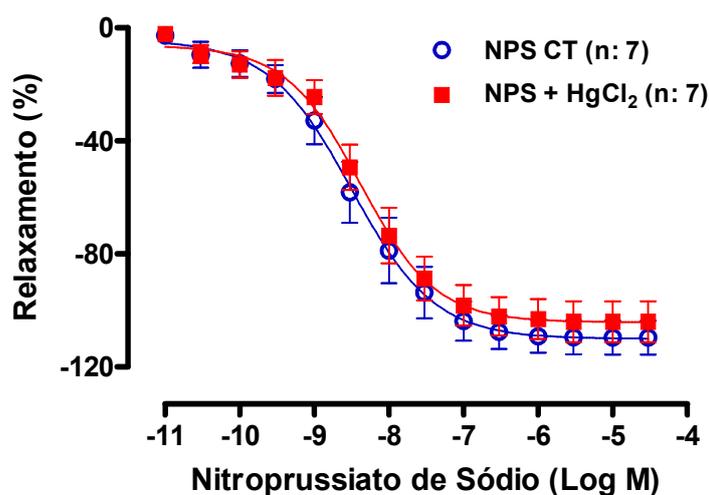


Figura 11: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis isolados de aorta de ratos Wistar na condição controle (NPS CT) e após a

administração aguda de 6 nM de HgCl₂, por 45 min (NPS+ HgCl₂). O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contração com à fenilefrina. Teste *t* não-pareado. $p > 0,05$.

4.5 ESTUDO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CLORETO DO MERCÚRIO (6 nM) SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

Os resultados apresentados demonstraram que a administração aguda de baixa concentração de HgCl₂ foi capaz de aumentar a R_{máx} e pD₂ à fenilefrina e esse aumento foi abolido após a lesão endotelial. Com a finalidade de avaliar a participação dos fatores endoteliais nessa resposta, foram realizados os protocolos a seguir com seus respectivos resultados.

4.5.1 Efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na via do Óxido Nítrico

Como esperado, após o bloqueio da via de NO com L-NAME (100 µM) ocorreu aumento da resposta vasoconstrictora à fenilefrina nos anéis isolados de aorta com endotélio intacto, aumentando tanto a R_{máx} quanto a pD₂ à fenilefrina (Tabela 6; Figura 12 A). No entanto, após a incubação com o HgCl₂ associado ao L-NAME esse aumento foi de menor magnitude (Tabela 6; Figura 12 B).

Para melhor comparação desses resultados foi calculado a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAAC) dos gráficos. Dessa maneira foi possível observar uma redução na biodisponibilidade de NO no grupo que recebeu HgCl₂ (% dAAC- Controle 134 ± 22 vs HgCl₂ 65 ± 11 %, $p < 0,05$, Teste *t*) (Figura 12 C).

Tabela 6: Resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem HgCl₂ e na presença e na ausência de L-NAME .

	R_{máx}	pD₂
CT E+	93 ± 4	6,4 ± 0,09
L-NAME CT	183 ± 15,3 *	7 ± 0,09 *
HgCl₂ E+	113 ± 4,78	6,6 ± 0,14
L-NAME + HgCl₂	168 ± 8,94 *	7 ± 0,05 *

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado *p< 0,05; pD₂ e R_{máx}: CT E+ vs L-NAME CT; pD₂ e R_{máx}: HgCl₂ E+ vs L-NAME+ HgCl₂.

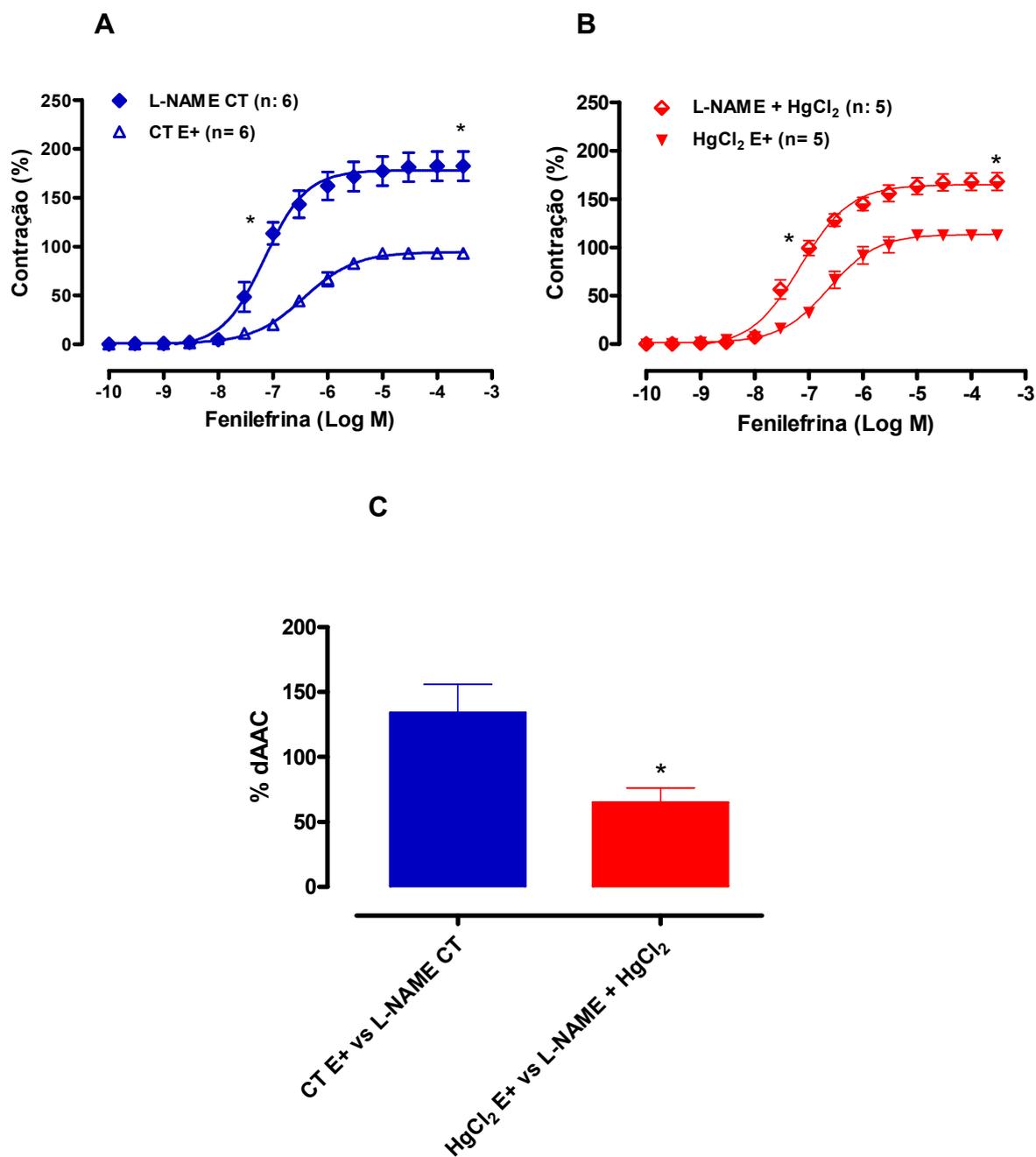


Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (L-NAME CT) a incubação com L-NAME; (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após (L-NAME + HgCl₂) a incubação com L-NAME; (C) Comparação da diferença percentual da área abaixo da curva no controle (azul) e na presença (vermelho) de HgCl₂. O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média \pm EPM. Teste *t* não-pareado **p* < 0,05 para pD₂ e Rmáx: Ct E+ vs L-NAME CT; pD₂ e Rmáx: HgCl₂ E+ vs L-NAME + HgCl₂ e % dAAC- Controle vs HgCl₂.

4.5.2 Efeito de agentes antioxidantes sobre a ação do cloreto de mercúrio (6 nM) na resposta contrátil à fenilefrina nos anéis isolados de aorta.

4.5.2.1 Influência da administração de apocinina, um inibidor da enzima NADPH oxidase.

A apocinina (100 μ M) reduziu a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos de aorta em ambos os grupos causando uma redução da R_{máx} (Tabela 7; Figura 13 A e B). Entretanto, este efeito foi maior quando administrado junto ao HgCl₂ (Tabela 7; Figura 13 B).

A diferença de resposta observada na presença de HgCl₂ está claramente representada no gráfico da diferença percentual da área abaixo da curva mostrada na figura 13 C (% dAAC- Controle -39,72 \pm 5,68 vs HgCl₂ -65,1 \pm 4,78 %, p<0,05, Teste *t*).

Tabela 7: Valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem HgCl₂ e na presença e na ausência de Apocinina .

	R _{máx}	pD ₂
CT E+	84 \pm 4.2	6,59 \pm 0,25
Apocinina CT	48 \pm 1,5 *	6,64 \pm 0,12
HgCl₂ E+	108 \pm 7,5	6,49 \pm 0,17
Apocinina + HgCl₂	34,5 \pm 4,4 *	6,56 \pm 0,05

Valores expressos em média \pm EPM; Teste *t* não-pareado *p< 0,05; R_{máx}: CT E+ vs Apocinina CT; R_{máx}: HgCl₂ E+ vs Apocinina + HgCl₂.

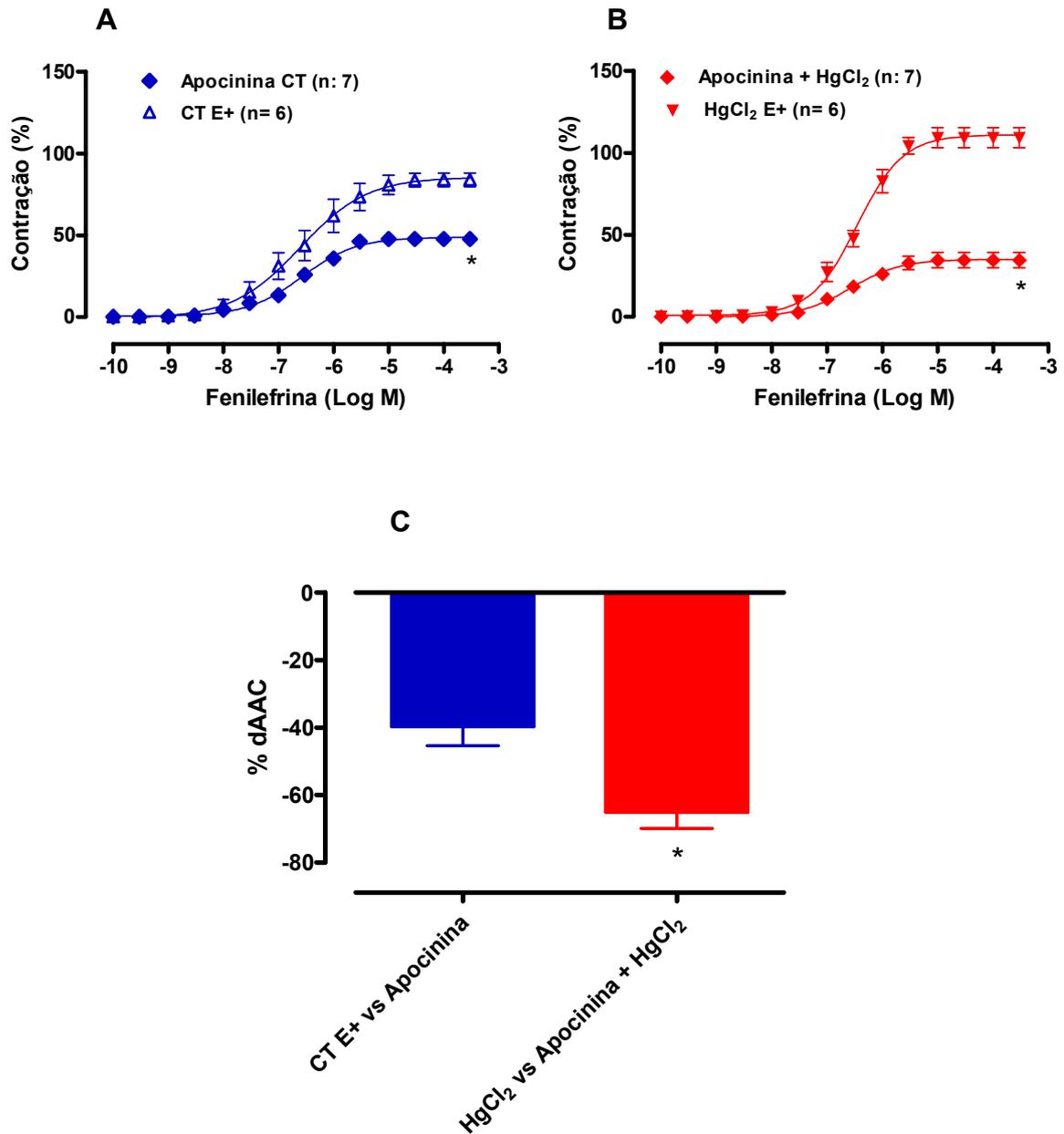


Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (Apocinina CT) a incubação com apocinina; (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após (Apocinina + HgCl₂) a incubação com apocinina; (C) Comparação da diferença percentual da área abaixo da curva no controle (azul) e na presença (vermelho) de HgCl₂. O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média \pm EPM. Teste *t* não-pareado **p* < 0,05 para R_{máx}: Ct E+ vs Apocinina CT; R_{máx}: HgCl₂ E+ vs Apocinina + HgCl₂ e % dAAC- Controle vs HgCl₂.

