

Efeitos da exposição crônica a baixas concentrações de
cloreto de mercúrio (20 η M) sobre o sistema
cardiovascular de ratos

KARINA GIUBERTI

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

**Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Outubro de 2010**

Efeitos da exposição crônica a baixas concentrações de
cloreto de mercúrio (20 ηM) sobre o sistema
cardiovascular de ratos

KARINA GIUBERTI

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

Aprovada em 05 / 10 / 2010 por:

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

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Co-orientador nacional - UFES

Prof^a. Dr^a. Mercedes Salaices Sánchez – Co-orientadora no exterior - UAM

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto - UFES

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira - UFES

Prof^a. Dr^a. Ana Lucia Kalinin – UFSCAR

Coordenador do PPGCF: _____

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Giuberti, Karina.

Efeitos da exposição crônica a baixas concentrações de cloreto de mercúrio (20 η M) sobre o sistema cardiovascular de ratos. [Vitória] 2010.

XXI, 129p, 29,7 cm (UFES, PhD., Ciências Fisiológicas, 2010)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Cloreto de mercúrio 2. ECA 3. Estresse oxidativo 4. Pressão arterial sistólica

Ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço àqueles que de alguma maneira, deram a sua contribuição para que esta tese fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

À Deus, fonte de toda a minha inspiração.

À minha família, especialmente minha mãe, pelo amor e apoio indiscutível em todos os momentos de minha vida. Ao meu irmão e sua família pelo carinho e incentivo.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon, o meu profundo agradecimento pela sua orientação, que ultrapassou a tese e chegou à muitos momentos da minha vida. Agradeço pela sensibilidade, paciência, oportunidade, carinho e respeito nestes anos de convivência e de trabalho. Não te esquecerei.

Ao meu querido Chefe Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, responsável em grande parte pelos inúmeros momentos de descontração e alegria, desde que entrei no LEMC. Obrigada por ter sido meu co-orientador, colaborando decisivamente com esta tese. Sou imensamente agradecida por toda a generosidade e carinho.

Aos queridos professores Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto, Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira e Dr^a Ana Lucia Kalinin, por terem aceitado participar da banca deste trabalho.

À querida Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha pela amizade e disponibilidade quando sempre precisei.

Agradezco también a todas las personas que he tenido la suerte de conocer durante mi estancia de doctorado en España.

A mi familia española Rubén y Ana por todo el amor que me dedicasteis y me seguís dedicando, mismo en la distancia estáis bien cerca de mí. Gracias.

A la Prof^a. Dr^a. Mercedes Salaiques Sánchez por todas las consideraciones indispensables sobre este trabajo y los resultados obtenidos pero, principalmente por la cálida y delicada acogida cuando yo estuve en la UAM. Menciono aquí mi inmensa admiración y gratitud por todo lo que pude aprender y vivir en su laboratorio. Le estoy enormemente agradecida.

A la Prof^a. Dr^a. María Jesús Alonso por su inmenso cariño y sus inteligentes opiniones en las reuniones de los viernes.

A la queridísima Dr^a. Marta Miguel en verdad no sé como comenzar... gracias por enseñarme sobre ECA, cultivos celulares, Western, fluorímetro y sobre todo por motivarme todos los días que pase en el L4. Su inteligencia está presente en muchos de los resultados de esta tesis. Todo mi cariño y admiración.

A mi linda Amada (Dr^a. Amada Beltrán) su nombre ya lo dice todo, por mucho que lo dudase siempre fue y aun es muy amada por todos los que te conocen. Le agradezco todo lo que me enseñó en la campana de los cultivos, LDH y cuantificación de proteínas y principalmente por los momentos de sinceridad y amistad, de alegría y de lágrimas compartidos tanto dentro como fuera del L4. Besos para Adancito.

A la querida Dr^a. Ana María Briones te estoy muy agradecida por compartir tus conocimientos y por toda la ayuda que obtuve en el L4 y que han sido imprescindibles para los resultados aquí presentes, principalmente con el confocal. Gracias por su atención y enseñanzas.

A la Dr^a. Ana García, una amiga siempre atenta para ayudarme, un beso muy grande en agradecimiento.

A la siempre alegre Marisol Avendaño gracias por el compañerismo y amistad. Contigo las cañas y las tapas se volvieron inolvidables, besos guapa.

A mi querida Marta Gil Ortega por todo el afecto comprensión y gentileza con que tú y toda tu familia me tratasteis cuando viví en España. Muchísimas gracias por una amistad que espero dure para siempre.

Al Prof. Dr. Vicente Lahera Juliá que junto con el Prof. Dr. Dalton y la Prof^a. Dr^a. Ivanita hicieron posible la idea de mi estancia de doctorado sandwich. Gracias.

A la cariñosa Prof^a. Dr^a. Victoria Cachofeiro por todo su apoyo y amistad. Muchas gracias.

Aos brasileiros que conheci na Espanha e que se tornaram meus grandes amigos: Tiago Fernandes, a minha chegada teria sido infinitamente mais difícil se você ali não estivesse. Muito obrigada meu amigo. Aos queridos Fernanda Roque e Felipe Redondo, obrigada pela convivência agradável e pela amizade. Madrid foi sem dúvida muito melhor com vocês. Guardo com muito carinho estas lembranças.

Não poderia falar deste trabalho sem agradecer à dedicada e sempre disposta Bruna Fernandes Azevedo. Bruna, você foi companheira em tudo. Meus sinceros agradecimentos. Valeu!

Também tenho que agradecer ao amigo Rogério Faustino (nem sempre tão disposto! rs!). Roger muito obrigada por tudo.

Aos amigos e companheiros do LEMC, quero agradecer a todos, porque com certeza cada um de vocês muito contribuiu para a realização desta tese.

Aos insubstituíveis Frank Maciel Peçanha, Giulia Wiggers, Patrícia Rocon Bianchi, Flávia Smith e Fabiano Elias Xavier, vocês estão do lado esquerdo do peito, dentro do coração. Foram companheiros no LEMC e são amigos na vida. Obrigada.

À minhas grandes amigas, carinhosas, divertidas e constantes incentivadoras do projeto-tese-doutorado: Liliana A. P. de Barros (Lilis, obrigada por toda ajuda, confiança, dedicação e cuidado), Elenice Moreira Lemos (obrigada pelos conselhos valiosos) e Mônica L. Alcure (obrigada pela atenção quando o doutorado era apenas uma idéia).

Aos funcionários Fonseca e Cláudia pelo essencial apoio técnico.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FAPES/ FUNCITEC (Fundação de Apoio a Pesquisa do ES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

I INTRODUÇÃO

1 Metais pesados	21
2 Mercúrio	22
2.1 Características gerais	22
2.2 Ciclo do mercúrio no meio ambiente	23
2.3 Catástrofes ambientais	24
2.4 Mecanismos de toxicidade do mercúrio	25
2.5 Mercúrio e os seres vivos	
2.5.1 Legislação	29
2.5.2 Biomarcadores	
2.5.3 Mercúrio orgânico	30
2.5.4 Mercúrio inorgânico	32
2.5.4.1 No cérebro	33
2.5.4.2 Nos pulmões	34
2.5.4.3 Nos rins	34
2.5.4.4 No sistema cardiovascular	35
2.5.4.5 Em outros órgãos	39
5 Justificativa do trabalho	40

II OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
III MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Animais experimentais	44
3.2 Modelo experimental	44
3.3 Avaliação ponderal	45
3.4 Análise da pressão arterial sistólica	45
3.5 Avaliação hemodinâmica	45
3.6 Análise histológica	46
3.7 Análise hematológica e do perfil bioquímico	46
3.8 Determinação da atividade da ECA no plasma e nos órgãos	47
3.9 Medida da produção de MDA no plasma e nos órgãos	
3.10 Avaliação da citotoxicidade do HgCl ₂ em células musculares lisas de aorta de ratos Wistar	48
3.10.1 Cultivo celular	
3.10.2 Microscopia confocal	
3.11 Expressão dos resultados e análise estatística	48
3.12 Fármacos e reagentes utilizados	49
IV RESULTADOS	
4.1 Avaliação ponderal	52
4.2 Avaliação da PAS por pletismografia	53
4.3 Avaliação hemodinâmica	54
4.4 Avaliação histológica	56
4.5 Avaliação hematológica	56
4.6 Avaliação do perfil bioquímico	59
4.7 Avaliação da atividade da ECA no plasma e nos órgãos	60

4.8 Medida da produção de MDA no plasma e nos órgãos	
4.9 Avaliação da citotoxicidade do HgCl₂ em células musculares lisas de aorta de ratos Wistar	68
V DISCUSSÃO	
5.1 Avaliação ponderal	70
5.2 Avaliação dos parâmetros de pressão arterial	71
5.2.1 Pressão arterial sistólica	71
5.2.2 Parâmetros hemodinâmicos	73
5.3 Avaliação histológica	75
5.4 Avaliação hematológica	77
5.5 Avaliação do perfil bioquímico	79
5.6 Avaliação da atividade da ECA no plasma e nos órgãos	81
5.7 Medida da produção de MDA no plasma e nos órgãos	
5.8 Avaliação da citotoxicidade do HgCl₂ em células musculares lisas de aorta de ratos Wistar	85
5.9 Ratos espontaneamente hipertensos	87
5.10 Significado do estudo	
VI CONCLUSÃO	90
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Valores dos pesos corporal (PC), cérebro/PC, coração/PC, rins/PC, pulmões/PC, adrenais/PC, baço/PC e fígado/PC em ratos Wistar (CT e Hg) e SHR (CT e Hg) após o tratamento de 30 dias com HgCl ₂ .	52
Tabela 2: Valores da pressão arterial sistólica (PAS - mmHg) medidos por meio da pletismografia de cauda em ratos Wistar e SHR durante o tratamento de 30 dias com HgCl ₂ .	54
Tabela 3: Valores hemodinâmicos de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg, anestesiados com uretana.	55
Tabela 4: Valores hematológicos de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	57
Tabela 5: Perfil bioquímico de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	59
Tabela 6: Valores da atividade da enzima conversora de angiotensina dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	63
Tabela 7: Valores da concentração do malondialdeído de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Pressão arterial sistólica medida por meio da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Wistar Hg, Wistar CT, SHR Hg e SHR CT, durante 30 dias (1 vez por semana).	53
Figura 2: Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL}$ de plasma/min) plasmática dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	60
Figura 3: Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) no coração dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	61
Figura 4: Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) na artéria aorta dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	61
Figura 5: Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) no pulmão dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	62
Figura 6: Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) no cérebro dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, CT SHR e SHR Hg.	62
Figura 7: Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) no rim dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	63
Figura 8: Medida da produção de MDA plasmático (em mM) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	64
Figura 9: Medida da produção de MDA cardíaco (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	65
Figura 10: Medida da produção de MDA aórtico (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	65
Figura 11: Medida da produção de MDA pulmonar (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	66
Figura 12: Medida da produção de MDA cerebral (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.	66

Figura 13: Medida da produção de MDA renal (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg.

67

Figura 14: Imagens representativas da emissão de fluorescência nuclear produzida pela citotoxicidade de diferentes concentrações do HgCl_2 em células musculares lisas de aorta de ratos Wistar.