4.5.2.2 Participação do ânion superóxido (O_2^-) na resposta contrátil à fenilefrina

A avaliação da presença do O_2^- das aortas isoladas foi realizada através da incubação de SOD (150 U ml^{-1}) no banho. A SOD reduziu a resposta contrátil à fenilefrina diminuindo a $R_{\text{máx}}$ a este agonista nos dois grupos estudados (Tabela 8; Figura 14 A e B). Porém, no grupo $HgCl_2$, a magnitude deste efeito foi maior do que no grupo controle (Tabela 8; Figura 14 B).

Observando a figura 14 C, onde representa a diferença percentual da área abaixo da curva dos gráficos em questão, mostra maior ação de SOD quando associado ao grupo com $HgCl_2$ (% dAAC- Controle $-34,88 \pm 4,05$ vs $HgCl_2$ $-66,80 \pm 3,20$ %, $p < 0,05$, Teste t).

Tabela 8: Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem $HgCl_2$, na presença e na ausência de SOD.

	$R_{\text{máx}}$	pD_2
CT E+	$84 \pm 4,17$	$6,59 \pm 0,25$
SOD CT	$58 \pm 3,72$ *	$6,42 \pm 0,05$
$HgCl_2$ E+	$108 \pm 7,52$	$6,49 \pm 0,17$
SOD + $HgCl_2$	$34,5 \pm 3,12$ *	$6,23 \pm 0,07$

Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não-pareado * $p < 0,05$; $R_{\text{máx}}$: CT E+ vs SOD CT; $R_{\text{máx}}$: $HgCl_2$ E+ vs SOD + $HgCl_2$.

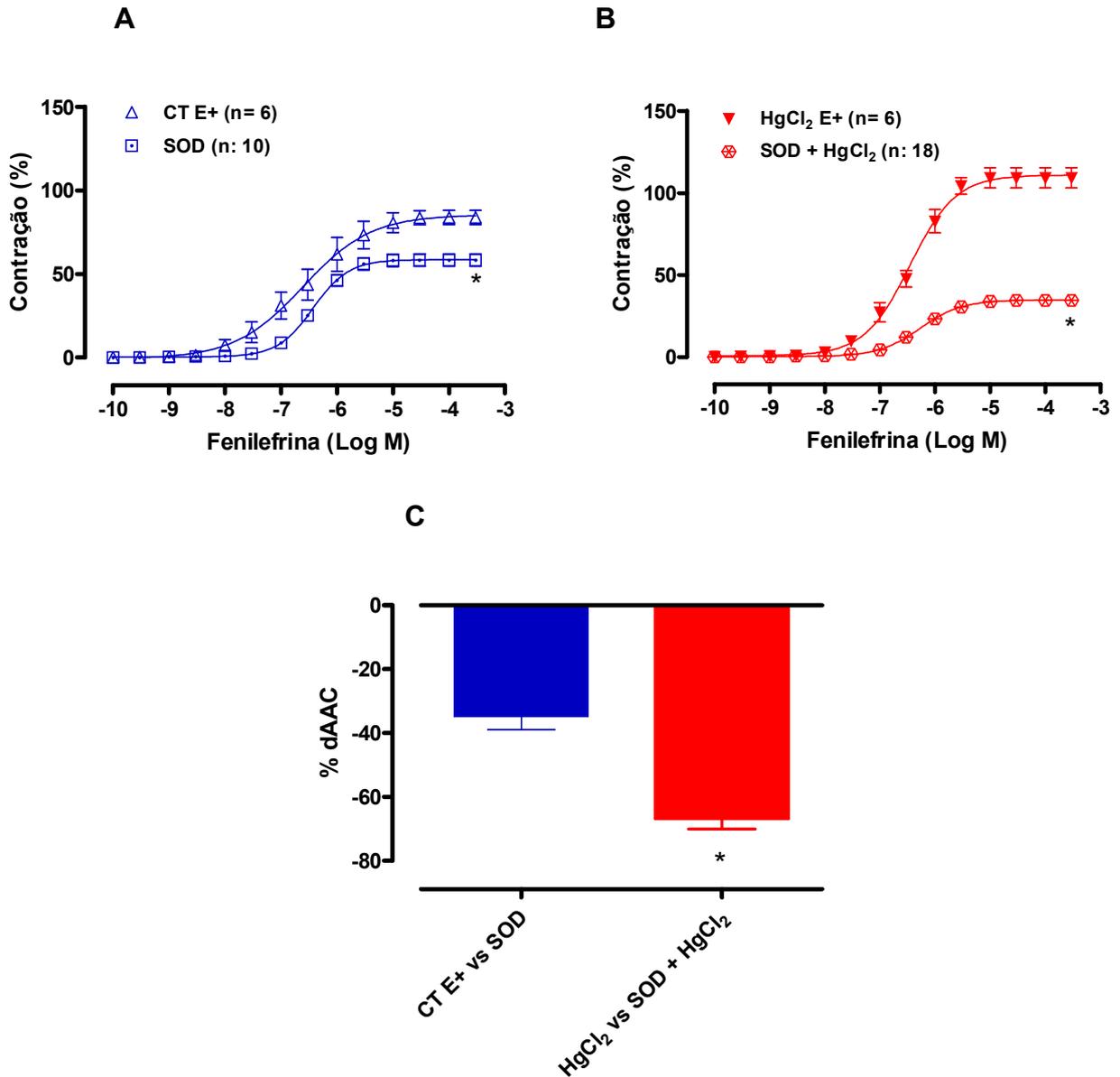


Figura 14: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (SOD CT) incubação com superóxido dismutase (SOD); (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após (SOD + HgCl₂) a incubação com SOD; (C) Diferença percentual da área abaixo da curva na condição controle (azul) e na presença (vermelho) de HgCl₂. O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média ± EPM. Teste *t* não-pareado **p* < 0,05 para R_{máx}: Ct E+ vs SOD CT; R_{máx}: HgCl₂ E+ vs SOD + HgCl₂ e % dAAC- Controle vs HgCl₂.

4.5.3 Participação da Angiotensina II local sobre o efeito de 6 nM do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina nos anéis isolados de aorta.

Neste protocolo investigamos a participação da Angiotensina II local na resposta contrátil a baixa concentração do cloreto de mercúrio. O enalapril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) e também o losartan, um inibidor específico de receptores para Angiotensina II do subtipo AT₁ foram usados na presença e ausência de mercúrio.

4.5.3.1 Efeito agudo de 6 nM do cloreto de mercúrio sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA).

Na condição controle o enalapril (10 µM) não alterou a resposta contrátil à fenilefrina (Tabela 9; Figura 15 A). No entanto, na presença deste fármaco, o aumento da reatividade à fenilefrina induzido pelo HgCl₂ foi reduzido (Tabela 9; Figura 15 B). Este fato é sugestivo de que indica que a ECA está envolvida na ação vascular do HgCl₂. Uma vez que o aumento da sua atividade pode-se ter maior liberação de Angiotensina II local para interagir com os receptores do subtipo AT₁.

Tabela 9: Resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem HgCl₂ e na presença e na ausência de enalapril.

	R _{máx}	pD ₂
CT E+	97 ± 4,90	6,80 ± 0,19
Enalapril CT	106 ± 3,03	6,73 ± 0,06
HgCl ₂ E+	114 ± 3,13	6,79 ± 0,06
Enalapril + HgCl ₂	102 ± 2,91 *	7,05 ± 0,11

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado *p < 0,05; R_{máx}: HgCl₂ E+ vs Enalapril + HgCl₂.

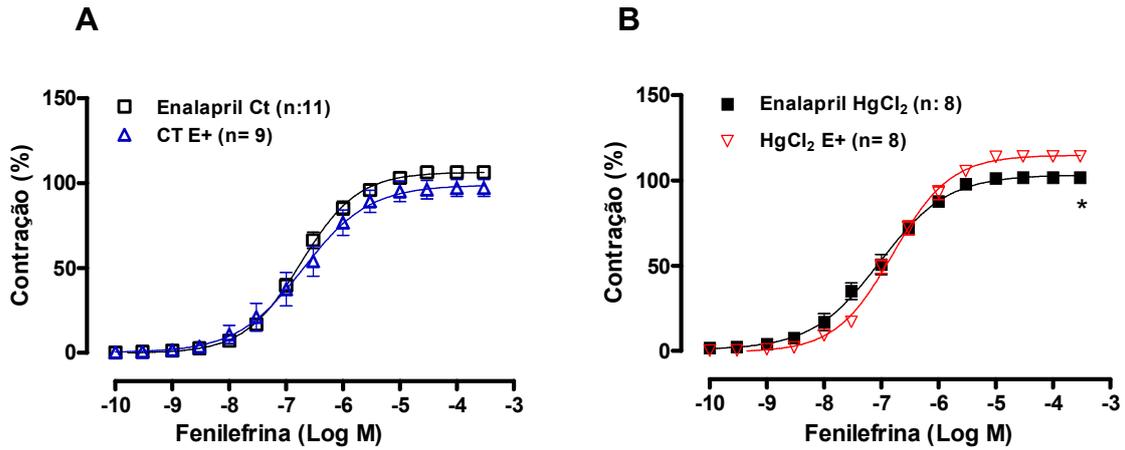


Figura 15: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após a incubação com enalapril (Enalapril CT); (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após a incubação com enalapril (Enalapril + HgCl₂); O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média ± EPM. Teste *t* não-pareado **p* < 0,05 para R_{máx}: HgCl₂ E+ vs Enalapril + HgCl₂.

4.5.3.2 Efeito agudo do cloreto de mercúrio sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT₁

Para investigar se há maior interação da Angiotensina II com os receptores do subtipo AT₁, os anéis isolados de aorta foram incubados com o losartan (10 µM).

Na condição controle o losartan não modificou a resposta contrátil à fenilefrina (Tabela 10; Figura 16 A). Entretanto, a incubação com o HgCl₂ aumentou a pD₂ e reduziu a resposta contrátil à fenilefrina, culminando com uma redução da R_{máx} (Tabela 10; Figura 16 B).

Tabela 10: Resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem HgCl₂ e na presença e na ausência de losartan.

	R _{máx}	pD ₂
CT E+	97 ± 4,90	6,80 ± 0,19
Losartan CT	92 ± 3,89	6,66 ± 0,07
HgCl ₂ E+	114 ± 3,13	6,79 ± 0,06
Losartan + HgCl ₂	96 ± 5,19 *	7,07 ± 0,09 *

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado *p < 0,05; R_{máx} e pD₂: HgCl₂ E+ vs Losartan + HgCl₂.

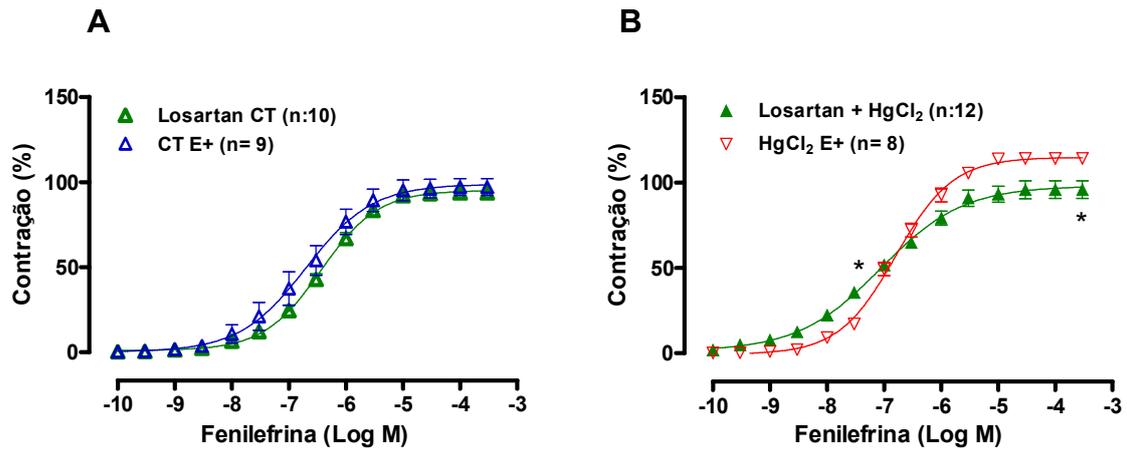


Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após a incubação com losartan (Losartan CT); (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após a incubação com losartan (Losartan + HgCl₂); O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média ± EPM. Teste *t* não-pareado **p* < 0,05 para R_{máx} e pD₂: HgCl₂ E+ vs Losartan + HgCl₂.

4.5.4 Efeito agudo de 6 nM de cloreto de mercúrio sobre os prostanóides derivados da cicloxigenase.

A inibição da via do ácido araquidônico-ciclooxygenase com indometacina (10 μ M), em anéis de aorta intactos reduziu significativamente a resposta máxima na condição controle (Tabela 11; Figura 17 A).

A incubação da indometacina com o HgCl₂ foi capaz de reduzir tanto a pD₂ quanto a R_{máx} (Tabela 11; Figura 17 B).

As diferenças de respostas estão melhores representadas na figura 17 C, pela diferença percentual da área abaixo da curva (% dAAC, Controle $-40 \pm 4,23$ vs HgCl₂ $-64 \pm 5,37$ %, $p < 0,05$, Teste *t*).

Tabela 11: Resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar com e sem HgCl₂ e na presença e na ausência de indometacina (INDO).