68

RESUMO

O mercúrio está naturalmente presente na crosta terrestre e é inevitável, algum grau de exposição dos seres vivos a ele. Tem sido investigada uma variedade de alterações induzidas pelo mercúrio sobre o sistema nervoso central, renal e a sua associação com o aumento de risco cardiovascular. Entretanto, seus efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular, em condições de normotensão e hipertensão, ainda não estão totalmente elucidados. Neste estudo, ratos Wistar e SHR (2,5 meses de idade) foram divididos em quatro grupos: controle Wistar (Wistar CT) e controle SHR (SHR CT) que receberam injeções intramusculares de salina por 30 dias ou mercúrio (Wistar Hg) e (SHR Hg), que receberam diariamente 0,07 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de HgCl_2 , sendo a primeira dose 4,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, alcançando uma concentração plasmática final de cerca de 29 ηM de mercúrio. Ao término do tratamento, foram realizadas: a avaliação ponderal, histológica, hematológica, o perfil bioquímico, as medidas dos parâmetros hemodinâmicos, a atividade da ECA e a produção de MDA de todos os animais. A exposição crônica ao HgCl_2 não alterou os parâmetros ponderais e histológicos quando comparados os grupos Wistar CT vs Wistar Hg e SHR CT vs SHR Hg. Na avaliação hematológica, os ratos Wistar Hg apresentaram aumento no conteúdo plaquetário (Wistar CT: 757 ± 55 vs Wistar Hg: $913 \pm 20 \cdot 10^3/\mu\text{L}$) e da porcentagem de neutrófilos (Wistar CT: 14 ± 5 vs Wistar Hg: $30 \pm 4,3 \%$) e o percentual de linfócitos diminuído (Wistar CT: $83 \pm 4,6$ vs Wistar Hg: $68 \pm 4,5 \%$), enquanto os ratos SHR Hg, apresentaram o percentual de neutrófilos diminuído (SHR CT: $45 \pm 5,9$ vs SHR Hg: $21,3 \pm 4,8 \%$) e o de linfócitos aumentado (SHR CT: $53 \pm 6,5$ vs SHR Hg: $76 \pm 4,3$). A glicemia do grupo Wistar Hg estava aumentada (Wistar CT: $161,6 \pm 12,3$ vs Wistar Hg: $209 \pm 15,4 \text{ mg/dL}$) e de globulina diminuída (Wistar CT: $3,21 \pm 0,09$ vs Wistar Hg: $2,84 \pm 0,1 \text{ g/dL}$). A pressão arterial sistólica, medida semanalmente por pletismografia de cauda, aumentou nos ratos Wistar na quarta semana de tratamento (Wistar CT: 117 ± 3 vs Wistar Hg: $143 \pm 5 \text{ mmHg}$). Foi observado também, aumento na pressão diastólica final do VE dos ratos Wistar Hg (Wistar CT: $0,25 \pm 0,4$ vs Wistar Hg: $3,3 \pm 0,5 \text{ mmHg}$). O tratamento com Hg aumentou a atividade da ECA no plasma (Wistar CT: $187,1 \pm 16,2$ vs Wistar Hg: $235,5 \pm 14,2 \eta\text{mol/mL/min}$) e no coração dos ratos normotensos (Wistar CT: $3,4 \pm 0,2$ vs Wistar Hg: $4,1 \pm 0,1 \eta\text{mol/mL/min/mg}$). Nos animais SHR Hg, a atividade da ECA estava aumentada no plasma (SHR CT: $113 \pm 11,4$ vs SHR Hg: $163 \pm 15,8$

$\eta\text{mol/mL/min}$) e diminuída nos rins (SHR CT: $80 \pm 6,3$ vs SHR Hg: $61,4 \pm 2,8$ $\eta\text{mol/mL/min/mg}$), pulmões (SHR CT: $87,6 \pm 2,2$ vs SHR Hg: 75 ± 4 $\eta\text{mol/mL/min/mg}$), coração (SHR CT: $17,9 \pm 1,1$ vs SHR Hg: $14,8 \pm 0,58$ $\eta\text{mol/mL/min/mg}$), cérebro (SHR CT: $40,3 \pm 2,3$ vs SHR Hg: $27,8 \pm 1,8$ $\eta\text{mol/mL/min/mg}$) e aorta (SHR CT: $670 \pm 16,3$ vs SHR Hg: $535 \pm 19,2$ $\eta\text{mol/mL/min/mg}$). A participação do estresse oxidativo foi avaliada de maneira indireta através da medida da produção de MDA, que se encontrou aumentada nos ratos Wistar Hg, tanto no plasma (Wistar CT: $0,93 \pm 0,06$ vs Wistar Hg: $1,28 \pm 0,18$ mM) quanto no coração (Wistar CT: $0,22 \pm 0,01$ vs Wistar Hg: $0,28 \pm 0,01$ mM) e diminuída nos rins (Wistar CT: $0,38 \pm 0,03$ vs Wistar Hg: $0,14 \pm 0,01$ mM). Nos ratos SHR Hg, esta produção estava aumentada no coração (SHR CT: $0,45 \pm 0,02$ vs SHR Hg: $0,55 \pm 0,02$ mM) e na aorta (SHR CT: $0,96 \pm 0,11$ vs SHR Hg: $1,51 \pm 0,14$ mM) e diminuída nos pulmões (SHR CT: $0,21 \pm 0,01$ vs SHR Hg: $0,12 \pm 0,01$ mM), rins (SHR CT: $0,96 \pm 0,03$ vs SHR Hg: $0,51 \pm 0,01$ mM) e cérebro (SHR CT: $0,54 \pm 0,03$ vs SHR Hg: $0,34 \pm 0,01$ mM). Estes resultados sugerem, que a exposição crônica ao mercúrio mesmo em baixíssima concentração, interfere na atividade da enzima conversora de angiotensina e na produção de radicais livres. Também altera os valores glicêmicos, plaquetários, imunológicos, da pressão arterial sistólica e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Os resultados isolados ou interligados, podem contribuir para o entendimento das várias patologias relacionadas à contaminação com o metal. Podemos concluir que esta exposição representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares nos animais normotensos (Wistar) e um fator agregante aos riscos pré-existentes nos animais hipertensos (SHR).

ABSTRACT

Mercury is naturally present in earth's crust and it is inevitable, some degree of exposure during the whole life. It has been demonstrated a variety of pathological actions of mercury on the central nervous system, renal system and its association with increased cardiovascular risk. However, its toxic effects on the cardiovascular system under conditions of normotension and hypertension are not yet fully elucidated. In this study, Wistar and SHR rats (2.5 months old) were divided into four groups: control Wistar (Wistar CT) and control SHR (SHR CT) who received intramuscular injections of saline for 30 days or mercury (Hg Wistar) and (SHR Hg), which received 0.07 mg/kg/day HgCl₂, the first dose was 4.6 mg/kg, reaching a final plasma concentration of about 29 nM of mercury. At the end of treatment the following aspects were performed: assessment of weight, histological, hematological and biochemical profiles, measurements of hemodynamic parameters, angiotensin converting enzyme (ACE) activity and the production of malondealdehyde (MDA) in the plasma of all animals. Chronic exposure to HgCl₂ did not affect the weight and histological parameters when comparing Wistar CT vs Wistar Hg rats neither SHR CT compared to SHR Hg rats. In the hematological evaluation, the Wistar Hg rats showed an increase in platelet content (Wistar CT: 757 ± 55 vs Wistar Hg: 913 ± 20 10³/μL) and neutrophils percentage (Wistar CT: 14 ± 5 vs Wistar Hg: 30 ± 4.3 %) and the percentage of lymphocytes decreased (Wistar CT: 83 ± 4.6 vs Wistar Hg: 68 ± 4.5 %), while in the SHR Hg, the percentage of neutrophils decreased (SHR CT: 45 ± 5.9 vs SHR Hg: 21.3 ± 4.8 %) and lymphocytes increased (SHR CT: 53 ± 6.5 vs SHR Hg: 76 ± 4.3 %). The glycemie values were increased in the Wistar Hg group (Wistar CT: 161.6 ± 12.3 vs Wistar Hg: 209 ± 15.4 mg/dL) meanwhile plasmatic globulin decreased (Wistar CT: 3.21 ± 0.09 vs Wistar Hg : 2.84 ± 0.1 g/dL). The systolic blood pressure, measured weekly by tail plethysmography, increased in rats in the fourth week of treatment (Wistar CT: 117 ± 3 vs Wistar Hg: 143 ± 5 mmHg). We also observed an increase in LV end-diastolic pressure of Wistar Hg rats (Wistar CT: 0.25 ± 0.4 vs Wistar Hg: 3.3 ± 0.5 mmHg). Treatment with Hg increased ACE activity in plasma (Wistar CT: 187.1 ± 16.2 vs Wistar Hg: 235.5 ± 14.2 nMol/mL/min) and hearts of normotensive rats (Wistar CT: 3.4 ± 0.2 vs Wistar Hg: 4.1 ± 0.1 nMol/mL/min/mg). In SHR Hg, ACE activity was increased in plasma (SHR CT: 113 ± 11.4 vs SHR Hg: 163 ± 15.8 nMol/mL/min) and decreased in kidney (SHR CT: 80 ±

6.3 vs SHR Hg: 61.4 ± 2.8 η mol/mL/min/mg), lung (SHR CT: 87.6 ± 2.2 vs SHR Hg: 75 ± 4 η mol/mL/min/mg), heart (SHR CT: 17.9 ± 1.1 vs SHR Hg: 14.8 ± 0.58 η mol/mL/min/mg), brain (SHR CT: 40.3 ± 2.3 vs SHR Hg: 27.8 ± 1.8 η mol/mL/min/mg) and aorta (SHR CT: 670 ± 16.3 vs SHR Hg: 535 ± 19.2 η mol/mL/min/mg). The involvement of oxidative stress was assessed indirectly by measuring the production of MDA, which was found increased in the Wistar Hg rats in both plasma (Wistar CT: 0.93 ± 0.06 vs Wistar Hg: 1.28 ± 0.18 mM) and in heart (Wistar CT: 0.22 ± 0.01 vs Wistar Hg: 0.28 ± 0.01 mM) and decreased in the kidney (Wistar CT: 0.38 ± 0.03 vs Wistar Hg: 0.14 ± 0.01 mM). In SHR Hg rats, this production was increased in heart (SHR CT: 0.45 ± 0.02 vs SHR Hg: 0.55 ± 0.02 mM) and aorta (SHR CT: 0.96 ± 0.11 vs SHR Hg: 1.51 ± 0.14 mM) and decreased in the lungs (SHR CT: 0.21 ± 0.01 vs SHR Hg: 0.12 ± 0.01 mM), kidney (SHR CT: 0.96 ± 0.03 vs SHR Hg: 0.51 ± 0.01 mM) and brain (SHR CT: 0.54 ± 0.03 vs SHR Hg: 0.34 ± 0.01 mM). These results suggest that chronic exposure to mercury even at very low concentrations interferes with the activity of angiotensin converting enzyme and production of free radicals. Also it alters the levels of the blood glucose, platelet, immune, systolic blood pressure, and left ventricular end diastolic pressure. The results isolated or interconnected, can contribute to the understanding of various diseases related to contamination with metal. It can be conclude that such exposure represents a risk factor for developing of cardiovascular disease in normotensive animals (Wistar) and it may represents a aggregating factor of pre-existing risks to hypertensive rats (SHR).

INTRODUÇÃO

I INTRODUÇÃO

1 Metais pesados

Os metais estão entre os tóxicos mais antigos conhecidos pelo homem. Os primeiros humanos usavam venenos extraídos de animais e plantas para caçar, guerrear e assassinar. Datado de 1500 a.C., o papiro de Ebers referencia muitos agentes tóxicos reconhecidos como a cicuta, o ópio e metais pesados. Na atualidade, os cientistas investigam a toxicidade dos agentes químicos sobre os sistemas biológicos, estudando os mecanismos de ação destes agentes e suas relações com causas de doença, fenômenos fisiológicos, exposição profissional, saúde pública, ambiente, alimentos, medicamentos, fármacos, pesticidas, normas e regulamentos, fauna, flora, crescimento e diferenciação celular, alteração do genoma, antídotos e agressões por xenobióticos (Klaassen e Watkins III, 2001).

No mundo industrializado, as fontes de exposição aos metais pesados estão onipresentes no campo laboral, na água, alimentos e ambientes contaminados. O grau de toxicidade gerado pela exposição, está caracterizado pelo elemento metálico em questão, mas é alterado pelo tipo de composto (orgânico ou inorgânico) e suas características de hidro ou lipossolubilidade, que determinam sua toxicidade cinética e portanto sua possibilidade de alcançar determinados alvos. As biomoléculas mais afetadas pelos metais são as proteínas enzimáticas que participam de diversos processos bioquímicos, membranas celulares, sistemas e órgãos (gastrointestinal, neurológico, cardiovascular, hemático e renal) (Ferrer, 2003). Os metais pesados que naturalmente não podem ser metabolizados, permanecem no organismo e nele exercem seus efeitos tóxicos, combinando-se com um ou mais grupos reativos essenciais para as funções fisiológicas normais (Klaassen, 1991), entretanto, podem ser inativados e eliminados mediante a administração de substâncias quelantes, que conjugadas a eles produzem moléculas complexas, atóxicas e excretáveis (Ferrer, 2003).

Oriundos de fontes naturais ou antropogênicas, os metais pesados continuamente entram no ecossistema aquático e constituem séria ameaça por sua toxicidade, longa persistência, bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar (Papagiannis *et al.*, 2004). Outra fonte de exposição é a atmosfera potencialmente contaminada. O chumbo, o cádmio e o mercúrio estão entre os elementos

associados com a incineração de resíduos sólidos e emissão de fumaça tóxica (Cleverly *et al.*, 1989; Llobet *et al.*, 2003; Carmen-Agramunt *et al.*, 2003).