	R _{máx}	pD ₂
CT E+	84 \pm 4,04	6,24 \pm 0,09
INDO CT	50 \pm 3,22 *	6,23 \pm 0,06
HgCl ₂ E+	104 \pm 2,44	6,45 \pm 0,13
INDO + HgCl ₂	41 \pm 4,97 *	6,03 \pm 0,11 *

Valores expressos em média \pm EPM; Teste *t* não-pareado * $p < 0,05$; R_{máx}: CT E+ vs INDO CT; R_{máx} e pD₂: HgCl₂ E+ vs INDO + HgCl₂.

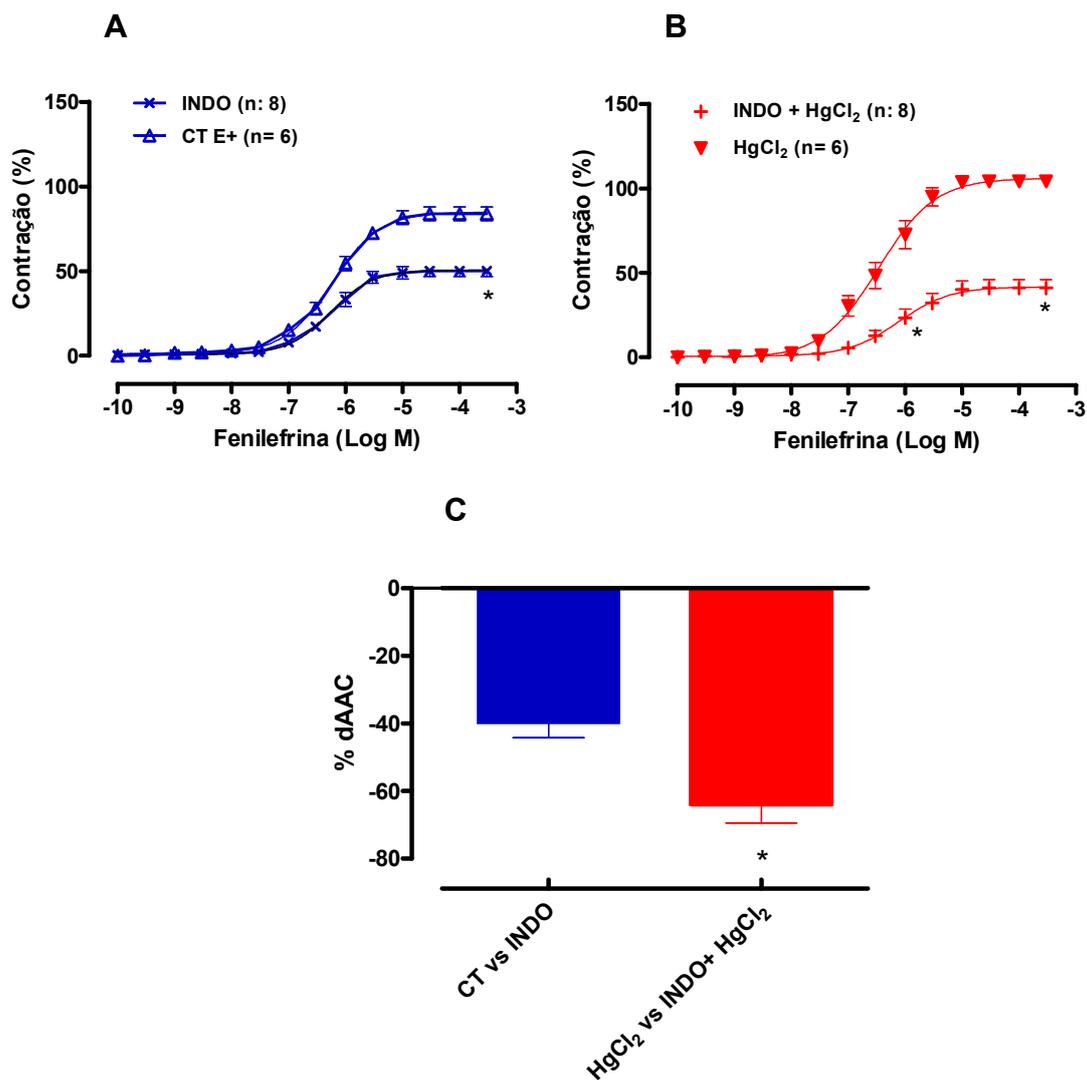
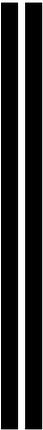


Figura 17: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar: (A) antes (CT E+) e após (INDO CT) a incubação com indometacina; (B) efeito do HgCl₂ antes (HgCl₂ E+) e após (INDO + HgCl₂) a incubação com indometacina; (C) Diferença percentual da área abaixo da curva na ausência (azul) e na presença (vermelho) de HgCl₂. O número de animais usado está mostrado entre parênteses. Os símbolos representam a média ± EPM. Teste *t* não-pareado **p* < 0,05 para R_{máx}: Ct E+ vs INDO CT; R_{máx} e pD₂: HgCl₂ E+ vs INDO + HgCl₂ e % dAAC-Controle vs HgCl₂.



DISCUSSÃO



5 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido para analisar os mecanismos envolvidos na exposição aguda à baixa dose de HgCl₂ sobre a reatividade vascular. Foram utilizados neste trabalho uma concentração baixa desse metal pesado (HgCl₂, 6 nM) similar à encontrada no plasma de indivíduos que estão constantemente expostos. O resultado obtido demonstrou que a exposição aguda promoveu aumento da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta confirmada pela potencialização da resposta máxima e da sensibilidade. Essa resposta foi modulada pelo endotélio, já que na sua ausência o efeito promovido pelo HgCl₂ foi abolido. Assim, a modulação endotelial encontrou-se reduzida na presença de HgCl₂ sugerindo que sua ação seja sobre os fatores liberados pelo endotélio.

Os resultados obtidos através das intervenções farmacológicas com o uso da SOD e apocinina; losartan e enalapril, e indometacina, sugerem que a alteração da reatividade envolve a via dos radicais livres, do sistema renina angiotensina e dos prostanoídes derivados da ciclooxigenase, respectivamente. Além disso, a liberação de EROs induzida por HgCl₂, poderia reduzir a biodisponibilidade do NO derivado do endotélio, o qual contribui para o acréscimo nas respostas vasoconstrictoras à fenilefrina.

Estudos prévios, usando concentrações de mercúrio maiores do que a usada no presente estudo, demonstram que o mercúrio afeta o sistema cardiovascular e sua toxicidade é dependente da concentração utilizada. Portanto, concentrações tóxicas de mercúrio podem influenciar a força contrátil de músculos papilares e tiras de ventrículo direito, alterar a cinética do cálcio, a atividade das proteínas contráteis, o funcionamento do retículo sarcoplasmático (Oliveira *et al.*, 1994; Cunha *et al.*, 2001; de Assis *et al.*, 2003; Falcochio *et al.*, 2004) e a responsividade vascular (Rossoni *et al.*, 1999; da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008b).

5.1 EFEITOS DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NA AORTA

No presente estudo, observou-se que, a administração aguda de HgCl_2 promoveu um aumento, concentração-dependente, da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta, confirmada pelo aumento da resposta máxima e da sensibilidade. Respostas semelhantes foram encontradas por da Cunha e colaboradores (2000) os quais utilizaram doses maiores (0,5 a 10 μM) e demonstraram que a administração aguda de mercúrio também induziu aumento da reatividade vascular em artérias caudais de ratos. Wiggers e colaboradores (2008a), ao avaliarem os efeitos da exposição aguda usando a mesma concentração aplicada no presente trabalho (6 nM), no leito vascular caudal, observaram aumento somente da sensibilidade à fenilefrina. Outro estudo realizado por Wiggers e colaboradores (2008b), mas, desta vez, por exposição crônica por 30 dias de HgCl_2 (29 nM), também constataram o aumento da reatividade de anéis isolados das artérias aorta, basilar e mesentérica de ratos. Em contrapartida, o estudo realizado por Golpon e colaboradores (2003), em segmentos de artérias aorta e pulmonar de ratos, pré-contraídas com noradrenalina, evidenciou respostas vasodilatadoras dependente do endotélio após a administração aguda de HgCl_2 (0,1 μM). Entretanto, as condições experimentais realizadas por Golpon e colaboradores (2003) foram completamente diferentes das executadas neste estudo. Isso porque os segmentos das artérias estavam imersos em uma solução nutritiva de tampão *Greenberg-Bohr*, o qual possui composição diferente da usada neste trabalho, além de que também eram distintos o tempo de exposição do mercúrio, que durou 20 minutos, e o agente vasoconstritor.

O aumento da reatividade vascular induzido por 6 nM de HgCl_2 poderia envolver fatores liberados pelo endotélio vascular. Sendo assim, neste estudo foi desenvolvido um protocolo para testar a reatividade à fenilefrina na ausência e na presença do endotélio vascular. De acordo com os resultados, na ausência do endotélio, a resposta contrátil à fenilefrina foi potencializada nos dois grupos estudados e não houve alteração da resposta máxima e da sensibilidade após a incubação com HgCl_2 . Portanto, na ausência do endotélio não ocorreu aumento da resposta contrátil à fenilefrina, induzida pelo HgCl_2 . Isso sugere que a capacidade do endotélio em modular negativamente a resposta contrátil induzida pela fenilefrina parece estar prejudicada nas aortas isoladas que receberam HgCl_2 .

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio preciso entre a liberação de fatores constritores e relaxantes derivados do endotélio para manter o tônus vascular e a fluidez sanguínea. No entanto, em diversas condições patológicas,

como na hipertensão arterial, esse equilíbrio encontra-se alterado, frequentemente acompanhado de atenuação dos efeitos vasodilatadores endoteliais (Carvalho *et al.*, 2001). No presente trabalho, pode-se pressupor que há ocorrência de alteração da função endotelial. Sugere-se que a administração aguda de HgCl₂ pode desencadear um desequilíbrio na síntese, na liberação e/ou no efeito de alguns destes mediadores capazes de relaxar e contrair o músculo liso vascular. Esta disfunção endotelial promovida pelo mercúrio poderia contribuir para o acréscimo nas respostas vasoconstrictoras à fenilefrina observadas na aorta de ratos. Assim, o presente resultado é sugestivo de uma possível participação do mercúrio como fator de risco para doenças cardiovasculares. A intoxicação aguda por mercúrio, induzindo disfunção endotelial, poderia contribuir para o aumento da resistência periférica e assim, conseqüentemente, para a gênese e manutenção da hipertensão arterial.

O estudo realizado por Wiggers e colaboradores (2008b) não demonstrou alteração na pressão arterial sistólica após o tratamento crônico que, ao final de 30 dias, resultou na concentração final de 29 nM mercúrio. Os autores descreveram aumento da resposta contrátil à fenilefrina e disfunção endotelial em segmentos de artérias de condutância (aorta) e resistência (basilares e mesentérica). No entanto, Machado e colaboradores (2007) mostraram que a exposição aguda ao HgCl₂ (20 nM) aumenta a pressão arterial sistólica e diastólica, a frequência cardíaca e aumenta a reatividade pressórica à fenilefrina. Vale salientar que estes estudos diferem no que diz respeito ao tratamento, sendo o primeiro crônico e o segundo, agudo. Portanto, a alteração da pressão arterial desencadeada no tratamento agudo pode ter sido transitória.

Além de exercer seus efeitos no endotélio, o mercúrio pode interagir sobre proteínas, enzimas, canais iônicos ou receptores, combinado com o grupamento -SH (Halbach *et al.*, 1981; Halbach, 1990; Clarkson, 1993; Boraso & Williams, 1994; Chiamvimonvat *et al.*, 1995). Estudos mostraram que este metal inibe a atividade da Na⁺K⁺ATPase (NKA) na membrana celular (Halbach *et al.*, 1981; Anner *et al.*, 1990,1992; Anner & Moosmayer, 1992; Carmignani *et al.*, 1992). Essa inibição aumenta a concentração intracelular de Na⁺, o que reduz a atividade do trocador Na⁺/Ca⁺⁺, e aumenta a concentração intracelular de Ca⁺⁺, conseqüentemente, o tônus vasomotor (Blaustein *et al.*, 1998). O aumento anormal da concentração de Ca⁺⁺ pode ser citotóxico, como foi demonstrado em células tubulares renais. A

administração do íon mercúrico (Hg^{2+}), em concentrações aproximadamente de 10 μM , promoveu apoptose, disfunção de proteínas, interferência no fluxo de íons (Annunziato *et al.*, 2003; Yeh *et al.*, 2004).

5.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

A partir dos resultados descritos acima, onde há aumento da reatividade vascular à fenilefrina por um desequilíbrio na função endotelial, foi investigado se o mercúrio alterava o relaxamento vascular dependente do endotélio por redução da ação do óxido nítrico. Para isto, foram realizadas curvas concentração-resposta a acetilcolina, que promove relaxamento dependente do endotélio, em segmentos de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina. A acetilcolina promoveu resposta vasodilatadora, concentração-dependente, em todos os anéis de aorta e não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Mercúrio. Isto sugere que a vasodilatação dependente do endotélio está preservada, ou seja, não alterou a produção de NO estimulada pela acetilcolina.

Existem poucos estudos em relação à exposição de baixas concentrações de HgCl_2 sobre a vasodilatação. A exposição, por 20 minutos, de altas concentrações (1 a 5 μM) de HgCl_2 nas artérias aorta e caudal, induziu o prejuízo nas respostas vasodilatadoras a acetilcolina (da Cunha *et al.*, 2000; Golpon *et al.*, 2003). Resultado semelhante foi encontrado após a exposição crônica de HgCl_2 , em concentração maior que a usada no presente estudo, em artérias mesentérica e aorta (Wiggers *et al.*, 2008b).

Para avaliar se há prejuízo de relaxamento no músculo liso vascular, após a exposição aguda de HgCl_2 , foram realizados experimentos com o nitroprussiato de sódio (NPS). O NPS promoveu resposta vasodilatadora, concentração dependente, semelhante em ambos os grupos experimentais, sugerindo que a exposição aguda de HgCl_2 não modificou a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular. Resultado semelhante foi encontrado por da Cunha e colaboradores (2000) em artéria caudal de ratos. Além disso, estes autores demonstraram que o pré-tratamento com L-arginina não impediu o aumento da reatividade vascular à

fenilefrina induzida pelo HgCl_2 e nem restaurou a habilidade da acetilcolina em promover vasodilatação.

Considerando, então, estes resultados, poder-se-ia supor que o mercúrio influencia a liberação de fatores vasoconstritores derivados do endotélio. Assim, apesar do relaxamento induzido pela acetilcolina não ter sido prejudicado pelo mercúrio, este metal aumentou a vasoconstrição induzida pela fenilefrina. Os reais mecanismos pelos quais o mercúrio altera a reatividade vascular são pouco conhecidos, principalmente no que se refere aos seus efeitos agudos em concentrações muito menores daquelas consideradas seguras para a saúde. Neste sentido, o estudo propôs investigar algumas vias que possivelmente poderiam esclarecer a ação vascular desse cátion em ratos.

5.3 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE A RESPOSTA A FENILIFRINA

5.3.1 Efeito de cloreto de mercúrio na via do Óxido Nítrico

Do ponto de vista fisiopatológico, outra possibilidade de avaliar se o mercúrio atenua os efeitos vasodilatadores do endotélio foi analisar se há prejuízo na biodisponibilidade do NO. Dentre os fatores vasoativos liberados pelo endotélio, o NO parece ser o principal fator relaxante derivado do endotélio que modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas (Wolf & Baynes, 2007). Assim, com o objetivo de avaliar uma possível participação desta via na hiperreatividade à fenilefrina nos segmentos de aortas que receberam HgCl_2 , foi realizada curva concentração resposta à fenilefrina na presença do L-NAME. Este fármaco, ao inibir a NOS, impede a formação de GMPc na célula muscular e, conseqüentemente, a síntese de NO (Hayashi *et al.*, 1992). Assim, o L-NAME, na presença do mercúrio, potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina, mas em menor proporção do que no grupo controle. Estes resultados sugerem que o efeito agudo com mercúrio reduz a biodisponibilidade de NO do endotélio. Resultados similares foram encontrados após analisar o efeito da exposição aguda (6 nM) ao mercúrio sobre a artéria caudal (Wiggers *et al.*, 2008a), e após a

exposição crônica em maiores concentrações nas artérias mesentéricas, basilares e aorta (Wiggers *et al.*, 2008b).

Existem várias anormalidades que podem contribuir para a redução da biodisponibilidade de NO como: a redução da atividade da NOS, o desacoplamento da NOS para produzir $O_2^{\cdot-}$ e a degradação do NO através da sua interação com $O_2^{\cdot-}$ (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Milstein & Katusic, 1999; Laursen *et al.*, 2001; Loomis *et al.*, 2005). No entanto, foram encontrados diferentes resultados, em tecidos distintos, da atividade da NOS após a exposição de mercúrio. Há estudos demonstrando redução da expressão protéica da NO sintase induzível (iNOS) em células β do pâncreas (Eckhardt *et al.*, 1999) e da NO sintase endotelial (eNOS) em glomérulos de ratos expostos ao $HgCl_2$ (Yanagisawa *et al.*, 1998). Outro estudo demonstrou inibição da atividade da NOS em cultura de células endoteliais humanas de cordão umbilical, expostas ao MeHg (Kishimoto *et al.*, 1996). Em contrapartida, foi encontrado um aumento da expressão de eNOS em artérias mesentéricas e nenhuma modificação nas basilares e aorta de ratos tratados com $HgCl_2$ (Wiggers *et al.*, 2008b).

Foi identificado que o co-fator BH_4 (tetrahidrobiopterina) tem um importante papel no controle da atividade da eNOS (Mayer & Werner, 1995). O papel preciso da BH_4 na formação do NO ainda não é totalmente conhecido, algumas evidências indicam que é um efetor alostérico da NOS, por estabilizar sua forma dimérica, facilitando a ligação da L-arginina. Além disso, esse co-fator pode ser um agente redox, agindo como seqüestrador de EROs (Scott-Burden, 1995). Estudo realizado *in vitro* demonstrou que a exposição de metais pesados, incluindo o mercúrio, induz, de maneira concentração dependente, uma redução da atividade da dihidropteridina redutase (DHPR). Esta enzima desempenha um papel crucial na manutenção da BH_4 (Altindag *et al.*, 2003). A presença de níveis reduzidos de BH_4 resulta no desacoplamento da NOS, o qual ao invés de oxidar L-arginina, reduz a molécula de oxigênio a $O_2^{\cdot-}$ (Pou *et al.*, 1999, Wever *et al.*, 1997). Logo, uma das causas do aumento da biodegradação de NO, reduzindo a biodisponibilidade, é a sua interação com o $O_2^{\cdot-}$ que determina uma reação rápida formando o peróxido nitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante (Beckman *et al.*, 1996). Estudo conduzido por Kuzkaya e colaboradores (2003) relatou que a BH_4 é mais sensível à oxidação por $ONOO^-$ que por $O_2^{\cdot-}$ e sugeriu que há um aumento do desacoplamento do NOS na presença de $ONOO^-$. Outros autores relataram que a NADPHoxidase é crucial para a

produção de EROs e sugerem que estes induzem à oxidação de BH₄ (Landmesser *et al.*, 2003; Loomis *et al.*, 2005; Munzel *et al.*, 2005).

5.3.2 Via dos radicais livres

O estresse oxidativo pode afetar a reatividade vascular por diferentes mecanismos. As EROs agem como segundo mensageiro, ativando inúmeras moléculas de sinalização e desempenham um papel importante na fisiopatologia vascular (Paravicini & Touyz, 2006; Vaziri & Rodríguez-Iturbe, 2006; Álvarez *et al.*, 2008). Além disso, o O₂^{•-} interage com o NO, e forma peroxinitrito, diminuindo assim a biodisponibilidade do NO para o relaxamento do músculo liso (Beckman *et al.*, 1996). Estudos têm relacionado a exposição ao mercúrio com o aumento do estresse oxidativo (Miller & Woods, 1993; Kim & Sharma, 2004; Chen *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008). Neste estudo foram realizados experimentos para analisar se os radicais livres contribuem para as alterações das respostas vasoconstritoras após a exposição aguda ao HgCl₂.

Está bem estabelecido que a NADPH oxidase é a principal fonte vascular de O₂^{•-} (Paravicini & Touyz, 2006; Vaziri & Rodríguez-Iturbe, 2006). Assim, a NADPH oxidase desempenha um papel importante no controle do tônus vascular (Souza *et al.*, 2001). Hamilton e colaboradores (2002) investigaram a capacidade dos inibidores da NADPH oxidase de aumentar a biodisponibilidade do NO, em artérias com e sem disfunção endotelial em ratos. A partir deste estudo, os autores sugeriram que o composto com o maior potencial foi a apocinina. Após este resultado, os autores verificaram que a apocinina reduziu a produção de O₂^{•-} na artéria mamária interna e na veia safena de pacientes, por inibir a NADPH oxidase, e induziu a vasodilatação, a qual foi revertida com o L-NAME.

O presente estudo demonstra que a apocinina aumenta a biodisponibilidade do NO, uma vez que reduziu a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos de aorta tanto na presença quanto na ausência de HgCl₂. No entanto, esta ação foi maior quando administrada junto ao HgCl₂. Portanto, esse resultado sugere que a enzima NADPH oxidase estava mais estimulada na presença do mercúrio, liberando, assim, mais radicais livres.

A fim de investigar a participação do O₂^{•-} sob o efeito do mercúrio, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença de SOD, que é

um sequestrador do ânion superóxido. O efeito deste fármaco foi semelhante ao da apocinina. Ocorreu redução da reatividade vascular à fenilefrina no grupo controle, uma vez que converteu mais $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio e peróxido de hidrogênio, reduzindo a reação do $O_2^{\cdot-}$ com o NO, aumentando a sua biodisponibilidade. Em um estudo realizado por Mackenzie e colaboradores (1999) foram observadas respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio após a administração da enzima cobre-zinco superóxido dismutase (Cu/ZnSOD) e de alguns miméticos em segmentos de aorta de ratos, com endotélio íntegro, pré-contraídas com fenilefrina. O resultado destes autores reforça que a ação de relaxamento, da SOD, surge como consequência da proteção do NO basal pela destruição da liberação endógena de $O_2^{\cdot-}$. No entanto, ao estudar o grupo com $HgCl_2$, a redução da reatividade à fenilefrina foi maior do que no grupo controle. Desta maneira, pode-se especular que parece haver uma maior quantidade de $O_2^{\cdot-}$ na presença de mercúrio, que contribui para o aumento de reatividade à fenilefrina encontrada nas aortas isoladas destes animais.

Os resultados dos experimentos com a apocinina e a SOD exógena apresentaram maior dAAC nos seguimentos de aorta que receberam $HgCl_2$, o que sugere que a disfunção endotelial presente neste modelo experimental deve-se, provavelmente, à maior produção de EROs, em especial à produção de $O_2^{\cdot-}$. Das EROs, o H_2O_2 possui capacidade de modificar o tônus vascular induzindo contração (Sheenan *et al.*, 1993; Jin & Rhoades, 1997) ou até mesmo relaxamento (Barlow & White, 1998, 2000; Matoba *et al.*, 2000; Shimokawa *et al.*, 2005) dependendo do leito vascular e das condições experimentais estudadas. Assim, Girouard & de Champlain (2004) propuseram que o H_2O_2 endógeno não está envolvido nas contrações induzidas pela fenilefrina. No entanto, outros estudos mostraram que a catalase, inibidor do H_2O_2 reduz a resposta contrátil a noradrenalina (Srivastava *et al.*, 1998). Outro grupo de pesquisadores descreveu que em artérias mesentéricas de rato, o H_2O_2 , induz respostas vasoconstritoras e produz liberação de $O_2^{\cdot-}$ através da ativação da NADPH oxidase (García-Redondo *et al.*, 2008). Wiggers e colaboradores (2008b) observaram que a adição da enzima catalase restaurou a resposta vasodilatadora a acetilcolina em artérias mesentéricas de animais tratados com mercúrio indicando a participação do H_2O_2 . Em outros estudos experimentais envolvendo avaliação da reatividade vascular, o uso de concentrações maiores de mercúrio também forneceram evidências da participação das EROs no aumento da

resposta contrátil à fenilefrina. Cunha e colaboradores (2000), ao utilizarem tempol, um mimético da SOD, e Wiggers e colaboradores (2008a), ao utilizarem tanto a deferoxamina, um quelante de ferro da Reação de Fenton, quanto o tempol, observaram que a resposta do mercúrio na reatividade à fenilefrina foi abolida, em artérias caudais de ratos. No tratamento crônico, foi observado que a incubação da SOD exógena e da apocinina reduziram a resposta contrátil somente em segmentos de aorta de animais que foram expostos ao HgCl₂ e restaurou o efeito de L-NAME sob a resposta da fenilefrina em artérias de resistência (Wiggers *et al.*, 2008b). Além disso, estes mesmos autores encontraram aumento do malondialdeído plasmático, que é um indicador de estresse oxidativo (Wiggers *et al.*, 2008b).

Vários estudos, em animais e em humanos, têm sugerido que a toxicidade pela exposição de várias formas de mercúrio, causando lesão celular em vários órgãos e sistemas, é promovida pelo aumento do estresse oxidativo (Kim & Sharma, 2004; Chen *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008). Esse estresse oxidativo, além de estar associado à maior formação de EROs, também pode ser ocasionado por redução da atividade das enzimas antioxidantes (Lerman *et al.*, 2001; Rodrigues-Porcel, 2001; Lee & Wei, 2007). A alta afinidade dos íons de mercúrio vinculada aos tióis naturais sugere um esgotamento dos tióis intracelulares (especialmente a glutatona) que predispõe ao aumento do estresse oxidativo (Zalups, 2000). Além disso, um estudo observou que o ácido ascórbico e a vitamina E estavam reduzidos nos rins de ratos quando tratados com cloreto de mercúrio (Fukino *et al.*, 1984). Esse metal pesado, quando administrado no córtex renal de ratos, também promoveu decréscimo na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase (Gstraunthaler *et al.*, 1983). No entanto, em um estudo envolvendo a avaliação da reatividade vascular realizado por Wiggers e colaboradores (2008b) demonstrou que o estado antioxidante total no plasma (TAS, *Total Antioxidant Status*), após a exposição crônica de mercúrio, encontrava-se aumentado. Este fato é sugestivo de que o estresse oxidativo esteja associado ao aumento da produção de radicais livres sem que tenha ocorrido redução do estado oxidante. Estes autores sugerem que o aumento do estado oxidante se deva ao desenvolvimento de algum mecanismo de proteção das células contra o aumento do estresse oxidativo. Por outro lado, Wolf & Baynes (2007), encontraram, em células endoteliais de artéria pulmonar de bovinos, dados que sugerem que a associação do mercúrio com as alterações das enzimas antioxidantes pode ser dose-dependente. Assim, após a exposição de altas

concentrações de mercúrio ($> 3-5 \mu\text{M}$) ocorreu inibição da atividade de enzimas do grupo tiol e depleção de glutatona. A exposição a concentrações menores de mercúrio ($1-2 \mu\text{M}$) provocou aumento da atividade dessas enzimas.