A maioria das exposições humana aos metais pesados ocorre como consequência de atividades do homem (McKelvey *et al.*, 2007), como a extração de ouro, fabricação de aparelhos eletrônicos, produção de desinfetantes, diuréticos, inseticidas (de Oliveira e Silva, 1996), lâmpadas de vapor de mercúrio (Micaroni *et al.*, 2000), crematórios (Mari e Domingo, 2010) e prática odontológica, com o mercúrio sendo inalado na forma de vapor e liberado principalmente na mastigação pelas restaurações de amálgamas (Clarkson, 2002b).

Os metais pesados podem produzir patologia aguda ou crônica. A toxicidade aguda é pouco frequente e geralmente está associada aos vapores que são inalados no ambiente de trabalho. As intoxicações subagudas ou crônicas, normalmente procedem de fontes alimentares, ambientais e as de origem laboral (Ferrer, 2003).

Entre os metais pesados, o mercúrio é considerado o mais perigoso e o que melhor ilustra a diversidade dos seus efeitos causados pelas diferentes espécies químicas (Salonen *et al.*, 1995; Klaassen e Watkins III, 2001).

2 Mercúrio

2.1 Características gerais

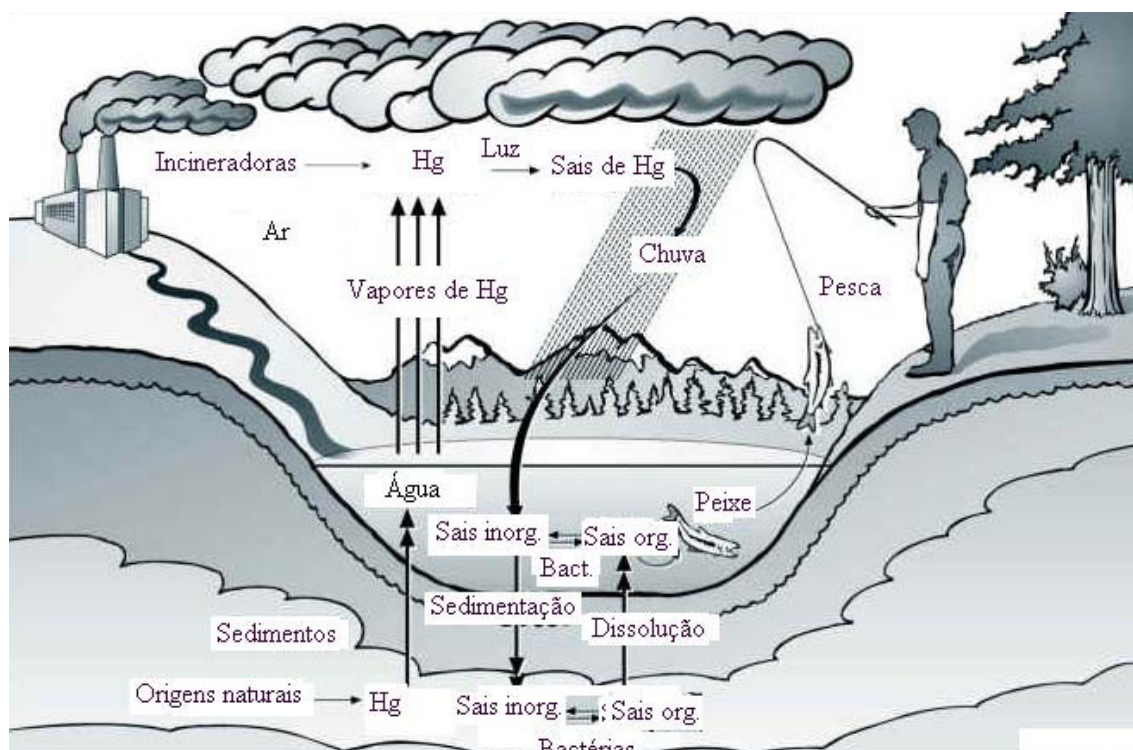
O mercúrio é um metal líquido à temperatura ambiente, conhecido desde os tempos da Grécia antiga. Seu nome homenageia o deus romano Mercúrio, que era o mensageiro dos deuses. Essa homenagem é devida à fluidez do metal. O símbolo Hg vem do latim "*hydrargyrum*" cujo significado é prata líquida (de Azevedo, 2003).

Suas propriedades físicas de baixa viscosidade, alta densidade, excelente condutância elétrica e superfície refletora, são razões que explicam seu grande número de aplicações (Clarkson e Magos, 2006). Ele existe como composto inorgânico e orgânico. Na forma inorgânica pode ser encontrado sob três diferentes estados de oxidação: o Hg elementar (Hg^0), o qual se encontra na forma líquida e de gás e as formas oxidadas: íon mercurioso (Hg_2^{+2} / Hg^{+1}), forma pouco estável e bastante rara em sistemas naturais e o íon mercúrico (Hg^{+2}). Estas diferentes formas de mercúrio, podem sofrer alterações e originar a forma orgânica, quando o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico (carbono),

sendo o metilmercúrio (CH_3Hg^+) (Micaroni *et al.*, 2000) e o etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$) (Houston, 2007) os mais comuns.

2.2 Ciclo do mercúrio no meio ambiente

O ciclo biogeoquímico do mercúrio é caracterizado pelas várias rotas que este metal pode seguir no ambiente. Dentre elas, destaca-se sua liberação do solo e da água para atmosfera, seu transporte nesta, seguido da deposição atmosférica das espécies de mercúrio para a água e solo. Quando em contato com o solo ou sedimento, pode ocorrer sorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/desmetilação. O ciclo é completado pelas rotas de precipitação, bioconversão em formas voláteis ou solúveis, reinteração deste na atmosfera ou bioacumulação na cadeia alimentar aquática ou terrestre (Bisnote e Jardim, 2004).



http://people.uwec.edu/piercech/Hg/mercury_water/cycling.htm

2.3 Catástrofes ambientais

O primeiro desastre ambiental de repercussão mundial que expôs o risco eminente do mercúrio, ocorreu por volta de 1953 na baía de Minamata, sudoeste do Japão (Jardim, 1998). O metilmercúrio que era despejado pela Chisso Corporation no efluente contaminou a biota marinha e águas de sua vizinhança, chegando até a população através da ingestão de peixes e frutos do mar. A "Doença de Minamata" foi oficialmente descoberta em 1956 e atingiu níveis epidêmicos. Desde 1953 fatos até então inexplicáveis estavam sendo observados próximo à baía de Minamata: um número de pessoas passou a sofrer entorpecimento de seus dedos, lábios e língua; mortes de peixes e mariscos, mortes de pássaros e gatos por desordens nervosas. A mortalidade foi de cerca de 20% e os sobreviventes ficaram permanentemente incapacitados. As estimativas apontam que a Chisso descartou na baía algo em torno de 200 a 600 toneladas de metilmercúrio em seu efluente (Canela, 1995; Jardim, 1998). Até 1997, o número de vítimas fatais já havia chegado a 887, sendo que mais 2209 casos da chamada "Doença de Minamata" haviam sido registrados. Somente em setembro de 1997, mais de 40 anos após a descoberta oficial do problema, foram retiradas as redes que dividiam a baía em uma área de peixes contaminados (concentração de mercúrio maior que $0,04 \text{ mg.Kg}^{-1}$) e uma outra livre do metal (Lacerda, 1997).

Outros acidentes no Irã, Iraque, Paquistão e Guatemala, causados pelo uso de metilmercúrio como fungicida para tratamento de sementes de grãos, permitem confirmar o problema do uso intensivo do mercúrio (Bakir *et al.*, 1973; Canela, 1995). No Brasil, Branches *et al.*, 1993, em seus estudos com seres humanos expostos ao mercúrio na região Norte, observaram vários sintomas como vertigens, dores de cabeça, palpitações e tremores.

Um outro acidente com bastante repercussão nos meios científicos ocorreu com Karen E. Wetterhahn, uma renomada pesquisadora do Dartmouth College (USA) que trabalhava com o impacto de metais tóxicos em organismos vivos e morreu em junho de 1997 vítima de intoxicação com dimetilmercúrio. Os sintomas iniciais de contaminação foram dificuldades de equilíbrio, fala, visão e audição, os quais progrediram rapidamente ao coma e à morte (Gochfeld, 2003).

Todavia, a toxicidade do mercúrio varia nos seus diferentes compostos. A forma orgânica é extremamente tóxica, não apenas para o ser humano, mas para

toda a biota. Devido ao radical orgânico, esta espécie pode entrar rapidamente na corrente sanguínea, causando danos irreparáveis ao sistema nervoso central (Canela, 1995).

O metilmercúrio, por exemplo, pode ligar-se aos grupos sulfidrilas existentes nas proteínas dos seres humanos. Uma vez no organismo, ele rapidamente se converte em um complexo protéico, mantendo grande mobilidade através dos tecidos animais. A lipossolubilidade dos compostos organomercuriais também facilita a sua passagem através dos tecidos. Estes compostos também podem ser absorvidos pela pele e aproximadamente 100% (comparado com menos de 10% para compostos inorgânicos) pelo trato gastrointestinal (WHO, 1989 e Krishnamurthy, 1992). No Brasil, estudos sobre a contaminação de mercúrio em peixes da Amazônia mostram que o metilmercúrio corresponde a 90% da concentração total de Hg analisado e a dieta da maioria da população indígena e ribeirinha é constituída de peixe, aumentando assim a exposição destas populações às fontes de contaminação de mercúrio (Canela, 1995) que apresentam concentrações até 5 vezes as máximas permitidas em peixes para consumo humano (Lacerda, 1997).

Já o mercúrio metálico, por exemplo, é empregado na fabricação de amálgamas para o uso odontológico (Jardim *et al.*, 1993; Canela, 1995). A ingestão do mercúrio metálico líquido parece não ser tóxico por si só. Os prejuízos causados na saúde se devem ao seu potencial em liberar vapor de mercúrio, que pode ser inalado (Clarkson e Magos, 2006).

Assim também é a forma de exposição na maior parte em garimpos de ouro, onde o vapor de mercúrio é absorvido pelo organismo humano através do pulmão pelas membranas aveolares a uma proporção de 75% a 80%, quando inalado. No sangue, o mercúrio é oxidado pelos eritrócitos e uma vez oxidado, o íon Hg^{+2} é rapidamente distribuído pelo corpo através do sangue, podendo se ligar também à albumina e à hemoglobina (Canela, 1995).

2.4 Mecanismos de toxicidade do mercúrio

A toxicidade do mercúrio está diretamente relacionada com a sua ligação covalente aos grupos tiol das diferentes enzimas celulares nos microsomas e na mitocôndria, o que leva à interrupção do metabolismo e da função celular. Como as

proteínas que têm grupos tiol existem tanto nas membranas extracelulares, como nas intracelulares e ainda nas organelas e estes grupos representam uma parte integral na estrutura ou função da maioria das proteínas, o alvo exato para o mercúrio não está claramente determinado (Clarkson e Magos, 2006; Stohs e Bagchi, 1995).

O mercúrio também se liga a outros grupos químicos, embora com uma menor afinidade, como o fosforil (PH_3), carboxil (COOH), amina (R-NH_2 , amina primária) e amida (R-CO) NH_2 (Cunha, 2008).

Entre os possíveis mecanismos de toxicidade podemos enumerar a inativação de enzimas, proteínas estruturais e processos de transporte ou alteração da permeabilidade da membrana celular (Stohs e Bagchi, 1995).

Tem sido investigado uma variedade de alterações induzidas pelo mercúrio, incluindo o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, alterações no material genético celular, alterações na transmissão sináptica, rompimento da membrana, desregulação do sistema imunitário e mudança na homeostase do cálcio (Frenkel *et al.*, 1986; Pollard e Hultman, 1997; Zheng *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2009). Estas alterações podem ocorrer individualmente ou em conjunto. O mercúrio é capaz de reduzir os níveis enzimáticos de superóxido dismutase, catalase, glutatona, glutatona redutase e glutatona peroxidase, o que confere uma menor proteção celular em relação ao estresse oxidativo (Ribarov e Benov, 1981; Benov *et al.*, 1990). Além disso, ele é capaz de induzir a peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e mudanças no metabolismo do grupo heme (Zalups e Lash, 1994; Mahboob *et al.*, 2001; Carranza-Rosales *et al.*, 2005; Virtanen *et al.*, 2007; Cunha, 2008).