Como demonstrado no presente trabalho, o mercúrio aumentou a reatividade vascular à fenilefrina. É possível que esta resposta possa ter sido influenciada pelo aumento da liberação das EROs, com a consequente redução da biodisponibilidade de NO. No entanto, ainda precisa ser esclarecida a via pela qual este metal pesado aumenta a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Estudos recentes têm mostrado que alterações da liberação de angiotensina II local e dos prostanóides vasoconstritores aumentam a formação de EROs na aorta de ratos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) (Álvarez *et al.*, 2007). Desse modo, especulou-se sobre a participação destas vias sobre no aumento da liberação dos radicais livres e na redução da biodisponibilidade do NO induzidas pelo HgCl_2 .

5.3.3 Participação da Angiotensina II local sobre o efeito do cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina

Outro fator endotelial que poderia contribuir para o efeito vasoconstritor do mercúrio seria a angiotensina II (Kozma *et al.*, 1996; Bidani *et al.*, 1980; Chávez *et al.*, 1991; Wiggers *et al.*, 2008a,b). A angiotensina II tem ações expressivas na parede vascular, incluindo a produção de EROs, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (Schiffrin & Touyz, 2004, Cheng *et al.*, 2005; Pauletto & Rattazzi, 2006), que podem contribuir para o aumento das respostas inflamatórias e desenvolvimento de processos fisiopatológicos, como a hipertensão arterial. A angiotensina II também estimula a liberação das prostaglandinas em uma grande variedade de células, como as células de músculo liso vascular, por meio da ativação da fosfolipase A_2 (Freeman *et al.*, 1998). Além disso, esse peptídeo, através da ativação de receptores AT_1 , regula a expressão da COX-2 e a produção de prostanóides em células musculares lisas vasculares de ratos normotensos (Ohnaka *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002). Foi demonstrada, recentemente, em ratos espontaneamente hipertensos, que a angiotensina II promove aumento de mediadores contráteis derivados da COX-2 na resposta vascular à fenilefrina (Álvarez *et al.*, 2007). Beltrán e colaboradores (2009) revelaram que esse peptídeo,

em fibroblastos da aorta de ratos, aumenta a expressão da COX-2 através da fosforilação da via de proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK, *mitogen-activated protein*) p38 e que sua ação é independente da produção de EROs. A angiotensina II também contribui para uma maior liberação de $O_2^{\cdot-}$ pelo aumento da atividade da enzima NADPH oxidase, observado em culturas de células musculares lisas vasculares de ratos (Griendling *et al.*, 1994), e foi demonstrado que esse aumento é maior em células de ratos espontaneamente hipertensos do que em normotensos (Cruzado *et al.*, 2005). Esse peptídeo, por aumentar a produção de $O_2^{\cdot-}$ e $ONOO^-$, induz efeitos deletérios sobre função mitocondrial e endotelial vascular (Doughan *et al.*, 2008).

Baseado nessas informações, no presente estudo foi investigada a participação da angiotensina II como um possível mediador das respostas vasculares do $HgCl_2$. Os segmentos de aorta foram incubados com enalapril para bloquear a formação da angiotensina II. Esse fármaco promoveu redução da resposta máxima à fenilefrina somente em segmentos de aorta com $HgCl_2$. Portanto, pode-se deduzir que o $HgCl_2$ é capaz de estimular a atividade da ECA endotelial e de promover aumento da liberação de angiotensina II local para interagir com os receptores do subtipo AT_1 no músculo liso vascular.

Desta forma, para investigar a participação da angiotensina II local na ação vascular do $HgCl_2$ foi realizado o bloqueio da ação desse peptídeo através do uso de um antagonista de receptores AT_1 , o losartan. Na presença desse fármaco obteve-se resposta similar ao enalapril. Assim, o losartan alterou somente a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de aorta na presença de $HgCl_2$. Os resultados sugerem a participação do sistema renina-angiotensina como mediador dos efeitos do mercúrio na hiperreatividade à fenilefrina nessa artéria.

O presente resultado corrobora os dados encontrados recentemente por Peçanha (2009), que mostrou que a hiperreatividade à fenilefrina, após a exposição crônica de $HgCl_2$, é mediada pela estimulação da angiotensina II na aorta de ratos. Wiggers e colaboradores (2008a) também observaram que a exposição aguda de $HgCl_2$ induziu aumento da atividade da ECA em artérias caudais de ratos. No entanto, quando Wiggers (2008c) investigou o efeito do captopril, inibidor da ECA, e do losartan nas artérias mesentéricas, não encontrou alteração do efeito do mercúrio

na resposta vascular à fenilefrina, o que parece excluir o envolvimento da angiotensina II nessas artérias.

A participação do sistema renina angiotensina também tem sido descrita em experimentos que avaliam a ação tóxica do mercúrio no sistema renal. A exposição a esse metal pesado, em concentração de 1 μM , induziu a liberação de renina pelas células justaglomerulares, em experimentos realizados *in vitro* (Kozma *et al.*, 1996). Bidani e colaboradores (1980) encontraram aumento dos níveis plasmáticos de renina em ratos tratados com HgCl_2 que desenvolveram insuficiência renal aguda. Chávez e colaboradores (1991) demonstraram que captopril reverteu o efeito do mercúrio em mitocôndria renal.

Contudo, no presente estudo foi observado que a exposição aguda a 6 nM de mercúrio é capaz de aumentar a reatividade vascular à fenilefrina através do aumento da liberação de angiotensina II local e da produção das EROs. Considerando o fato de que a angiotensina II regula a expressão da COX-2, a produção de prostanóides (Ohnaka *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002) e a atividade da enzima NADPH oxidase (Griendling *et al.*, 1994) foi realizado outro protocolo para avaliar a participação dos prostanóides derivados da COX na ação vascular do mercúrio.

5.3.4 Efeito do cloreto de mercúrio sobre os prostanóides derivados da ciclooxigenase.

Mudanças no metabolismo do ácido araquidônico têm sido observadas em várias doenças que cursam com processos inflamatórios e também em enfermidades cardiovasculares e renais (Vane *et al.*, 1994; Schönbeck *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 2005). Em algumas doenças, como a hipertensão arterial, os prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2 estão aumentados e contribuem para a disfunção endotelial (Vane *et al.*, 1994; Widlansky *et al.*, 2003).

Estudos têm revelado que o peroxinitrito (Landino *et al.*, 1996; Deeb *et al.*, 2002), H_2O_2 (Wolin *et al.*, 2000) e a angiotensina II (Álvarez *et al.*, 2007) podem estimular a COX. Do mesmo modo, as citocinas pró-inflamatórias, em especial o fator de necrose tumoral ($\text{TNF}\alpha$), aumentam a expressão da COX-2 e a produção de prostanóides vasoconstritores (Cipollone *et al.*, 2001). Um estudo em fígado de rato mostrou que o mercúrio aumenta o $\text{TNF}\alpha$, após a exposição na água de beber por

14 dias (Kim & Sharma, 2005). Assim, há indícios de que a exposição de HgCl₂ estimule a liberação de prostanóides vasoconstritores.

Descrições prévias têm mostrado a participação de prostanóides derivados da COX na ação de HgCl₂ em experimentos de reatividade vascular. No entanto, essa participação é dependente da forma de exposição, da concentração utilizada deste metal pesado e do tipo de leito vascular estudado. Resultados distintos foram encontrados após a exposição aguda de diferentes concentrações de HgCl₂ na artéria caudal de ratos (Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008a). Assim, foi demonstrada a participação da via da COX na hiperreatividade induzida por HgCl₂ na concentração de 20 nM (Cunha *et al.*, 2000) mas não em concentrações menores (6 nM) (Wiggers *et al.*, 2008a). Após a exposição crônica por 30 dias, que resultou na concentração final de 29 nM de HgCl₂, as respostas foram dependentes do leito vascular estudado (Peçanha, 2009; Wiggers, 2008c). Os autores encontraram influência dos prostanóides na aorta (Peçanha, 2009), mas não na mesentérica (Wiggers, 2008c).

Visando avaliar um possível papel dos metabólicos da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase, após a exposição aguda de HgCl₂ de 6 nM, os segmentos de aorta foram incubados com a indometacina, um inibidor não seletivo da enzima COX.

No grupo controle, a indometacina reduziu a resposta máxima à fenilefrina, semelhante aos resultados de Fulton & Stallone (2002). Esses autores também verificaram que o antagonista de receptor TXA₂/ PGH₂ (SQ-29548) atenuou a resposta contrátil à fenilefrina na mesma extensão que a indometacina. Assim, os autores sugerem que os prostanóides, TXA₂ e PGH₂, são responsáveis por contribuir com aproximadamente um quarto dos efeitos contráteis à fenilefrina. Na presença de HgCl₂, a produção desses prostanóides parece ser maior, uma vez que durante a incubação com indometacina houve redução significativa da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina. Portanto, sugere-se que os prostanóides derivados da via do araquidônico-ciclooxigenase participam das respostas vasoconstritoras à fenilefrina em segmentos de aorta expostos agudamente 6 nM de HgCl₂.

Recentemente, foi descrito que o aumento da resposta contrátil à fenilefrina estava relacionado ao incremento da expressão gênica da COX-2 e à produção dos prostanóides TXA₂ e PGE₂, devido a exposição crônica de concentrações de HgCl₂

na aorta de ratos, maiores do que as utilizadas no presente trabalho (Peçanha, 2009).

É importante destacar que o aumento na expressão das ciclooxigenases pode resultar, além de uma maior liberação de prostanóides vasoconstritores, em uma produção aumentada da $O_2^{\cdot-}$ (Wolin *et al.*, 2000). Juntos, esses fatores podem contribuir para a hiperreatividade vascular à fenilefrina.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o aumento da reatividade à fenilefrina, em anéis isolados de aorta, induzido por 6 nM de HgCl₂, é mediado pelo endotélio vascular. Tal efeito envolve a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) local e a liberação de prostanóides vasoconstritores, além do aumento da liberação de espécies reativas do oxigênio. Sugere-se que a ativação do SRA e da via da ciclooxigenase induzido pelo HgCl₂, possam influenciar o aumento das espécies reativas de oxigênio encontradas e conseqüentemente a redução da biodisponibilidade de NO.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abassi ZA, Ellahham S, Winaver J, Hoffman A. The intrarenal endothelin system and hypertension. *News Physiol Sci*. 2001; 16: 152-156.

Abramson JJ, Salama G. Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. *J Bioenerg Biom*. 1989; 21: 283–294.

Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). ToxFAQs: CABSTM /Chemical Agent Briefing Sheet Mercury. *ATSDR / Division of Toxicology and Environmental Medicine (DTEM)*. 2006; 1-6.

Alexandre SC. Avaliação de área contaminada por mercúrio total em Descoberto. Dissertação de Mestrado, 2006. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Altindag ZZ, Baydar T, Engin AB, Sahin G. Effects of the metals on dihydropteridine reductase activity. *Toxicol In Vitro*. 2003;17(5-6):533-577.

Álvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol*. 2008; 153, 926–935.

Álvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, Redondo AM, Beltrán A, Alonso MJ, Salaice M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *Pharmacol Exp Ther*. 2007; 321(1):381–388.

Álvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens*. 2005; 23(4):767-77.

American Dental Association. ADA statement on dental amalgam. 2003.

Español Cano S. Toxicología del mercurio. Activaciones preventivas em sanidad lab oral y ambiental. In: JORNADA INTERNACIONAL SOBRE EL IMPACTO AMBIENTAL DEL MERCÚRIO UTILIZADO POR LA MINERIA AURÍFERA ARTESANAL EN IBEROAMÉRICA, 2001, Lima. **Anais eletrônicos**. Disponível em: <www.gama-peru.org/jornada-hg.htm>. Acesso em: 12 març. 2009.

Angus JA; Cocks TM. Endothelium – derived relaxing factor. *Pharmacol Ther.* 1989; 41: 303-351.

Anner BM, Moosmayer M, Imesch E. Chelation of mercury by ouabain-sensitive and ouabain-resistant renal Na,K-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 167: 1115-1121.

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

Anner BM, Moosmayer M. Mercury inhibits Na-K-ATPase primarily at the cytoplasmic side. *Am J Physiol.* 1992; 262: 843-848.

Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, Sirabella R, Secondo A, Sibaud L, Di Renzo GF. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett.* 2003; 139 (2–3): 125–133.

Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circul* 2005;112(5):759-70.

Aoki T, Oba T, Hotta K. Hg⁺⁺-induced contracture in mechanically fibers of frog skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63:1070–1074.

Aposhian HV, Maiorino RM, Rivera M, Bruce DC, Dart RC, Hurlbut KM, Levine DJ, Zheng W, Fernando Q, Carter D, *et al.* Human studies with the chelating agents DMPS and DMSA. *Clin Toxicol.* 1992; 30: 505–528.

Aschner M, Aschner JL. Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev* 1990; 14: 169-76.

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

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radical are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertens*. 1989; 13: 859-64.

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

Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, Al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. *Methylmercury poisoning in Iraq*. *Science* 1973; 181 (96): 230 – 241.