Seus efeitos incluem também a despolarização da membrana interna mitocondrial, com conseqüente aumento na formação de H_2O_2 (Cunha, 2008). Estes acontecimentos estão ligados à depleção de glutatona mediada pelo Hg^{+2} e com a oxidação da NADPH, o que leva a uma condição de estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da susceptibilidade da membrana mitocondrial à peroxidação lipídica, dependente do ferro (Lund *et al.*, 1991 e 1993). Sabe-se que as alterações provocadas pelo mercúrio na homeostase mitocondrial do cálcio podem exacerbar o estresse oxidativo nas células renais (Lund *et al.*, 1993).

A quebra da homeostasia intracelular do cálcio e o estado alterados dos tióis intracelulares promovidos pelo mercúrio, resultam em uma interação sinérgica que

culmina na produção de peroxidação lipídica (estresse oxidativo) e caracteriza a citotoxicidade do metal nos órgãos.

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados. Todos os organismos vivos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, existindo um equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida de moléculas. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídeos e o DNA. Os radicais livres possuem existência independente e contém um ou mais elétrons não-emparelhados, como por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e óxido nítrico ($\cdot NO$). Existem também, as espécies reativas do oxigênio não-radicaís (sem elétrons emparelhados), originadas do metabolismo do oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto ($^1\Delta g$), ácido hipocloroso ($HOCl$) e ozônio (O_3). Outros radicais livres incluem radicais sulfúricos centrais e os radicais com carbono central.

Um radical pode doar ou remover um elétron ou simplesmente adicionar-se a um não-radical, caracterizando uma reação em cadeia como a peroxidação de lipídeos ou lesão do DNA. Um radical pode reagir com outro radical combinando seus elétrons desemparelhados e formar uma ligação covalente. Dois radicais podem, no entanto, desaparecer ou mesmo causar muito mais espécies danosas, como por exemplo, a formação do peroxinitrito que oxida diretamente uma grande variedade de substratos orgânicos, incluindo lipídeos, proteínas e grupos não-protéicos SH, ferro, enxofre e zinco. (Halliwell e Gutteridge, 1989; Pôrto, 1996; Radunovic *et al.*, 1997).

O potencial dos radicais livres de causar danos não é devido somente às suas ações diretas, mas também às subseqüentes formações de mais substâncias reativas. A formação de $\cdot OH$ é altamente dependente da ação de metais de transição como o Hg. O mercúrio têm fraca ligação atômica e pode influenciar mudanças no estado de oxidação dos substratos. Vários metais de transição podem reagir diretamente com H_2O_2 para formar $\cdot OH$. A quebra de H_2O_2 por ação de íon ferroso é conhecida como reação de Fenton.

A peroxidação lipídica é uma modificação dos ácidos graxos poliinsaturados constituintes de membranas celulares, por oxidação não-enzimática (PUFA). Entre

as espécies reativas envolvidas na peroxidação, encontram-se OH , $\text{NO}_2\cdot$ e $\text{Cl}^3\text{O}_2\cdot$, com capacidade de subtrair hidrogênio das cadeias de PUFA para formar espécies reativas lipídicas ou radical lipídico ($\text{L}\cdot$), que se combinam com oxigênio, produzindo radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$). Este, se combina ao hidrogênio de cadeias adjacentes de PUFA, formando peróxidos lipídicos (LOOH) e novos radicais lipídicos, além de perpetuar a reação oxidativa.

Em geral, lesão a lipídeos e proteínas de membrana celular resultam em uma diminuição de fluidez membranal, inativação de enzimas como Na^+K^+ -ATPase, intensificação da perda de potencial de membrana e homeostase iônica. Cálcio livre intracelular aumentado é mediador da estimulação de fosfolipase A2 e a subsequente liberação de ácido araquidônico, leva à intensa geração de radicais livres. Despolarização aumenta o consumo de ATP pela Na^+K^+ -ATPase, o qual aumenta a fosforilação oxidativa e intensifica a produção de ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) (Pôrto, 2001).

O estresse oxidativo tem sido associado à diversos eventos patológicos, dentre eles, câncer, doença renal, de Alzheimer, esquizofrenia, esclerose lateral amiotrófica, Parkinson, Huntington e outras doenças degenerativas. Mais recentemente, as ROS foram descritas em várias doenças cardiovasculares importantes.

A exposição à baixas concentrações de mercúrio promove aumento do estresse oxidativo com a participação da ECA e conseqüentemente, da angiotensina II (AII) (Wiggers *et al.*, 2008a e 2008b). A AII é capaz de gerar ROS pela ativação dos receptores AT-1 e favorecer o aparecimento de disfunção endotelial, remodelamento vascular, retenção de sódio, hipertensão, aterosclerose, estenoses pós-angioplastias, infarto e insuficiência cardíaca (Pôrto, 2001; Griendling e FritzGerald, 2003; Welch, 2008; Lakshmi *et al.*, 2009).

2.5 Mercúrio e os seres vivos

O mercúrio está naturalmente presente na crosta terrestre e é inevitável, algum grau de exposição dos seres vivos a ele (Brodkin *et al.*, 2007).

2.5.1 Legislação

No Brasil, os valores admissíveis para a presença do mercúrio no ambiente e nos organismos vivos são estabelecidos por normas com limites de tolerância biológica (Grigoletto *et al.*, 2008). A legislação brasileira, seguindo as normas regulamentadoras (NRs) do Ministério do Trabalho, da Organização Mundial de Saúde e da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 10004, 2004), estabelece como limite de tolerância biológica para o ser humano, a taxa de 33 ug/Hg/g de creatinina urinária e 0,04 mg/Hg/m³ no ambiente de trabalho.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) recomenda valor de referência de mercúrio no sangue, onde à exposição é considerada sem efeito adverso, de 5,8 ng/ml (~21,6 nM) (NRC, 2000a; Rice, 2004; Stern, 2005).

A Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doença dos Estados Unidos (ATSDR), a *Food and Drug Administration* (FDA), a EPA e a Organização Mundial de Saúde (WHO) têm desenvolvido recomendações para o limite de exposição ao MeHg na dieta. Este, varia de 0,1 µg/Kg/dia (EPA) a 0,47 µg/Kg/dia (WHO). Para o pescado, tem sido apontado limites variando entre 0,4 mg/Hg/Kg a 1,0 mg/Hg/Kg. O Brasil fixou em 0,5 mg/Kg para peixes não-predadores e 1,0 mg/Kg para peixes predadores (Lei 685, 1998). Para as vacinas, as concentrações de EtHg variam de 12,5 µg/Hg a 25 µg/Hg para cada dose de 0,5 mL de vacina. Porém, segundo a EPA o ideal seria que não ultrapassasse a concentração de 0,1 µg/Kg/dia (Davidson *et al.*, 2004).

Em relação às consequências toxicológicas da exposição ao Hg⁰ em indivíduos que possuem restaurações de amálgama, ainda não é conclusiva quanto ao nível seguro. O nível máximo de exposição ocupacional permitido nos Estados Unidos é de 50 mg/m³. Em indivíduos com restauração de amálgama, a concentração de mercúrio inorgânico no sangue é de cerca de 4,3 µg/L (~16 nM) (Vamnes *et al.*, 2000) e de 2,55 µg/L de mercúrio total em indivíduos com cerca de 19,9 superfícies de amálgama (Kingman *et al.*, 1998). A EPA estima que cada amálgama libere de 3 µg a 17 µg de vapor de mercúrio por dia. Já a concentração no sangue, relatada em populações não expostas é de aproximadamente 3 µg/L (~11 nM) (WHO, 1990). A *American Dental Association* (ADA, 2003) afirma que é aceitável o uso deste material, porém a *British Dental Health Foundation* (2003), recomenda evitá-lo. A Suécia preconiza evitá-lo em mulheres grávidas,

amamentando e doentes renais (Skerfving, 1974; Vimy e Lorscheider, 1985; Oskarsson *et al.*, 1996; Vimy *et al.*, 1990; Bjorkman *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2006).

2.5.2 Biomarcadores

Um importante aspecto para a saúde pública é a avaliação da exposição aos agentes químicos, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar a incidência de mortes e doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano. Considerando os limites preconizados como seguros, se estabelece normas ambientais para um contaminante químico presente num meio.

O uso dos biomarcadores na avaliação de risco fornece uma ligação entre a exposição à substância química, dose interna e prejuízo à saúde.

Em se tratando da exposição ao mercúrio, vários são os biomarcadores e dentre eles o cabelo, os eritrócitos, os ácidos graxos polinsaturados e os dentes. Para avaliar o MeHg e mercúrio inorgânico, o cabelo é um dos biomarcadores mais utilizados (Phelps *et al.*, 1980; WHO, 1990; Grandjean *et al.*, 1997; NRC 2000b; Yasutake *et al.*, 2003; Yasutake *et al.*, 2004; Nakai *et al.*, 2004). A concentração de mercúrio em eritrócitos (Ery-Hg) é um forte indicador da concentração do MeHg, sendo um índice muito usado nas populações com alto consumo de peixes (Svensson *et al.*, 1992). Pesquisas mostram uma associação inversa entre biomarcadores de consumo de peixes como Ery-Hg e o ácido decosahexaenoico (ácidos graxos poliinsaturados) e o risco do primeiro infarto do miocárdio (Halgren *et al.*, 2001). Alguns autores também sugerem a dentição decídua para ser usada como biomarcador da exposição crônica ao mercúrio, assim como um indicador do conteúdo de mercúrio no cérebro e nos rins (Eide e Wesenberg, 1993).

2.5.3 Mercúrio orgânico

Alimentos como os pescados são a fonte mais comum de exposição humana ao metilmercúrio (MeHg). Relatos na literatura sobre envenenamento com MeHg, abordam consequências como morte e alterações no sistema nervoso central que incluem retardo mental, paralisia cerebral, surdez, cegueira, disartria (especialmente em crianças expostas durante a vida uterina), parestesia, ataxia e destruição

neuronal (Inskip e Piotrowisk, 1985; Clarkson e Magos, 2006; Guzzi e La Porta, 2008).

O MeHg é capaz de atravessar a barreira placentária e hemato-encefálica (Cernichiari *et al.*, 1995) e é vagorosamente metabolizado a mercúrio inorgânico principalmente no intestino. A maior parte do MeHg é eliminada do corpo pela demetilação e excreção da forma inorgânica pelas fezes (Guzzi e La Porta, 2008).

O etilmercúrio (EtHg) é um mercúrio orgânico e na forma de timerosal tem sido usado como antisséptico tópico local, protetores líquidos de lentes oftálmicas e como conservante em vacinas (Prado *et al.*, 2004; Guzzi e La Porta, 2008). Durante vários anos, ele foi utilizado como agente bacteriostático e fungistático tópico, sendo apresentado na forma de tintura (solução hidroalcoólica 0,1%), geralmente indicado para antisepsia de pequenas escoriações e ferimentos (MS Ceme, 1989; Valle *et al.*, 1991; PR Vade-Mécum Odontológico, 1997).

Segundo Ball *et al.*, 2001, uma dose normal de vacina pediátrica, contém entre 12,5 - 25 µg de Hg por 0,5 mL e ainda assim, alguns relatos de reação local de hipersensibilidade têm sido observados. Em 1999, foi requerido um projeto aos fabricantes para a retirada do timerosal das vacinas e isso vem acontecendo em muitas das vacinas fabricadas nos Estados Unidos e na Europa, porém o uso do EtHg ainda é muito comum nos países em desenvolvimento (Guzzi e La Porta, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) proibiu o uso deste composto no Brasil, 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 Organização Mundial de Saúde (Prado *et al.*, 2004). E é este o caso da vacina H1N1 contra a popularmente conhecida gripe suína. O *Washington State Department of Health* declarou em setembro de 2009, que cerca de 15% das vacinas H1N1 ali utilizadas eram livres de mercúrio, porém esta porcentagem era insuficiente para atender a demanda populacional, logo, 85% das vacinas americanas ali utilizadas para a gripe continham valores iguais ou inferiores a 1 µg de EtHg/ 0,5 mL de dose; valores estes, referência do máximo permitido à gestantes e crianças menores de três anos, segundo as leis vigentes.