Ball L, Ball R, Pratt R. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. *Pediatr* 2001; 107: 1147–1154.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med*. 2001. 79:76-102.

Barlow RS, El-Mowafy AM, White RE. H₂O₂ opens BK_{Ca} channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279 (2): H475-83.

Barlow, R.S., White, R.E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BK_{Ca} channel activity. *Am J Physiol*. 1998; 275: H1283–H1289.

Basu N, Scheuhammer Am, Evans RD, O'Brien M, Chan HM. Cholinesterase and monoamine oxidase activity in relation to mercury levels in cerebral cortex of wild river otters. *Hum & Exp Toxicol*. 2007; 26:213-220.

Baughman TA. Elemental mercury spills. *Environ Health Perspect.* 2006; 114 (2):146-152.

Becker K, Kaus S, Krause C, Lepom P, Schulz C, Seiwert M, Seifert B. German Environmental Survey 1998 (GerESIII): Environmental pollutants in blood of the German population. *Int J Hyg Environ Health* 2002; 205:297–308.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-C1437.

Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite. In: Packer L (ed.). *Methods of enzymol.* 1994; 229-40.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87 (4): 1620-1624.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):245-313.

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.* 2009; 27(1): 142-54.

Berlin M. Mercury in dental-filling materials – an updated risk analysis in environmental medical terms. *The dental material commission.* 2003; 33: 1-33.

Bidani A, Churchill PC, Fleischmann L, Becker-McKenna B. HgCl₂-induced acute renal failure in the developing rat. *Pediatr Res.* 1980; 14 (3):183-6.

Bisinoti MC, Jardim WF. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. *Química Nova* 2004; 27(4): 593-600.

Bjorkman L, Sandborgh-Englund G, Ekstrand J. Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 144: 156–62.

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

Bluhm RE, Bobbit RG, Welch LW, Wood AJ, Bonfiglio JF, Sarzem C, Heath AJ, Branch RA. Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers. Part I: History, neuropsychological findings and chelator effects. *Hum Exp Toxicol*. 1992; 11 (3): 201-210.

Boening DW. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*. 2000; 40: 1335-1351.

Boffetta P, Sällsten G, Garcia-Gómez M, Pompe-Kirn V, Zaridze D, Bulbulyan M, Caballero J-D, Ceccarelli F, Kopal AB, Merler E. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med* 2001; 58:461–466.

Bohets HH, Van Thielen MN, Van der Biest I, Van Landeghem GF, D'Haese PC, Nouwen EJ, De Broe ME, Dierickx PJ. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK1 MDCK and human proximal tubular cells. *Kidney Int*. 1995; 47: 395–403.

Bolotina BM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PG, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368: 850-3.

Boraso A, Williams AJ. Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{++} -release channel by H_2O_2 and dithiothreitol. *Am J Physiol*. 1994; 267:H1010–H1016.

BRASIL. Decreto-lei nº 685, de 27 de agosto de 1998. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos DINAL. **Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, set. 1998. Seção1, pt.1, p.1415-1437, 24.

BRASIL. Resolução nº 528, de 17 de abril de 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, abril 2001. Seção 1, p. 147.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. Brasília. Editora do Ministério da Saúde; 2006.

Bridges CC, Joshee L, Zalups RK. Multidrug resistance proteins and the renal elimination of inorganic mercury mediated by 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. *Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324(1): 383–390.

British Dental Health Foundation. Policy statement- dental amalgam. 2003.

Brodkin E, Copes R, Mattman A, Kennedy J, Kling R, Yassi A. Lead and mercury exposures: interpretation and action. *CMAJ* 2007; 176 (1): 59-63.

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

Canada Communicable Disease Report (CCDR). Exposure to thimerosal in vaccines used in canadian infant immunization programs, with respect to risk of neurodevelopmental disorders. *Public Health Agency of Canada* 2002; 28(09): 69-80.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 2003; 24(3):261-71.

Carmignani, M; Finelli, VN; Boscolo, P. mechanisms in cardiovascular regulation following chronic exposure of male rats to inorganic mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1983; 69: 442 – 450.

Carmignani M, Boscolo P, Artese L, Del Rosso G, Porcelli G, Felaco M, Volpe AR, Giuliano G.. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic Mercury in rats. *Br J Ind Med*. 1992; 49: 226-232.

Carranza-Rosales P, Said-Fernández S, Sepúlveda-Saavedra J, Cruz-Vega DE, Gandolfi AJ. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicol*. 2005; 210: 111-121.

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-media Ted smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*. 2000; 184 (3): 409-20.

Carvalho MH, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens* 2001; 8:76-88.

Chanez C, Flexor MA, Bourre JM. Effect of organic and inorganic mercuric salts on Na⁺K⁺ATPase in different cerebral fractions in control and intrauterine growth-retarded rats: alterations induced by serotonin. *Neurotoxicol*. 1989; 10 (4): 699-706.

Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiol*. 2006; 13: 171-81.

Chavez E, Zazueta C, Osornio A, Holguor JA, Miranda ME. Protective Behavior of captropil on Hg-induced toxicity on kidney mitochondria. *In vivo* and *in vitro* experiments. *J. Pharmacol. Experim. Ther.*, 1991; 256 ; 385 – 390.

Chen C, Qu L, Li B, Xing L, Jia G, Wang T, Gao Y, Zhang P, Li M, Chen W, Chai Z. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin Chem*. 2005; 51(4):759-769.

Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 2005; 11: RA194–RA205.

Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Kamp TJ, Kallen RG, Hofmann F, Flockerzi V, Marban E. Functional consequences of sulfhydryl modification in the pore-forming subunits of cardiovascular Ca^{++} and Na^{+} channels. *Circ Res* 1995; 76: 325–334.

Choi AL, Weihe P, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Salonen JT, Tuomainen TP, Murata K, Nielsen HP, Petersen MS, Askham J, Grandjean P. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in faroese whaling men. *Environ Health Perspect*. 2009; 117 (3): 367-372.

Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med*. 1992; 176(2):599-604.

Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazio M, De Cesare D, Iezzi A, Uchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E_2 -dependent plaque instability. *Circ* 2001; 104: 921–927.

Clarkson, TW. Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Ann Res Pharmacol Toxicol.*, 1993; 32: 545 – 571.

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

Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1731-1737.

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

Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertens*. 1994; 23: 229-35.

Crespo-Lo'pez ME, de Sa' AL, Herculano AM, Burbano RR, do Nascimento JLM. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. *Environ. Int.* 2007; 33: 141–146.

Cruzado MC, Rislér NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase activity during the development of hypertension: effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *Am J Hypertens* 2005;18:81–87.

Cunha FN, de Assis GPS, Silva CEC, Stefanon I, Pinto VD, Vassallo DV. Effects of mercury on the contractile activity of the right ventricular myocardium. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2001; 41: 374-380.

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.* 2000; 39: 124-130.

Danschér G, Horsted-Bindsley P, Rungby J. Traces of mercury in organs from primates with amalgam fillings. *Exp. Mol. Pathol.* 1990; 52: 291–299.

Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* 2001; 89 (8):650-660.

Davis LE, Kornfeld M, Mooney HS, Fiedler KJ, Haaland KY, Orrison WW, Cernichiari E, Clarkson TW. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Ann Neurol* 1994; 35 (6): 680-688.

Deeb RS, Resnick MJ, Mittar D, McCaffrey T, Hajjar DP, Upmacis RK. Tyrosine nitration in prostaglandin H₂ synthase. *J Lipid Res.* 2002; 43 (10):1718-26.

Dias, FMV. Atividade funcional da Na⁺K⁺ATPase sensível a ouabaína em aorta de ratas com e sem sinais de insuficiência cardíaca após infarto agudo do miocárdio. Dissertação de Mestrado, 2007. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Dieguez-Acuña FJ, Polk WW, Elis ME, Simmonds PL, Kushleika JV, Woods JS. Nuclear factor kappaB activity determines the sensitivity of kidney epithelial cells to apoptosis: implications for mercury-induced renal failure. *Toxicol Sci* 2004; 82(1):114-123.

Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2008; 102 (4): 488-96.

Drasch G, Schupp I, Hofl H, Reinke R, Roider G. Mercury burden of human fetal and infant tissues. *Eur. J. Ped.* 1994; 153: 607–610.

Drasch G, Wanghofer E, Roider G. Are blood, urine, hair, and muscle valid bio-monitoring parameters for the internal burden of men with the heavy metals mercury, lead and cadmium? *Trace Elem Electrolytes* 1997; 14: 116–123.

Drasch G, Aigner S, Roider G, Staiger F, Lipowsky G. Mercury in human colostrum and early breast milk. Its dependence on dental amalgam and other factors. *J. Trace Element Med. Biol.* 1998; 12: 23–27.

Eckhardt W, Bellmann K, Kolb H. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in α cells by environmental factors: heavy metals. *Biochem. J.* 1999; 338: 695- 700.

Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003; 81:1013–1028.

Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1514-29.

Español Cano S. Toxicología del mercurio. Actvaciones preventivas em sanidad lab oral y ambiental. In: JORNADA INTERNACIONAL SOBRE EL IMPACTO AMBIENTAL DEL MERCÚRIO UTILIZADO POR LA MINERIA AURÍFERA ARTESANAL EN IBEROAMÉRICA, 2001, Lima. **Anais eletrônicos**. Disponível em: <www.gama-peru.org/jornada-hg.htm>. Acesso em: 12 març. 2009.

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

Faria MAM. Mercurialismo metálico crônico ocupacional. *Rev Saúde Pública* 2003; 37 (1): 116-127.

Féléto M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H985-H1002.

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

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

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

Flora SJS, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 2008; 128: 501-523.

Forstemann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: Functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J*. 1993; 14 (1): 10-15.

Forstemann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schawarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide syntase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertens*. 1994; 23 (6 Pt 2): 1121-1131.

Freeman EJ, Ruehr ML, Dorman RV. Ang II-induced translocation of cytosolic PLA₂ to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998; 274: C282–C288.

Frolich JC; Forstemann V. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Adv Prostaglandin Tromboxane and Leukotriene Research* 1989;19: 211-215.

Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73: 395–401.

Fulton CT, Stallone JN. Sexual dimorphism in prostanoid-potentiated vascular contraction: roles of endothelium and ovarian steroids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283 (5): H2062-73.

Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1984; 24: 175-97.

Furchgott, RF; Zawadski, JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373-376.

Furieri, LB. Efeitos cardiovasculares da exposição crônica a cloreto de mercúrio em ratos. Dissertação de Mestrado, 2008. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Gao Y, Vanhoutte PM. Products of cyclooxygenase mediate the responses of guinea pig trachea to hydrogen peroxide. *J. Appl. Physiol*. 1993; 74, 2105: 2111.

Galic N, Prpic-Mehicic G, Prester LJ, Blanusa M, Krnic Z, Ferencic Z. Dental amalgam mercury exposure in rats. *Biometals* 1999; 12: 227–237.

Galic N, Prpic-Mehicic G, Prester LJ, Krnic Z, Blanusa M, Erceg D. Elimination of mercury from amalgam in rats. *J.Trace Element Med. Biol.* 2001; 15: 1–4.

García-Redondo AB, Briones AM, Beltrán AE, Alonso MJ, Simonsen U, Salaices M. Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxaneA₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 328 (1): 19-27.

Geier DA, Geier MR. Neurodevelopmental disorders after thimerosal-containing vaccines: a brief communication. *Exp Biol Med.* 2003; 228:660–664.

_____. _____. Early downward trends in neurodevelopmental disorders following removal of thimerosal-containing vaccines. *Jour AmerPhhs and Surgeons.* 2006; (11): 8-13.

Geier DA, King PG, Sykes LK, Geier MR. A comprehensive review of mercury provoked autism. *Indian J Med Res.* 2008; 128: 383-411.

Girardi G, Elías MM. Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 61-66.

Girouard H, de Champlain J. Inhibitory effect of melatonin on alpha1-adrenergic-induced vasoconstriction in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2004; 17: 339–346.

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

Gochfeld M. Cases of mercury exposure, bioavailability and absorption. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2003; 56(1):174-179.

Golpon HA, Puchner A, Barth P, Welte T, Wichert PV, Feddersen CO. Nitric oxide-dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. *Toxicol.* 2003. 192: 179-188.

Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology. *The Basic Science of Poisons* 1996, 5: 709–712.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141–1148.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superóxide anion is involved in the breakdown of endothelium- derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320 (6061): 454-456.

Gstraunthaler G, Pfaller W and Kotanko P. Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate-induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol.* 1983; 32: 2969–2972.

Guallar E, Sanz-Gallardo MI, Van't Veer P, Bode P, Aro A, Gómez-Aracena J, Kark JD, Riemersma RA, Martín-Moreno JM, Kok FJ. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *NEJM.* 2002; 347: 1747-1454.

Guzzi G, Grandi M, Cattaneo C. Should amalgam fillings be removed? *Lancet* 2002; 360:2081.

Guzzi G, Grandi M, Cattaneo C, Calza S, Minoia C, Ronchi A, Gatti A, Severi G. Dental amalgam and mercury levels in autopsy tissues: food for thought. *Am. J. Forens. Med. Pathol* 2006; 27: 42–45.

Hacon S, Barrocas PRG, Vasconcellos ACS, Barcellos C, Wasserman JC, Campos RC, Ribeiro C, Azevedo-Carlioni FB. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24 (7): 1479-1492.

Hahn LJ, Kloiber R, Vimy MJ, Takahashi Y, Lorscheider FL. Dental “silver” tooth fillings: A source of mercury exposure revealed by whole-body image scan and tissue analysis. *FASEB J.* 1989; 3: 2641–2646.

Hahn JL, Kloiber R, Leininger RW, Vimy MJ, Lorscheider FL. Whole-body imaging of the distribution of mercury release from dental fillings into monkey tissues. *FASEB J* 1990; J(4): 3256 – 3260.

Halbach, S; Schonsteiner, G; Ebner, F; Reiter, M. The effects of *p*-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBS) on force of contraction of mammalian myocardium and on ATPase. *Naun.-Schm. Arch. Pharmacol.*, 1981; 318: 121 – 129.

Halbach, S. Mercury compounds: lipophilicity and toxic effects on isolated myocardial tissue. *Arch. Toxicol.* 1990; 64: 5301 – 5319.

Hallgren CG, Hallmans G, Jansson JH, Marklund SL, Huhtasaari F, Schutz A, Stromberg U, Vessby B, Skerfving S. Markers of high fish intake are associated with decreased risk of a first myocardial infarction. *Br J Nutr* 2001; 86 (3); 397-404.

Hamilton CA, Brosnan MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF. NAD(P)H Oxidase Inhibition Improves Endothelial Function in Rat and Human Blood Vessels. *Hypertens.* 2002; 40: 755-762.

Hargreaves RJ, Evans JG, Janota I, Magos L, Cavanagh JB. Persistent mercury in nerve cells 16 years after metallic mercury poisoning. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1988; 14: 443–452.

Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Heart Vessels* 1998; 13: 9–17.

Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89 (23):11259-11263.

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

Heintze U, Edwardsson S, Derand T, Birkhed D. Methylation of mercury from dental amalgam and mercuric chloride by oral streptococci in vitro. *Scand. J. Dent. Res*. 1983; 91:150–152.

Heller R, Polack T, Grabner R, Till U. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atheroscler*. 1999; 144 (1):49-57.

Hodgson S, Nieuwenhuijsen MJ, Elliott P, Jarup L. Kidney disease mortality and environmental exposure to mercury. *Am J Epidemiol* 2007;165: 74-77.

Holmes AS, Blaxill MF, Haley BE. Reduced levels of mercury in first baby haircuts of autistic children. *Int. J. Toxicol*. 2003; 22: 277–285.

Houriuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent Progress in Angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertens*. 1999; 33: 613-621.

Houston MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med* 2007;13: S128–133.

Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, and Hoffman BB. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 563–573.

Huang CF, Hsu CJ, Liu-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.* 2008; 176 (3):188-197.

Hui RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res. Comunic.* 1993; 18(4): 195-199.

Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990; 30: 633–673.

Hylander L, Lindvall A, Gahnberg L. High mercury emissions from dental clinics despite amalgam separators. *Sci. Total Environ.* 2006a; 362:74–84.

Hylander L, Goodsite M. Environmental costs of the mercury pollution. *Sci. Total Environ* 2006b; 368: 352–370.

Hylander L, Lindvall A, Uhrberg R, Gahnberg L, Lindh U. Mercury recovery in situ of four different dental amalgam separators. *Sci. Total Environ.* 2006c; 366:320–336.

Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985; 25: 171-191.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). Methylmercury. *Environmental Health Criteria. World Health Organization* 1990; 101:144.

Jin N, Rhoades RA. Activation of tyrosine kinases in H₂O₂-induced contraction in pulmonary artery. *Am J Physiol.* 1997; 272: H2686 ± H2692.

Johnson, CL. Mercury in the Environment: Sources, toxicities, an prevention of exposure. *Pediat. ann.*, 2004; 33: 437 – 442.

Kim SH, Sharma RP. Mercury alters endotoxin-induced inflammatory cytokine expression in liver: differential roles of p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2005; 27(1): 123-135.

Kim SH, Sharma RP. Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogenactivated protein kinase signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004; 196: 47-57.

Kishimoto T, Oguri T, Ueda D, Tada M. Methylmercury modulation of monocyte chemotactic protein-1 mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Hum Cell*. 1996; 9(4):371-374.

Kitahara SE, Okada IA, Sakuma AM, Zenebon O, Jesus RS, Tenuta-Filho A. Mercúrio total em pescado de água-doce. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2000; 20 (2): 267-273.

Knapp LT, Klann E. Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *J Biol Chem*. 2000; 275 (31):24136-45

Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999; 43: 562-71.

Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovasc Res*. 2009; 81(4):649-59.

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

Kosta L, Byrne AR, Zelenko V. Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury. *Nature* 1975; 254: 238–9.

Kozma L, Lenkey A, Varga E, Gomba S. Induction of renin release from isolated glomeruli by inorganic mercury(II). *Toxicol Lett*. 1996; 85 (1): 49-54.

Kubes, P; Suzuki, M; Granger, DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88 (11): 4651-4655.

Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994; 368: 703-10.

Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ and for the Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circ*. 2002; 106: 2747– 57.

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitricoxide synthase. *J Biol Chem*. 2003; 278: 22546-22554.

Lacerda LD. Contaminação por mercúrio no Brasil: fontes industriais vs garimpo de ouro. *Química Nova* 1997; 20(2): 196-199.

Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93 (26): 15069-74.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest*. 2003. 111:1201-1209.

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

Laursen, JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice. Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circ.* 2001; 103: 1282-1288.

Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system an endocrine and paracrine system . *Endocrinol.* 2003; 144:2179-83.

Lee CH, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* 2007; 232: 592-606.

Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 1045-1059.

Leistevuo J, Leistevuo T, Helenius H, Pyy L, Osterblad M, Huovinen P, Tenovuo J. Dental amalgam fillings and the amount of organic mercury in human saliva. *Caries Res* 2001; 35: 163–166.

Lebel J, Mergler D, Branches F; Lucotte M, Amorim M, Larribe F; Dolbec J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian. *Basin. Environ Res.* 1998, 79:20-32.

Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, Krier JD, Schwartz RS, Napoli C, Romero JC. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertens.* 2001; 37 (2): 541-546.

Levey M, Schwartz S, Dijak M, Weber JP, Tardif R, Rouah F. Childhood urine mercury excretion: dental amalgam and fish consumption as exposure factors. *Environ. Res* 2004; 94: 283–290.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review. CGMP- dependent protein kinase signalling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression . *J Appl Physiol* 2001; 91: 1421-30.

Long CJ, Stone TW. The release of endothelium-dependent relaxant factor is calcium dependent. *Blood Vessels* 1985; 205-208.

Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 315(3):1058-64.

Lorscheider FL, Vimy MJ. Mercury exposure from “silver” fillings. *Lancet.* 1991; 337:1103.

Lorscheider FL., Vimy MJ, Summers AO. Mercury exposure from “silver” tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. *FASEB J* 1995; 9: 504–508.

Luglie PF, Campus G, Chessa G, Spano G, Capobianco G, Fadda GM, Dessole S. Effect of amalgam fillings on the mercury concentration in human amniotic fluid. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2005; 271: 138–142.

Lund BO, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45(10): 2017-2024.

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

Mackenzie A, Filippini S, Martin W. Effects of superoxide dismutase mimetics on the activity of nitric oxide in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 1999; 127, 1159 - 1164.

Magos L. Review on the toxicity of ethylmercury, including its presence as a preservative in biological and pharmaceutical products. *J Appl Toxicol*. 2001; 21: 1-5.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen - derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol*. 1997. 15:279-307.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol*. 1995;15 (4): 279-307.

Mardini IA, FitzGerald GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. *Mol Interv*. 2001;1 (1): 30-8.

Massaroni L, Oliveira EM, Stefanon I, Vassallo DV. Effects of Mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25: 861-864.

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

Mason HJ, Hindell P, Williams NR. Biological monitoring and exposure to mercury. *Occup Med* 2001; 1: 2–11.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin. Invest* 2000; 106:1521–1530.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics* 2007; 62(1):77-86.

Mayer B, Werner ER. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995; 351(5):453-63.

Mckelvey W; Gwynn C, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, Palmer CD, Parsons PJ. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood. *Environ Health Perspectives*. 2007; 115 (10): 1435:41.

Melo LG, Gneccchi M, Pachori AS, Kong D, Wang K, Liu X, Pratt RE, Dzau VJ. Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(10):1761-1774.

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

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

Milstein S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 681-684.

Moncada S; Palmer RMJ; Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev*. 1991; 43: 109-142.

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

Morishita R, Higaki J, Miyazaki M, Ogihara T. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertensio* 1992; 19:62-67.1992.

Morgan DL, Chanda SM, Price HC, Fernando R, Liu J, Brambila E, O'Connor RW, Beliles RP, Barone SJr. Disposition of inhaled mercury vapor in pregnant rats: maternal toxicity and effects on developmental outcome. *Toxicol. Sci*. 2002; 66: 261–273.

Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health. *JAMA* 2006; 296: 1885–1899.

Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25 (2): 272-273.

Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP dependent protein kinase. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 2005; 25: 1-7.

Mutter J, Naumann J, Guethlin C. Comments on the article “The toxicology of mercury and its chemical compounds” by Clarkson and Magos (2006). *Crit Rev Toxicol.* 2007; 37:537–549.

National Academy of Sciences. Toxicological effects of methylmercury. *National Research Council*, Washington, DC, USA. 2000.

National Research Council. Health effects of methylmercury. In: Toxicological effects of methylmercury. Washington, DC: National Academy Press, 2000. p 147-249.

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

Nakazawa N, Makino F, Okada S. Acute effects of mercury compounds on cultured mammalian cells. *Biochem Pharmacol.* 1975; 24: 489–493.

Narumiya S; Sugimoto, Y; Ushikubi, F. Prostanoid receptor: structure, properties, and function. *Physiol Rev.* 1999; 70 (4): 1193-1226.

Natarajan V, Scribner WN, Al-Hassani M, Vepa S. Reactive oxygen species signaling through regulation of protein tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Environ Health Perspect.* 1998; 106: 1205–1212.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995; 268:C799-822.

Niagru JO. Mercury pollution in Brazil. *Nature* 1992; 356:389.

Nylander M, Weiner J. Mercury and selenium concentrations and their interrelations in organs from dental staff and the general population. *Br J Ind Med.* 1991;48:729–34.

Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypert.* 2000; 35: 68–75.

Oka M; Horroben DF; Mankei MS; Cunname SC; Ally AI; Morgan RO. Effect of mercuric chloride on the rat mesenteric vascular bed: Relevance to the mechanism of mercury toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1979; 51:427–438.

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

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

Oomen CM, Feskens EDM, Rasanen L, Fidanza F, Nissinen AM, Menotti A, *et al.* Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy, and the Netherlands. *Am J Epidemiol.* 2000; 151:999–1006.

Opitz H, Schweinsberg F, Grossmann T, Wendt-Gallitelli MF, Meyermann R. Demonstration of mercury in the human brain and other organs 17 years after metallic mercury exposure. *Clin. Neuropathol.* 1996; 15:139–144.

Ortiz, Enrique. Garimpo cresce com a crise. Rios e florestas da fronteira Peru-Brasil sofrem impactos severos. 2009. Disponível em: <blogdaamazonia.blog.terra.com.br/files/2009/0>. Acesso em: 03 março 2009.

Oskarsson A, Schultz A, Skerfving S, Hallen IP, Ohlin B, Lagerkvist BJ. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch. Environ. Health* 1996; 51:234–241.

Palmer, RM; Ferrige, AG; Moncada, S. nitric oxide release account for the biological activity of endothelium - derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 247–258.

Parker SK, Schwartz B, Todd J, Pickering LK. Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorder: a critical review of published original data. *Pediatrics* 2004; 114; 793-804.

Parkington HC, Tonta MA, Coleman HA, Tare M. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* 1995; 484 (2): 469-80.

Passos CJS, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the amazon: a review. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24 (4): S503-S520.

Patiño JSR, Filho GIR. Riscos ocupacionais à exposição ao mercúrio em trabalhadores de serviços de saúde pública- uma abordagem ergonômica. In: XXV ENCONTRO NAC. DE ENG. DE PRODUÇÃO, 2005, Porto Alegre, RS. **Anais eletrônicos.** Disponível em: <www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2005_Enegep>. Acesso em: 02 fev. 2009.

Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:850–853.

Peçanha FM. 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. Tese de Doutorado, 2009. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Perspect.* 1998;106(1):203-216.

Pesce AJ, Hanenson I, Sethi K. Beta2 microglobulinuria in a patient with nephrotoxicity secondary to mercuric chloride ingestion. *Clin Toxicol.* 1977; 11 (3): 309-315.

Pichichero ME, Cernichiari E, Lopricato J, Treanor J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. *Lancet* 2002; 360: 1737-1741.

Pinheiro MC, Macchi BM, Vieira JL, Oikawa T, Amoras WW, Guimarães GA, Costa CA, Crespo-López ME, Herculano AM, Silveira LC, do Nascimento JL. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. *Environ Res.* 2008; 107 (1): 53-9.

Pizzichini M, Fonzi M, Giannerini M, Mencarelli M, Gasparoni A, Giovannino R, Kaitsas V, Fonzi L. Influence of amalgam fillings on Hg levels and total antioxidant activity in plasma of healthy donors. *Sci. Total Environ* 2003; 301:43–50.

Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen GM. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; 274(14):9573-80.

Prabhu SD, Salama G. The heavy metal ions Ag⁺ and Hg⁺⁺ trigger calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 1990; 277:47–55.