Os sinais e sintomas neurológicos provocados por doses tóxicas de EtHg são semelhantes aos observados com o MeHg, porém, declarações da Organização Mundial de Saúde, *The American Academy of Pediatrics* e o *US Public Health Service* em 1999, afirmam que é aceitável o uso do timerosal nas vacinas (Clarkson *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2004). Entretanto, as alegações feitas sobre a possibilidade do timerosal em vacinas causar autismo e doenças co-relatas persistem e estudos pró e contra esta teoria continuam sendo realizados (Clarkson *et al.*, 2003; Dufault *et al.*, 2009; Hunter *et al.*, 2010; Kempuraj *et al.*, 2010; Landrigan, 2010).

2.5.4 Mercúrio inorgânico

O mercúrio elementar (Hg^0) ocorre na natureza de forma líquida em temperatura ambiente e rapidamente se transforma em vapor quando aquecido. Suas fontes naturais incluem a liberação de gases de mercúrio oriundas das erupções vulcânicas e erosões minerais. Exposições humanas ao Hg^0 incluem emissão industrial de combustíveis fósseis, medicamentos tópicos, purgantes, amálgama dentário, termômetros, esfigmomanômetros, barômetros, lâmpadas incandescentes, baterias, incinerações e práticas rituais com substâncias baseadas em mercúrio (Guzzi e La Porta, 2008).

O Hg^0 é mais perigoso para o homem no estado de vapor ou poeira (Ratcliffe *et al.*, 1996; Malm, 1998; Sweet e Zelikoff, 2001), porém, o mais comum é a oxidação para Hg^{+2} no organismo humano e pela reação com oxidantes atmosféricos como oxigênio, ozônio e cloro (Fitzgerald, 1995; Guzzi e La Porta, 2008).

A exposição tóxica ao mercúrio elementar, crônica ou aguda, ocupacional ou residencial, pode levar a sintomas como tosse, dispnéia, febre, tremores, polineuropatias, gengivites, alucinações e eritismo mercurial, uma síndrome que inclui excitabilidade, perda da memória, insônia, e desordens neuro-cognitivas (Vroom e Greer, 1975; WHO, 1991). O vapor de Hg^0 inalado se dissolve no plasma, do qual rapidamente se distribui para todos os tecidos do corpo. Dentro das células, ele é oxidado a Hg^{+2} e acumulado no cérebro, fígado e rim (Guzzi e La Porta, 2008).

Muitos estudos demonstram que restaurações de amálgama liberam vapor de mercúrio na cavidade oral durante procedimentos odontológicos e a mastigação (Molin *et al.*, 1990; Raap *et al.*, 2009; Lorscheider *et al.*, 1995; Clarkson e Magos,

2006) e este vapor seguiria para os pulmões desencadeando seus efeitos tóxicos. Porém, vários pesquisadores vêm negando a relação entre amálgama dental e prejuízos à saúde (Weidenhammer *et al.*, 2009; Erler *et al.*, 2009; Mackert, 2010).

O mercúrio inorgânico iônico (Hg^{+1} e Hg^{+2}) e seus sais, são também uma importante fonte de intoxicação humana por meio de produtos como medicamentos, sabões germicidas, cremes para a pele, antisépticos (Goldman e Shannon, 2001; Clarkson e Magos, 2006) e através de sua disponibilidade pela oxidação do mercúrio elementar e do mercúrio orgânico em mercúrio inorgânico (Clarkson e Magos, 2006).

Uma vez dentro do organismo, o Hg_2^{+2} se dissocia e libera Hg^0 e Hg^{+2} . Clarkson e Magos em 2006, citando Hand *et al.*, 1943, relataram a presença de ambas as formas dissociadas em tecidos animais tratados com HgCl_2 .

A exposição aos sais de mercúrio inorgânico pode induzir a diferentes efeitos tóxicos nos mais diversos órgãos, inibindo enzimas, rompendo membranas celulares, danificando estruturas protéicas e afetando o código genético dos ácidos nucléicos (Clarkson, 1987).

2.5.4.1 No cérebro

Está bem descrito na literatura que o Hg^{+2} é capaz de induzir alterações estruturais e funcionais no cérebro (Gajkowska *et al.*, 1992; Albrecht *et al.*, 1994; Huang e Narahashi, 1996) ainda que, com nenhuma (Albrecht *et al.*, 1994) ou pouca permeabilidade à barreira hematoencefálica (Szumańska *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 1994b; Clarkson e Magos, 2006). Acredita-se que o mercúrio atravesse a barreira na forma orgânica ou de mercúrio elementar e no cérebro ocorra a conversão para a forma iônica inorgânica (Huang e Narahashi, 1996; Pedersen *et al.*, 1999; Guzzi e La Porta, 2008). Outra hipótese, é o acesso do Hg^{+2} ao cérebro através da modulação de enzimas transportadoras da barreira hematoencefálica (Szumańska *et al.*, 1993; Albrecht *et al.*, 1994).

Pesquisas feitas com ratos, revelaram que o HgCl_2 atua no cérebro aumentando os níveis extracelulares de dopamina (Faro *et al.*, 2007), alterando a homeostase de cálcio e o equilíbrio oxidante/anti-oxidante (Gassó *et al.*, 2001), além de diminuir a atividade da acetilcolinesterase e aumentar o estresse oxidativo (El-Demerdash, 2001). Em ratos neo-natos, o crescimento cerebral e o desenvolvimento neuronal também foram afetados (Bartolome *et al.*, 1984). Em cultivos de células

nervosas, o Hg^{+2} mostrou ser capaz de induzir morte celular (Lee *et al.*, 2002). Os sais de mercúrio podem induzir no homem, fadiga, insônia, parestesia e fotofobia (Dyall-Smith e Scurry, 1990; Weldon *et al.*, 2000), no entanto, existe uma discussão a respeito da relação entre Mal de Alzheimer e Doença de Parkinson com o mercúrio. Pesquisadores como Reinhardt, 1992 e Mutter *et al.*, 2007, preconizam a forte associação do mercúrio com estas doenças, enquanto outros como Carpenter, 2001, Dantzig, 2006 e Gerhardsson *et al.*, 2008, negam esta co-relação.

2.5.4.2 Nos pulmões

Os efeitos tóxicos do mercúrio inorgânico também se manifestam nos pulmões. Em ratos submetidos aos vapores de mercúrio (30 mg/m^3) por 2 horas, foi constatada a presença de alterações histológicas como edema alveolar, formação de membrana hialina, fibrose e uma diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase pulmonar (Livardjani *et al.*, 1991). Ratos expostos ao vapor de mercúrio (6 mg/cu.m) entre 2 horas e 4 horas apresentaram angústia respiratória aguda e morte. Exames microscópicos do pulmão, revelaram edema rico em fibrina, necrose epitelial, presença de membrana hialina e fibrose intersticial (Jaeger *et al.*, 1983). Cabras expostas ao $HgCl_2$ ($100 \text{ } \mu\text{g/mL}$) em água de beber, por 90 dias, apresentaram pneumonia exsudativa ao final do tratamento (Pathak e Bhowmik, 1998). Em humanos, a exposição aguda ao vapor de mercúrio pode levar a bronqueolite química, pneumonia e alterações pulmonares como formação de membrana hialina e extensa fibrose pulmonar (Asano *et al.*, 2000). Também são relatadas pneumonia, falência respiratória e morte mediante intoxicação aguda com Hg^0 (Rowens *et al.*, 1991). Relatos de aplicação tópica de $HgBr_2$ em grandes quantidades levando a pessoa a morte são descritos por Triunfante *et al.*, 2009, enquanto a intoxicação crônica ao vapor de mercúrio, principal forma de exposição dos cirurgiões-destista, pode levar entre outros sintomas, à dificuldade respiratória e fadiga (Grigoletto *et al.*, 2008).

2.5.4.3 Nos rins

Quando o mercúrio inorgânico é absorvido, os rins são os primeiros alvos de acumulação e expressão de toxicidade (Carranza-Rosales *et al.*, 2005). O mercúrio

inorgânico é um potente e específico agente nefrotóxico *in vivo* e o seu conteúdo intrarenal está relacionado com a severidade das nefropatias mercuro-induzidas (Lash *et al.*, 1998). Ele se acumula nas células epiteliais dos túbulos proximais e se liga aos radicais intracelulares sulfidril, carboxil e fosforil (Goyer, 1996). Os resultados destas interações são inativação enzimática, inibição de síntese protéica (Bohets *et al.*, 1995), inibição da duplicação celular, diminuição de uridina e timidina, fragmentação do DNA e morte celular (Nakazawa *et al.*, 1975). O mercúrio inorgânico altera o conteúdo intracelular dos tióis e desta maneira, induz estresse oxidativo, peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e mudanças no metabolismo do grupo heme (Zalups e Lash, 1994). Pesquisas vêm sendo relacionadas à mudanças renais ultraestruturais, morfológicas (Pfaller *et al.*, 1990; Bizarro *et al.*, 2003) e também apoptoses em diferentes modelos de estudo (Goering *et al.*, 1999; Issa *et al.*, 2003; Kim e Sharma, 2004). O HgCl₂ diminui os níveis intracelulares de glutatona e conseqüentemente ativa caspases que induzem apoptose (Shenker *et al.*, 2000). A exposição aguda pode levar a insuficiência renal em ratos, após 1 hora de exposição, caracterizada por alterações funcionais no fluxo plasmático renal, da taxa de filtração glomerular e de lesões nos túbulos proximais associadas ao aumento da peroxidação lipídica e estresse oxidativo (Girardi *et al.*, 1989; Girardi e Elías, 1991 e 1995).

Pesquisas apontam a relação exposição-resposta entre mercúrio e o risco de mortalidade por doença renal. Períodos de latência entre nefrotoxicidade e evidência clínica de doença não está bem caracterizado, mas é certo que o dano renal após baixos níveis de exposição à substâncias nefrotóxicas desencadeiam inicialmente sutis mudanças que são compensadas por uma significativa perda da função renal (Zalups e Lash, 1994; Remuzzi e Bertani, 1998; Clarkson, 2002a).

2.5.4.4 No sistema cardiovascular

O mercúrio inorgânico também se acumula nos vasos (Pamphlett e Kum-Jew, 2001) e no coração (Magos *et al.*, 1989). Ele é passível de induzir disfunção mitocondrial com redução de ATP, diminuir o conteúdo da glutatona e aumentar a peroxidação lipídica (Houston, 2007). Os efeitos globais do mercúrio nos vasos e no coração, incluem o aumento do estresse oxidativo (da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008a), inflamação, trombose e agregação plaquetária (Houston, 2007),

disfunção do músculo liso vascular e disfunção endotelial (Kishimoto *et al.*, 1995; Rossoni *et al.*, 1999; da Cunha *et al.*, 2000; Wiggers *et al.*, 2008b), dislipidemia (Salonen *et al.*, 1995), disfunção imunológica (Lund *et al.*, 1993; Shenker *et al.*, 1998; Peraza *et al.*, 1998) inibição da atividade da Na⁺K⁺-ATPase miocárdica (Halbach *et al.*, 1981; Ahammad-Sahib *et al.*, 1988; Oliveira e Vassallo, 1992), diminuição da hidrólise de ATP (Oliveira *et al.*, 1991) e da atividade da Ca⁺²-ATPase (Kabeer *et al.*, 1988).

As consequências cardiovasculares da toxicidade do mercúrio incluem os riscos de doença cardíaca coronariana (Ganther *et al.*, 1972; Barregard *et al.*, 1990; Guallar *et al.*, 2002), hipertensão (Machado *et al.*, 2007), arritmias (Massaroni *et al.*, 1995), infarto do miocárdio (Gonzalvo *et al.*, 1997; Salonen *et al.*, 1999), acidentes cerebrovasculares (Salonen *et al.*, 2000; Boffetta *et al.*, 2001), aterosclerose generalizada (Clarkson *et al.*, 2002b), disfunção renal e até mortalidade (Boffetta *et al.*, 2001). No sangue, o mercúrio inorgânico também exerce sua toxicidade através de alterações no transporte de glicose em vários tecidos (Barnes e Kircher, 2005), alteração no sistema imunológico via imunoglobulinas (Pollard e Hultman, 1997) e alteração do perfil lipídico por aumento da concentração de LDL oxidado (Moszczyński, 2006). O Hg⁺² também é capaz de aumentar no plasma, níveis de angiotensina II (All), de aldosterona (Chang *et al.*, 2007) e atividade da ECA (Wiggers *et al.*, 2008b).

Classicamente, o sistema renina angiotensina (SRA) circulante é primariamente um sistema endócrino, designado a mediar, através da circulação sistêmica, os efeitos da renina na produção plasmática de angiotensina (Catt *et al.*, 1970; Vane, 1974). Resumidamente, a renina liberada pelos rins circula no plasma, onde cliva o angiotensinogênio para gerar a angiotensina I (AI). Na passagem através da vasculatura pulmonar, a AI é convertida em All, por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), produzida pelas células endoteliais dos pulmões, e conduzida pelo sangue arterial para os tecidos periféricos, onde exerce seus efeitos pela interação com receptores específicos de All. Na década de 80, foi sugerido que o maior sítio de produção de AI e All são os tecidos periféricos (Fei *et al.*, 1981; Campbell, 1985). A principal função do SRA circulante, segundo Campbell, 1985, é fornecer renina e angiotensinogênio para os tecidos, sendo a maior parte de AI e All, produzida localmente dentro dos tecidos por ação da renina plasmática sobre o angiotensinogênio plasmático e por ação da ECA tecidual. Daí, níveis

plasmáticos de angiotensina representariam, um "derrame" da produção de All tecidual. Entretanto, a produção local de AI e All, pode estar sujeita à mecanismos de regulação tecido-específicos que causam mudanças na concentração local de All que pode não refletir a concentração plasmática de renina ou All. Cada tecido controla sua captação de renina e de angiotensinogênio e sua concentração local de ECA.

O SRA é bem conhecido por sua regulação na pressão sangüínea e homeostase de fluidos. A All causa vasoconstricção por estímulo direto e indireto do receptor de All tipo 1 (AT-1). Cronicamente, a All regula a pressão sangüínea pela modulação do sódio renal e reabsorção de água; diretamente por estimular o AT-1 no rim ou indiretamente, por estimular a produção e liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais e a sensação de sede no sistema nervoso central. A All por sua vez, pode sofrer ação da aminopeptidase A e produzir a angiotensina III (Ang 2-8) e esta, sofrer ação da aminopeptidase N e originar a angiotensina IV (Ang 3-8), ambas com pouca ação sobre o sistema cardiovascular (Timmermans *et al.*, 1993; Lavoie e Sigmund, 2003). Mais recentemente, a literatura descreve a existência da angiotensina (1-7) (A1-7), que pode ser formada a partir de All ou diretamente da AI (independentemente da ECA) e da existência da ECA2, uma enzima homóloga da ECA, responsável pela conversão da All em A1-7 (Ferreira e Santos, 2005).

O chamado sistema renina angiotensina tecidual ou local, é biologicamente ativo em vários tecidos como rins, cérebro, pulmão, ovários, musculatura lisa vascular e células endoteliais e coração. Flutuações nos níveis de ECA presentes nos tecidos podem regular a taxa de produção e de degradação de All e de bradicinina locais, sendo esta última, importante na modulação aguda do tônus vascular, estimulando a liberação de óxido nítrico e de prostaciclina (Dzau *et al.*, 2001). Quatro subtipos de receptores de All são conhecidos: AT-1, AT-2, AT-3 e AT-4, sendo que a maioria dos efeitos fisiológicos de All é mediada pelos receptores AT-1 e AT-2.

As células endoteliais possuem tanto receptores AT-1, quanto receptores AT-2, bem como há evidências da existência de receptores específicos para a angiotensina 1-7 e angiotensina IV (Lusher e Barton, 1997; Behrendt e Ganz, 2002). Além do efeito vasoconstritor direto na musculatura lisa vascular, a All promove remodelamento através da indução de fatores de crescimento, da produção de endotelina 1 (ET-1) e de radicais livres. A ação mitógena da All, nas células

musculares lisas dos vasos ocorre através da ativação de várias vias de sinalização, incluindo fosfolipase C, fosfolipase A2, fosfolipase D, tirosina-quinase, MAPKs e receptores de tirosina-quinase. A AII induz fatores de transcrição como a proteína ativadora 1 (AP-1), ativadores de transcrição e tradução de DNA (STATs) e o fator nuclear κ (NF κ B) (Celermajer, 1997; Anderson, 1999; Dzau *et al.*, 2001; Behrendt e Ganz, 2002). Estudos têm demonstrado que os efeitos proliferativos da AII são mediados pelos receptores AT-1 (Brilla *et al.*, 1995; Prasad *et al.*, 2001; Schuttert *et al.*, 2003) e que a ativação dos receptores AT-2 pela AII contribui para a inibição do crescimento celular, atuando como mecanismo contra-regulatório da ativação de AT-1 (Gingras *et al.*, 2003). A AII age sobre as células endoteliais por meio de sua ligação com receptores AT-1 e a estimulação deste receptor AT-1 tecidual pode ativar vários sistemas de sinalização intracelular (proteínas quinases, fatores de transcrição, vias de oxi-redução) que se relacionam com processos inflamatórios, trombogênicos e estimuladores do crescimento celular. Têm-se demonstrado que a AII aumenta a produção de ânions superóxidos nas células endoteliais por meio da enzima NADH/ NADPH oxidase, diminuindo a biodisponibilidade de NO (Vane *et al.*, 1990; Lusher e Barton, 1997; Vapaatalo e Mervaala, 2001; Behrendt e Ganz, 2002).

No coração, os receptores da AII estão presentes nos cardiomiócitos, fibroblastos, nervos terminais e vasculatura cardíaca, mediando ações que incluem modulação do crescimento cardíaco normal e patológico, aumento da síntese protéica, alteração da contratilidade e do metabolismo cardíaco (Thomas, *et al.*, 1996). A relevância biológica da A1-7 ocorre através de receptores *Mas* (pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G) no coração e nos vasos, por alterações bioquímicas e funcionais como vasodilatação, melhora na função cardíaca pós-isquemia, inibição da proliferação celular e efeito anti-arrítmico (Ferreira e Santos, 2005).

Nos rins, a AII exerce seus efeitos predominantemente nas arteríolas pós-glomerulares, aumentando a pressão hidráulica glomerular e a ultrafiltração de proteínas do plasma, estimulando o crescimento celular, inflamação e fibrose, efeitos estes, que também contribuem para a doença renal crônica (Remuzzi *et al.*, 2005).

No cérebro, os receptores para angiotensina têm sido implicados na aquisição de memória, regulação do fluxo sanguíneo e da função celular, modulação dos sistemas motores e sensoriais e mecanismos de estresse sendo sugerida a

relação do SRA a disfunções clínicas relevantes como isquemias cerebrais, mudanças de efeito cognitivo e memória no caso de paciente etilista, com depressão e com Doença de Alzheimer (Wright e Harding, 1994).

Nos pulmões, o SRA via All, está implicado na indução da fibrose pulmonar por estimular a proliferação de fibroblastos, na formação de edema pulmonar, provavelmente por aumentar a pós-carga e na vasoconstrição da artéria pulmonar (Yamamoto *et al.*, 1997; Noda, 1999; Marshall *et al.*, 2000). Já a expressão da ECA na circulação pulmonar fetal está relacionada à muscularização das artéria pulmonares fetais provavelmente pela interação de All local com o receptor AT-1 (Morrell *et al.*, 1996).

2.5.4.5 Em outros órgãos

Dados da literatura sugerem que no trato gastrointestinal, a intoxicação com o mercúrio inorgânico possa causar gosto metálico na boca, dor abdominal, náusea, vômito, constipação e anorexia (Graeme e Pollack, 1998). O mercúrio atua também através da inibição da resposta muscular lisa à acetilcolina (Abram e Korossy, 1994) e causa um efeito excitatório por despolarização celular (Moberg, 1986).

No fígado o mercúrio inorgânico é capaz de induzir o estresse oxidativo através do aumento da peroxidação lipídica, diminuição dos níveis de glutathione, aumento da atividade da glutathione peroxidase e da superóxido dismutase e diminuição da atividade da catalase. Alterações histopatológicas foram observadas (degeneração citoplasmática e núcleo picnótico), assim como, indução da expressão de RNAm de metalotioneina (Agarwal *et al.*, 2010).

Na pele, os achados relatam doenças e reações relacionadas a intoxicação com mercúrio inorgânico como: acrodinia (dor, desconforto de temperatura e edema nas mãos e nos pés, hiperplasia de glândulas e infiltrado inflamatório dérmico) (Dinehart *et al.*, 1988); Doença de Kawasaki, (resposta imunotóxica com o aparecimento de *rashes* cutâneos, mãos e pés inchados, vermelhidão na boca e garganta) (Boyd *et al.*, 2000; Guzzi e La Porta, 2008); reação inflamatória à tatuagens por uso de pigmento vermelho contendo mercúrio; exantemas; dermatite de contato e granulomas cutâneos (Boyd *et al.*, 2000).

No sistema reprodutor masculino, o Hg⁺² causa infertilidade por disfunção gonadal e prejuízo na espermatogênese (Weber e de Baat, 2000; Queiroz e

Waissmann, 2006) e no feminino são relatados problemas reprodutivos como aborto espontâneo, parto natimorto, malformação congênita, infertilidade, alteração no ciclo menstrual e inibição da ovulação (Schuurs, 1999).

O mercúrio inorgânico, atua também através da barreira placentária (Yang *et al.*, 1996) e do leite materno (Sundberg *et al.*, 1998), exercendo seus efeitos deletérios.

5 Justificativa do trabalho

O mercúrio é um contaminante ambiental que pode ser absorvido por diferentes vias, distribuído e acumulado em vários órgãos. As concentrações plasmáticas de mercúrio aumentam após manipulação deste nos tratamentos odontológicos, podendo afetar tanto os pacientes quanto os profissionais expostos. Outra associação é o consumo de pescados expostos à altas concentrações de mercúrio e o risco de doenças cardiovasculares. Alguns estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, indicam que concentrações nanomolares de mercúrio já são suficientes para alterar parâmetros cardiovasculares significantes, daí, a necessidade de se pesquisar mais, a respeito da toxicidade de baixas concentrações deste metal sobre os vários órgãos e sistemas, principalmente sobre o aparelho cardiovascular, levando em consideração sua relevância nos índices mundiais de morbimortalidade.

OBJETIVOS

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de 30 dias de exposição à baixas concentrações de cloreto de mercúrio (20 η M) sobre o sistema cardiovascular de ratos Wistar e SHR, levando em consideração que este tratamento produz uma concentração plasmática final de 8 η g/mL aproximadamente (dados obtidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar nos ratos Wistar e SHR expostos 30 dias a 20 η M de HgCl_2 :

- os dados ponderais;
- a pressão arterial sistólica por pletismografia;
- os parâmetros hemodinâmicos;
- histologicamente, o cérebro, rins, pulmões, aorta e coração;
- os parâmetros bioquímicos e hemograma;
- a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma, cérebro, rins, pulmões, aorta e coração;
- o estresse oxidativo através da produção de malondialdeído, no plasma, cérebro, rins, pulmões, aorta e coração, e;
- avaliar em ratos Wistar a citotoxicidade de diferentes concentrações de HgCl_2 em cultivos de células musculares lisas de aortas.

MATERIAIS E MÉTODOS

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Na realização deste estudo foram utilizados ratos machos, Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR) que no início do estudo tinham três meses de idade e pesavam entre 200 e 300 g. Os animais foram cedidos pelos biotérios da *Facultad de Medicina da Universidad Autónoma de Madrid* e da Universidade Federal do Espírito Santo. Durante o tratamento os ratos permaneceram em gaiolas com temperatura e umidade constantes, e ciclo claro-escuro de 12:12 h. Os animais tinham livre acesso a ração e água.

3.2 Modelo experimental

Os ratos foram divididos de forma aleatória em quatro grupos experimentais, chamados: Wistar controle (Wistar CT), Wistar mercúrio (Wistar Hg), SHR controle (SHR CT) e SHR mercúrio (SHR Hg).

Os grupos CT, receberam diariamente injeções intramusculares nas patas traseiras, de solução salina (NaCl 0,9 % - 0,1 mL/300 g de rato) durante um período de 30 dias.

Os animais dos grupos Hg receberam, no primeiro dia de tratamento, uma injeção intramuscular na pata traseira contendo quantidade suficiente de solução de cloreto de mercúrio (HgCl_2), dissolvido em salina, para atingir a concentração plasmática de 20 ηM . Nos dias subseqüentes, levando em consideração que a meia-vida do HgCl_2 é de 37 dias (de Azevedo, 2003), os ratos receberam doses diárias de reforço (0,07 $\mu\text{g/Kg}$) contendo somente a quantidade que eles excretariam em um dia. Este protocolo experimental foi baseado nos dados publicados por Wiggers, *et al.*, (2008a), os quais determinaram que, no dia do sacrifício, os animais apresentariam uma concentração plasmática final em torno de 8 $\eta\text{g/mL}$.