Prado MJV, de Oliveira RC, Ferreira RSF, Vieira RCPA, Pinho JJRG. A retirada do timerosal do mercado farmacêutico e sua substituição pelos derivados de amônio quaternário. Avaliação do risco/benefício. *Lecta* 2004; 22(1/2): 37-47.

Rajanna B, Hobson M, Harris L, Ware L, Chetty CS. Effects of cadmium and mercury on Na⁺K⁺ATPase, ATPase and uptake of 3H-dopamine in rat brain synaptosomes. *Arch Int Physiol Biochim* 1990; 98 (5): 291-296.

Rao, MV; Chinoy, NI; Suthar, MB; Rajvanshi, MI. Role of ascorbic acid on mercuric-induced genotoxicity in human blood cultures. *Toxicol. InVitr.*, 2001; 15: 649 – 654.

Rapopport RM, Murod F. Agonist – induced endothelium-dependent relaxation in the aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*. 1983; 52: 353-357.

Rekacewicz, Philippe. Mercury pollution - transport and cycle. UNEP/GRID-Arendal 2004. Disponível em:< http://www.vitalgraphics.net/waste/html_file/16-17_consumpti .>. Acesso em: 03 março 2009.

Rhee HM, Choi BH. Hemodynamic and electrophysiological effects of mercury in intact anesthetized rabbits and in isolated perfused hearts. *Experim. Molec. Patholog*. 1988; 50: 281 – 290.

Rice DC. The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. *Environ Res*. 2004; 95: 406-413.

Rissanem T, Voutilainen S, Nyysönen K, Lakka TA, Salonen JT. Fish oil-derived fatty acids, eicosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Circul*. 2000; 102 (22):2677-2679.

Rodriguez-Porcel M, Lerman A, Best PJ, Krier JD, Napoli C, Lerman LO. Hypercholesterolemia impairs myocardial perfusion and permeability: role of oxidative stress and endogenous scavenging activity. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37 (2): 608-15.

Rooney JPK. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 2007; 234:145–156.

Rosen GM, Freeman BA. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81 (23): 7269-73.

Rossoni LV, Amaral SMC, Vassallo PF, França A, Oliveira EM, Varner KJ, Mill JG, Vassallo DV. Effects of Mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32: 989-997.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986; 250: H820-H827.

Saint-Phard D, Dorsten BV. Mercury toxicity: Clinical presentation in musculoskeletal medicine. *Orthoped.* 2004; 4 (27): 394 – 399.

Salonen JT, Salonen R, Seppänen K, Kantola M, Suntioinen S, Korpela H. Interactions of serum copper, selenium, and low density lipoprotein cholesterol in atherogenesis. *Br Med J.* 1991; 302: 756-760.

Salonen JT, Seppänen K, Nyyssönen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, Tuomilehto J, Esterbauer H, Tatzber F, Salonen R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern finnish men. *Circulation* 1995; 91; 645-655.

Salonen JT, Seppänen K, Lakka TA, Salonen R, Kaplan GA. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis* 2000; 148, 265–273.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G proteincoupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(14):8258– 8263.

Sato RL, Li GG, Shaha S. Antepartum seafoof consumption and mercury levels in newborn cord blood. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194 (6): 1683-1688.

Schiffirin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of reninangiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol.* 2004; 287: H435–H446.

Schiffirin EL: A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38(2):S3–S6.

Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1999; 155 (4): 1281-1291.

Scott-Burden T. Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 1995; 91 (1): 248-50.

Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation.* 1993; 87(Suppl V): V51-V55.

Seppanen K, Laatikainen R, Salonen JT, Kantola M, Lotjonen S, Harri M, et al. Mercury-binding capacity of organic and inorganic selenium in rat blood and liver. *Biol Trace Elem Res.*1998; 65:197– 210.

Shamoo AE, MacLennan DH. Separate effects of mercurial compounds on the ionophoric and hydrolytic functions of the (Ca⁺⁺ -Mg⁺⁺)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Membr Biol.* 1975; 25: 65-74.

Sheenan DW, Giese EC, Gugino SF, Russell JA. Characterization and mechanisms of H₂O₂-induced contractions of pulmonary arteries. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: H1542 ±H1547.

Shenker BJ, Guo TL, Shapiro IM. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. *Environ Res.* 1998; 77 (2): 149-159.

Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 39: 725–732.

Simmons-Willis TA, Koh AS, Clarkson TW, Ballatori N. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neural amino acid transport (LAT) 1 and LAT2. *Biochem. J.* 2002; 367:239-246.

Skanker G, Aschner JL, Syversen T. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004; 128(1):48-57.

Skanker G, Syversen T, Aschner JL, Aschner M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 137: 11-22.

Smith J, Farris FF. Methyl mercury pharmacokinetics in man: a reevaluation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;137:245-52.

Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest.* 2005;35(5):305-14.

Sørensen N, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiol.* 1999, 10:370-375.

Souza HP, Laurindo FR, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280: H658–H667.

Srivastava RK, Hutson N, Martin B, Princiotta F, Staudt J. Control of mercury emissions from coal-fired electric utility boilers. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40:1385–1393.

Srivastava P, Hegde LG, Patnaik GK, Dikshit M. Role of endothelial-derived reactive oxygen species and nitric oxide in norepinephrine-induced rat aortic ring contractions. *Pharmacol Res.* 1998; 38: 265–274.

Stacchiotti A, Ricci F, Rezzani R, Li Volti G, Borsani E, Lavazza A, Bianchi R, Rodella LF. Tubular stress proteins and nitric oxide synthase expression in rat kidney exposed to mercuric chloride and melatonin. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54 (10): 1149-1157.

Stern AH. A revised probabilistic estimate of the maternal methyl mercury intake dose corresponding to a measured cord blood mercury concentration. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 155-63.

Su JY, Chen W. The effects of methylmercury on isolated cardiac tissues. *Am J Pathol.* 1979; 95: 753-764.

Sugita M. The biological half-time of heavy metals. The existence of a third, “slowest” component. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1978; 41:25–40.

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.* 2005; 3 (4): 305-22.

Swain EB, Jakus PM, Rice G, Lupi F, Maxson PA, Pacyna JM, Penn A, Spiegel SJ, Veiga MM. Socioeconomic consequences of mercury use and pollution. *Ambio* 2007; 36 (1):45-61.

Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;232(1):27-37.

Takahashi Y, Tsuruta S, Hasegawa J, Kameyama Y, Yoshida M. Release of mercury from dental amalgam fillings in pregnant rats and distribution of mercury in maternal and fetal tissues. *Toxicol*. 2001; 163: 115–126.

Takahashi Y, Tsuruta S, Arimoto M, Tanaka H, Yoshida M. Placental transfer of mercury in pregnant rats which received dental amalgam restorations. *Toxicol*. 2003; 185: 23–33.

Taueg C, Sanfilippo DJ, Rowens B. Acute and chronic poisoning from residential exposures to elemental mercury. *J. Toxicolol. Clin. Toxicolol*. 1992; 31 (1): 63-67.

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit. *EMEA public statement on thiomersal containing medicinal products*. 8 July 1999, Doc. Ref. EMEA/20962/99. URL: <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/press/pus/2096299EN.pdf>.

The Madison Declaration on Mercury Pollution. *Ambio* 2007; 36 (1); 62-65.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypert*. 2004. 44: 248-252.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000; 52 (4): 639-72

Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ng ES, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease--a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res.* 2003; 39(6):249-67.

Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Webb RC, Carvalho MH. Endothelin, sex and hypertension. *Clin Sci* 2008;114(2):85-97.

United Nations Environment Program, Chemicals. Global Mercury Assessment. 2002. Disponível em: < www.unep.org >. Acesso em: 9 fevereiro, 2009. United State Environmental Protection Agency (US EPA). Regulatory impact analysis of the final clean air mercury rule. Office of air quality planning and standards, air quality strategies and standards division, innovative strategies and economics group (MD 339-01). Research Triangle Park, NC. 2005.

United State Food and Drug Administration, US Environmental Protection Agency. What you need to know about mercury in fish and shellfish. 2004. Disponível em: <www.fda.gov/oc/opacom/hottopics/mercury/backgrounder>. Acesso em: 10 março, 2009.

United State Food and Drug Administration, US Environmental Protection Agency. Thimerosal in Vaccines. *Center of Biologics Evaluation and Research.* 2008. Disponível em: <www.fda.gov/Cber/vaccine/thimerosal.htm>. Acesso em: 10 fevereiro 2009.

Urakami-Harasawa L, Shimokava H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2793-9.

Vahter M, Akesson A, Lind B, Bjöurs U, Shülte A, Berglund M. Longitudinal study of metylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating womem, as well as in umbilical cord blood. *Environ. Res.* 2000; 84: 186-194.

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 USA*. 1994; 91 (6): 2046-50.

Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction. The first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J*. 2009; 73: 595 – 601.

Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2005; 144: 449–458.

Vanhoutte, PM. How to assess endothelial function in human blood vessels. *J Hypertens*. 1999; 17: 1047-1058.

Vanhoutte, PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 1993; 87 (Suppl V): V9-V7.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, and Pritchard Jr. KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; 95:9220-9225.

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

Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2: 582–593.

Vimy MJ, Takahashi Y, Lorscheider FL. Maternal-fetal distribution of mercury (203 Hg) released from dental amalgam fillings. *Am J Physiol*. 1990; 258 (4Pt2): R939-945.

Vimy MJ, Hooper DE, King WW, Lorscheider FL. Mercury from maternal “silver” tooth fillings in sheep and human breast milk. A source of neonatal exposure. *Biol. Trace Element Res.* 1997; 56:143–152.

Virtanen JK, Rissanen TH, Voutilainen S, Toumainen T. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Nutr. Biochem.* 2007; 18, 75–85.

Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Tuomainen TP, Korhonen MJ, Valkonen VP, Seppänen K, Laukkanen JA, Salonen JT. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 228-233.

Wei EP, Kontos HA, Beckman JS. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am. J. Physiol.* 1996; 271, H1262: H1266.

Weinsberg F, Bickmeyer U, Wiegand H, Effects of inorganic mercury (Hg ⁺⁺) on calcium channel currents and catecholamine release from bovine chromaffin cells. *Arch Toxicol.* 1995; 69 (3): 191-196.

Wever RM, Van Dam T, Van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237 (2): 340-344.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JR Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1149-1160.

Wiggers GA, Stefanon I, Padilha AS, Peçanha FM, Vassallo DV, Oliveira EM. Low nanomolar concentration of Mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2008a; 147: 252-260.

Wiggers GA, Pecanha FM, Briones AM, Perez-Giron JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaces M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008b; 295:H1033-H1043.

Wiggers GA. Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos. Tese de Doutorado, 2008c. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Wolf MB, Baynes JW. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *BioMetals* 2007; 20:73–81.

Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res*. 2002; 39 (3): 191-207.

Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20 (6):1430-42.

World Health Organization. Methylmercury. Apud *Environmental Health Criteria*, 101, Geneva, 1990;188:168p.

World Health Organization. Methylmercury. Apud *Environmental Health Criteria*, 118, Geneva. Switzerland. 1991.

World Health Organization. Guidelines on regulatory expectations related to the elimination, reduction or replacement of thiomersal in vaccines. *Technical Report Series* 2004; 926: 95-102.

World Health Organization. Mercury in Health Care. *PolicyPaper*. 2005. Disponível em: <www.who.int/watersanitationhealth/mercurypolpaper.pdf>. Acesso em: 03 março 2009.

World Health Organization. Mercury: assessing the environmental burden of disease at national and local levels. *Environmental Burden of Disease Series* 2008;16:1-60.

Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(5):R1343-60.

Wu KK, Liou JY, Cieslik K. Transcriptional Control of COX-2 via C/EBPbeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25 (4): 679-85.

Wu KK. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol*. 1995; 33: 179-207.

Yamazaki T, Komuro I, Shiojima E, Yazaki Y. The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart* 1996;76: 33-35.

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*. 1998; 98(3):181-188.

Yannai S, Berdicevsky I, Duek L. Transformations of inorganic mercury by *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol* 1991; 57:245–247.

Yeh JH, Chung HM, Ho CM, Jan CR. Mercury-induced Ca²⁺ increase and cytotoxicity in renal tubular cells. *Life Sciences* 2004; 74: 2075–2083.

Yoshida M, Satoh M, Shimada A, Yamamoto E, Yasutake A, Tohyama C. Maternal-to-fetus transfer of mercury in metallothionein-null pregnant mice after exposure to mercury vapor. *Toxicol*. 2002; 175:215–222.

Yoshida M, Watanabe C, Satoh M, Yasutake A, Sawada M, Ohtsuka Y, Akama Y, Tohyama C. Susceptibility of metallothionein-null mice to the behavioural alterations caused by exposure to mercury vapour at human-relevant concentration. *Toxicol.Sci.* 2004; 80: 69–73.

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. *NEJM.* 2002; 347: 1755-1760.

Zalups RK, Bridges CC. MRP2 involvement in renal proximal tubular elimination of methylmercury mediated by DMPS or DMSA. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 235 (1): 10-7.

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

Zalups RK, Lash LH. Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J. Toxicol. Environ. Health* 1994; 42: 1–44.

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

Zeitz P, Orr MF, Kaye WE. Public health consequences of mercury spills: Hazardous Substances Emergency Events Surveillance System, 1993–1998. *Environ Health Perspect.* 2002; 110: 129–132.

Zou M, Yesilkaya A, Ullrich V. Peroxynitrite inactivates prostacyclin synthase by heme-thiolate-catalyzed tyrosine nitration. *Drug Metab Rev.* 1999;31(2):343-9.