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

3.3 Avaliação ponderal

Após 30 dias de tratamento com o HgCl_2 , foram avaliados os pesos corporal e dos órgãos (cérebro, coração, rins, pulmões, adrenais, baço e fígado) dos ratos Wistar e SHR para serem comparados com seus respectivos controles. Os pesos dos órgãos de cada animal foram corrigidos pelo seu próprio peso corporal (PC).

3.4 Análise da pressão arterial sistólica

Objetivando a análise do efeito da exposição ao HgCl_2 sobre a pressão arterial sistólica dos animais, os grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg, tiveram suas pressões verificadas semanalmente (0 dia - início do tratamento, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 30 dias), de maneira indireta, pelo método de pletismografia de cauda (Letica, Digital Pressure Meter, LE 5000, Barcelona, Espanha) (Buñag, 1973).

3.5 Avaliação hemodinâmica

Após 30 dias de tratamento, os animais que receberam o HgCl_2 e os animais controle foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de uretana (1,2 g/Kg) e submetidos à cateterização da artéria carótida e veia jugular direita, para avaliação dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. As cateterizações foram realizadas com cânula de polietileno (PE 50) preenchido com salina heparinizada (100 U/mL). A PAS e a PAD foram medidas antes e depois das avaliações pressóricas intraventriculares para confirmar a integridade valvular aórtica. As pressões foram medidas através de um transdutor de pressão (TSD 104A-Biopac) conectado a um pré-amplificador (Funbec MP-100) e registradas em um microcomputador por um sistema de aquisição de dados (MP 30 Biopac Systems, Inc; CA). A frequência cardíaca foi calculada a partir do registro da pressão sanguínea pulsátil. Para aquisição dos dados foi utilizada uma taxa de amostragem de 2000 registros/seg. As derivadas temporais (dP/dt) positiva e negativa foram obtidas dos registros de ondas de pressão intraventricular.

Após uma estabilização de 20 minutos, foram feitos registros contínuos para avaliar nos 4 grupos de animais (Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg) os seguintes parâmetros:

Na artéria carótida: pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC).

No ventrículo direito: pressão sistólica (PSVD), pressão diastólica final (PD2 VD), primeira derivada temporal de pressão positiva ($dP/dt + VD$) e primeira derivada temporal de pressão negativa ($dP/dt - VD$).

No ventrículo esquerdo: pressão sistólica (PSVE), pressão diastólica final (PD2 VE), primeira derivada temporal de pressão positiva ($dP/dt + VE$) e primeira derivada temporal de pressão negativa ($dP/dt - VE$).

3.6 Análise histológica

Concluídos os 30 dias de tratamento com o mercúrio, 5 animais de cada grupo foram sacrificados (Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg) e os órgãos (cérebro, coração, rins, pulmões e aorta) imediatamente removidos e armazenados em solução de formol a 10 % para análise histológica. Os rins sofreram secção longitudinal e os demais órgãos, secção transversal. Todos os órgãos foram desidratados em ordem crescente de álcool, xilol e incluídos em parafina. A microtomia feita foi de 10 micra e a coloração das lâminas realizada com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas histológicas foram avaliadas por microscopia óptica (Olympus BX41) em aumentos de 4, 10 e 40 vezes, as imagens captadas pelo programa Honestech TVR 2,5 e analisadas qualitativamente.

3.7 Análise hematológica e do perfil bioquímico

Ao final de 30 dias de tratamento com o $HgCl_2$, foi coletado o sangue da artéria renal dos animais Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Foram realizadas análises automatizadas, no serviço de patologia clínica e bioquímica do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) e no laboratório de análises clínicas do SESI (SESI LAB), ambos em Vitória, Espírito Santo.

3.8 Determinação da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) no plasma e nos órgãos

A atividade da ECA foi medida por método fluorimétrico, adaptado por Friedland e Silverstein (1976). As amostras de plasma e de tecidos (homogeneizados a 4 °C em solução tampão com PBS e pH 7,4) em triplicado (3 µL) foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37 °C com 40 µL de tampão contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma). A reação foi cessada pela adição de 190 µL de HCl (0,35 N). O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente seguindo 10 minutos de incubação com 100 µL de 2% *o-phatal-dialdehyde* (OPA) em metanol. As medidas de fluorescência foram realizadas a 37 °C em uma placa de leitura Fluostar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany) com filtros de excitação de 350 nm e de emissão de 520 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo software Fluostar Optima. Placas negras com 96 poços (Biogen Científica) foram utilizadas.

3.9 Medida de produção de malondialdeído (MDA) no plasma e nos órgãos

As concentrações plasmática e tecidual (cérebro, coração, rins, pulmões e aorta) de malondialdeído dos ratos Wistar e SHR, foram mensurados por ensaio modificado de ácido tiobarbitúrico (Rodríguez-Martínez e Ruiz-Torres, 1992). Os radicais livres reagem com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e portanto um indicador de peroxidação lipídica. Após centrifugação do sangue e dos tecidos (homogeneizados a 4 °C em solução tampão com PBS e pH 7,4) a 1500 x g por 15 minutos a temperatura de 4° C, o plasma e o sobrenadante foram retirados e misturados com ácido tricloroacético a 20 % em 0.6 M HCl (1:1, v/v), os tubos contendo as amostras foram mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1500 x g antes de adicionar o TBA (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após, a mistura foi

aquecida a 97° C por 30 minutos. Medida espectrofotométrica foi realizada a 535 nm e 20°C.

3.10 Avaliação da citotoxicidade do HgCl₂ em células musculares lisas de aorta de ratos Wistar

3.10.1 Cultivo celular

A técnica de cultura celular foi feita como descrita previamente por Hui *et al.*, 2001. Para avaliação da citotoxicidade do mercúrio, o HgCl₂, em diferentes concentrações, foi incubado 24 horas, nas placas de cultivo contendo células musculares lisas aórtica de ratos Wistar.

3.10.2 Microscopia confocal

Nesta técnica, o HgCl₂ foi empregado nas doses de 5 µM, 10 µM, 50 µM e 100µM. A análise da emissão de fluorescência dos componentes nucleares foi realizada através da microscopia confocal. Para isso, células cultivadas de músculo liso de artéria aorta previamente tratadas com HgCl₂ foram fixadas com paraformaldeído (4%) e incubadas durante 15 minutos, protegidas da luz, com o corante nuclear Hoechst 33342 (0,01 mL/mL). Posteriormente as células foram levadas para visualização em um microscópio confocal Leica ECS SP2 acoplado a um microscópio invertido e a uma fonte de laser (Argon e Helio-Neon Laser Sources). As imagens foram capturadas com objetiva de imersão em óleo (NA 1,3) e aumento de 40 vezes, sempre sob as mesmas condições de intensidade, laser, brilho e contraste.

3.11 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados foram analisados e apresentados comparando os ratos Wistar CT vs Wistar Hg e SHR CT vs SHR Hg. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os valores de “n” representam o número de animais utilizados nos protocolos experimentais.

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de teste *t* de “Student” com teste *post-hoc* de Tukey. Também foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Quando a ANOVA apresentava significância

estatística era realizado o teste *post-hoc* de Bonferroni ou Tukey (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, U.S.A). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valores de $p < 0,05$.

3.12 Fármacos e reagentes utilizados

- 2-Hidroxietilmercaptano (β -mercaptoetanol) (Sigma)
- 3', 3'', 5', 5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Azul de Bromefol) (Sigma)
- Ácido acético glacial (Probus)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido clorídico (Merck)
- Ácido etilodiaminotetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico 9HEPES) (Sigma)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (Merck)
- Azul brilhante de Coomassie G (BioRad)
- Azul brilhante de Coomassie R (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Pancreac)
- Cloreto de cálcio (Pancreac)
- Cloreto de mercúrio (Sigma)
- Cloreto de potássio (Pancreac)
- Cloreto de sódio (Pancreac)
- Corante nuclear Hoescht 33342 (Hoescht)
- DL-Ditioteritol (DTT) (Sigma)
- Etanol absoluto (Probus)
- Éter sulfúrico (Pancreac)
- Fosfato de potássio (Pancreac)
- Fosfato de sódio (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Hematoxilina e eosina (Merck)
- Heparina (Baxter)
- Hip-His-Leu (Sigma)
- Metanol (Merck)

- NS 398(N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Calbiochem)
- o-phatal-dialdehyde (OPA)
- Paraformaldeído (Panreac)
- Sacarose (Merck)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (Biorad)
- Uréia (Sigma)
- Uretana (Sigma)
- Xilol (Merck)

RESULTADOS

IV RESULTADOS

4.1 Avaliação ponderal

Após 30 dias de tratamento com o HgCl₂, foram avaliados os pesos corporal e dos órgãos dos ratos Wistar e SHR.

Os animais dos grupos Wistar e SHR tratados com HgCl₂, não apresentaram diferença nem no peso corporal e nem no peso dos órgãos (corrigidos pelo PC), quando comparados com seus respectivos controles tratados com salina. (Tabela 1).

Tabela 1- Valores dos pesos corporal (PC), cérebro/PC, coração/PC, rins/PC, pulmões/PC, adrenais/PC, baço/PC e fígado/PC em ratos Wistar (CT e Hg) e SHR (CT e Hg) após o tratamento de 30 dias com HgCl₂

	Wistar CT n=6	Wistar Hg n=8	SHR CT n=9	SHR Hg n=9
peso corporal (PC) (g)	399 ± 23,8	384 ± 6,4	216 ± 6,7	222 ± 4,8
cérebro/PC (mg/g)	4,58 ± 0,27	4,69 ± 0,17	7,48 ± 0,22	7,41 ± 0,18
coração (mg/g)	3,06 ± 0,25	3,43 ± 0,06	3,77 ± 0,07	3,81 ± 0,07
rins/PC (mg/g)	6,44 ± 0,70	6,53 ± 0,19	6,78 ± 0,09	6,80 ± 0,19
pulmões/PC (mg/g)	3,97 ± 0,63	4,53 ± 0,23	6,48 ± 0,40	7,91 ± 0,40
adrenais/PC (mg/g)	0,135 ± 0,022	0,156 ± 0,015	0,295 ± 0,014	0,304 ± 0,023
baço/PC (mg/g)	1,84 ± 0,16	2,04 ± 0,11	2,21 ± 0,05	2,23 ± 0,07
fígado/PC (mg/g)	30,66 ± 2,37	32,19 ± 0,75	31,72 ± 0,81	32,22 ± 0,78

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t* não pareado. *p* >0,05.

4.2 Avaliação da pressão arterial sistólica por pletismografia

Nos animais de todos os grupos, a PAS foi avaliada semanalmente por pletismografia. Antes de iniciar o tratamento (tempo 0), os animais Wistar apresentavam valores pressóricos semelhantes, assim como os animais do grupo SHR. No decorrer do tratamento, os animais apresentaram pequenas variações da pressão arterial (Figura 1 e Tabela 2). No entanto, estas só foram significantes nos ratos Wistar Hg vs Wistar CT, com 30 dias de tratamento. Os grupos CT e Hg dos ratos SHR não foram diferentes em nenhum dos tempos avaliados.

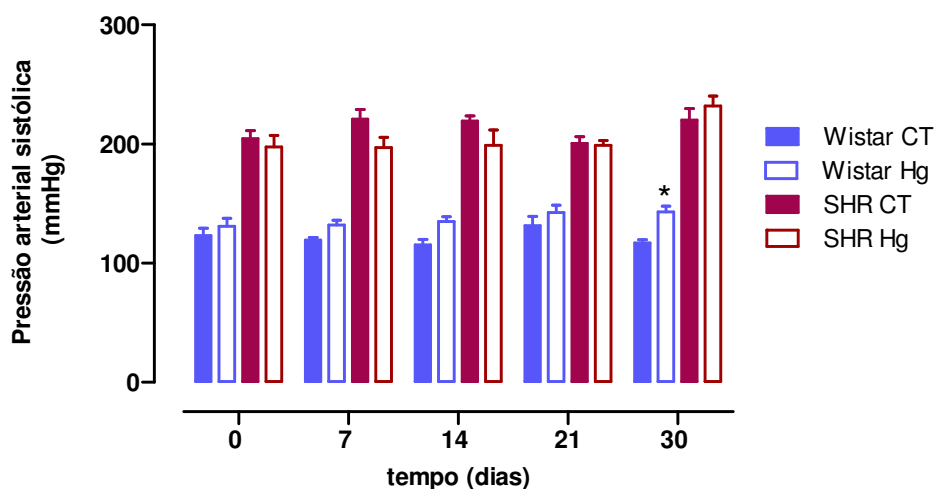


Figura 1: Pressão arterial sistólica medida por meio da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Wistar Hg vs Wistar CT e SHR Hg vs SHR CT, durante 30 dias (1 vez por semana). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (2 vias), *pot-hoc* Bonferroni. * $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT.

Tabela 2- Valores da pressão arterial sistólica (PAS - mmHg) medidos por meio da pletismografia de cauda em ratos Wistar e SHR durante o tratamento de 30 dias com HgCl₂

Tratamento (dias)	Wistar CT n=5	Wistar Hg n=5	SHR CT n=5	SHR Hg n=5
0	123 ± 6	131 ± 7	205 ± 7	198 ± 10
7	119 ± 2	132 ± 4	221 ± 8	197 ± 8
14	115 ± 5	135 ± 4	219 ± 9	199 ± 13
21	132 ± 8	142 ± 6	200 ± 6	199 ± 4
30	117 ± 3	143 ± 5*	220 ± 9	232 ± 9

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA 2 vias, *post-hoc* Bonferroni. * p<0,05 para Wistar Hg vs Wistar CT.

4.3 Avaliação hemodinâmica

Após 30 dias de tratamento com o HgCl₂, foram obtidos os parâmetros hemodinâmicos nos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg (Tabela 3). A pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PD2 VE) do grupo Wistar Hg estava aumentada quando comparada ao seu respectivo grupo controle. Os animais do grupo SHR Hg não apresentaram alteração deste parâmetro quando comparados aos do grupo SHR CT. Nenhum outro parâmetro avaliado foi diferente quando comparados os grupos Wistar Hg vs Wistar CT e SHR Hg vs SHR CT.

Tabela 3- Valores hemodinâmicos de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg, anestesiados com uretana

	Wistar CT n=6	Wistar Hg n=7	SHR CT n=6	SHR Hg n=7
PAS (mmHg)	105 ± 4	97 ± 4	105 ± 3	113 ± 3
PAD (mmHg)	71 ± 4	67 ± 4	58 ± 2	68 ± 4
PSVE (mmHg)	114 ± 8	107 ± 6	117 ± 9	115 ± 3
PD2 VE (mmHg)	0,25 ± 0,4	3,31 ± 0,5*	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2
dP/dt + VE (mmHg/s)	8627 ± 1379	8500 ± 913	7360 ± 757	7001 ± 725
dP/dt – VE (mmHg/s)	-6270 ± 503	-6249 ± 466	-7169 ± 479	-6524 ± 427
PSVD (mmHg)	32 ± 4	29 ± 2	29 ± 2	33 ± 2
PD2 VD (mmHg)	-1,080 ± 0,4	1,10 ± 0,8	-0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,1
dP/dt + VD (mmHg/s)	3339 ± 899	1758 ± 164	2776 ± 431	2171 ± 153
dP/dt – VD (mmHg/s)	-2560 ± 634	-1387 ± 177	-1833 ± 195	-1695 ± 139
FC (bpm)	324 ± 36	325 ± 22	343 ± 13	341 ± 13

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA 1 via, *post-hoc* Tukey.

* p<0,05 para Wistar Hg vs Wistar CT.

4.4 Avaliação histológica

Na análise histológica (n=5 para cada grupo) feita nos órgãos após 30 dias de tratamento com o HgCl₂, foram avaliados somente parâmetros qualitativos e nenhuma diferença significativa foi encontrada no coração, aorta, pulmões, cérebro e rins quando comparados os grupos Wistar Hg vs Wistar CT, e SHR Hg vs SHR CT. Entretanto, vale ressaltar que, 2 dos 5 animais do grupo Wistar Hg, apresentaram ramos da artéria pulmonar com hipertrofia da parede.

4.5. Avaliação hematológica

A contagem das células sanguíneas dos animais expostos ao HgCl₂ revelou diferença positiva na % de neutrófilos e negativa na % de linfócitos dos ratos Wistar Hg quando comparados com seus respectivos controles. O grupo SHR Hg apresentou sua % de neutrófilo diminuída e a % de linfócito aumentada quando comparado ao grupo SHR CT.

A contagem de plaquetas revelou um aumento no grupo Wistar Hg quando comparado ao grupo Wistar CT. Nos demais parâmetros analisados, nenhuma diferença foi encontrada quando comparados os grupos Wistar Hg vs Wistar CT e SHR Hg vs SHR CT (Tabela 4).

Tabela 4- Valores hematológicos de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg

	Wistar CT n=7	Wistar Hg n=6	SHR CT n=6	SHR Hg n=6
WBC (RH10 ³ /uL)	9,78 ± 1,18	9,18 ± 0,66	15,70 ± 2,06	19,12 ± 31,14
neutrófilos % (L%)	14,08 ± 5,09	30,36 ± 4,32*	44,98 ± 5,87	21,32 ± 4,81 [#]
linfócitos % (H%)	82,94 ± 4,60	68,33 ± 4,53*	53,13 ± 6,56	76,17 ± 4,37 [#]
monócitos % (L%)	2,58 ± 0,86	0,58 ± 0,08	1,48 ± 0,60	2,30 ± 0,94
eosinófilos % (L%)	0,27 ± 0,15	0,38 ± 0,24	0,40 ± 0,25	0,78 ± 0,37
basófilos (%)	0,11 ± 0,04	0,05 ± 0,03	-	-
RBC (10 ⁶ /uL)	8,72 ± 0,18	8,58 ± 0,44	10,39 ± 0,31	10,58 ± 0,31
HGB (RH g/dL)	16,54 ± 0,33	16,18 ± 0,84	16,91 ± 0,24	17,60 ± 0,29
HCT (RH%)	48,40 ± 0,86	48,05 ± 2,65	48,76 ± 1,28	50,82 ± 0,76
VCM (*RL fL)	55,51 ± 0,48	55,91 ± 0,52	48,00 ± 0,55	48,96 ± 0,09
HCM (RL pg)	18,94 ± 0,17	18,85 ± 0,19	16,67 ± 0,09	17,00 ± 0,15
CHCM (RH g/dL)	34,15 ± 0,26	33,68 ± 0,19	34,74 ± 0,58	34,66 ± 0,26
RDW (RH %)	13,67 ± 0,37	13,53 ± 0,37	42,28 ± 1,43	45,04 ± 0,98
PLT (10 ³ /uL)	756,8 ± 55,2	913,0 ± 19,7*	848,3 ± 49,65	1179,5 ± 143
MPV (RL fL)	6,51 ± 0,19	6,43 ± 0,13	6,31 ± 0,05	6,50 ± 0,12
PCT (R %)	0,49 ± 0,04	0,58 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,67 ± 0,03
PDW (R %)	15,88 ± 0,12	15,83 ± 0,09	15,3 ± 0,1	16,45 ± 0,43

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t* não pareado.

* $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT e # $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

WBC = glóbulos brancos; RBC = glóbulos vermelhos; HGB = hemoglobina; HCT = hematócrito; VMC = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHMC = concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW = variação dos volumes de hemácias; PLT = contagem de plaquetas; MPV = volume médio plaquetário; PCT = plaquetócrito e PDW = largura de distribuição das plaquetas.

4.6 Avaliação do perfil bioquímico

O resultado da avaliação bioquímica após 30 dias de tratamento com HgCl₂, indicou aumento na glicose circulante e diminuição da globulina do grupo Wistar Hg quando comparado ao grupo Wistar CT e estes parâmetros não foram diferentes quando comparados os grupos SHR Hg vs SHR CT. Nenhum outro parâmetro avaliado foi diferente quando comparados os grupos Wistar Hg vs Wistar CT e SHR Hg vs SHR CT (Tabela 5).

Tabela 5- Perfil bioquímico de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg

	Wistar CT n=6	Wistar Hg n=8	SHR CT n=6	SHR Hg n=6
glicose (mg/dL)	161,6 ± 12,3	209,3 ± 15,4*	193,0 ± 9,5	174,0 ± 13,2
colesterol total (mg/dL)	42,1 ± 3,3	43,3 ± 4,0	35,6 ± 2,1	34,6 ± 0,8
HDL colesterol (mg/dL)	14,0 ± 0,7	14,5 ± 1,3	12,1 ± 1,0	12,4 ± 0,4
LDL colesterol (mg/dL)	17,4 ± 2,7	22,1 ± 5,2	13,1 ± 1,9	10,9 ± 0,8
ácido úrico (mg/dL)	2,48 ± 0,3	2,16 ± 0,2	5,25 ± 0,7	5,20 ± 0,3
triglicerídeo (mg/dL)	72,3 ± 7,6	84,1 ± 11,5	57,4 ± 7,5	56,8 ± 5,3
creatinina (mg/dL)	0,53 ± 0,06	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,05	0,50 ± 0,00
albumina (g/dL)	3,16 ± 0,19	3,25 ± 0,18	3,26 ± 0,12	3,17 ± 0,03
globulina (g/dL)	3,21 ± 0,09	2,84 ± 0,10*	2,83 ± 0,25	2,41 ± 0,07
proteína total (g/dL)	6,3 ± 0,2	6,0 ± 0,2	6,0 ± 0,3	5,58 ± 0,09

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado.

* $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT.

4.7 Avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma e órgãos

Quando comparados os grupos Wistar Hg vs Wistar CT, a atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) foi maior no plasma e no coração dos animais tratados com mercúrio, não havendo alteração na atividade desta enzima na aorta, pulmões, cérebro e rins. Na comparação entre os grupos SHR Hg vs SHR CT, a atividade da ECA estava aumentada no plasma e diminuída no coração, aorta, pulmões, cérebro e rins dos ratos expostos ao HgCl_2 (Figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e Tabela 6).

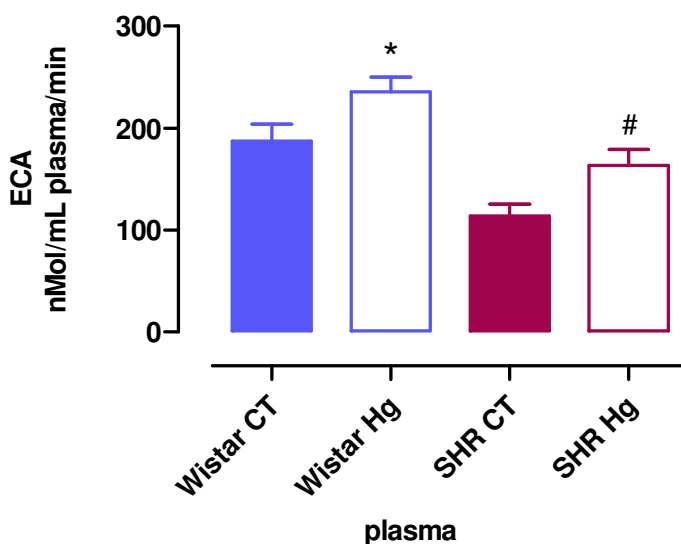


Figura 2- Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL}$ de plasma/min) plasmática dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT. # $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

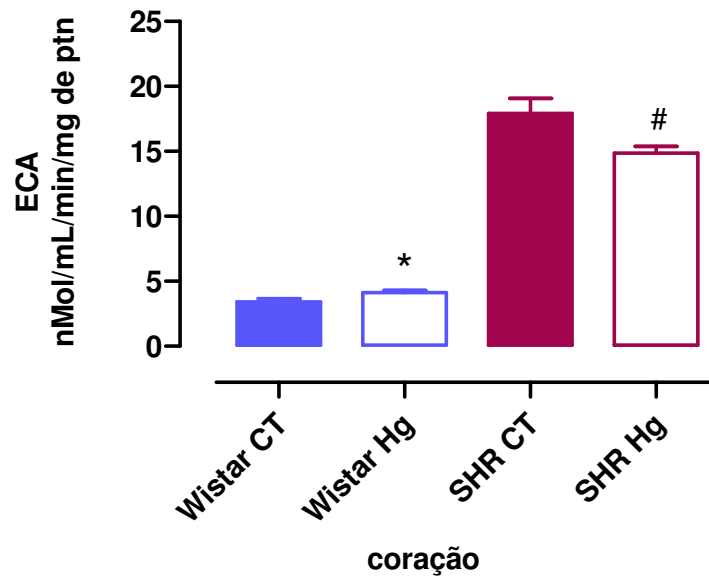


Figura 3- Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) no coração dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT. # $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

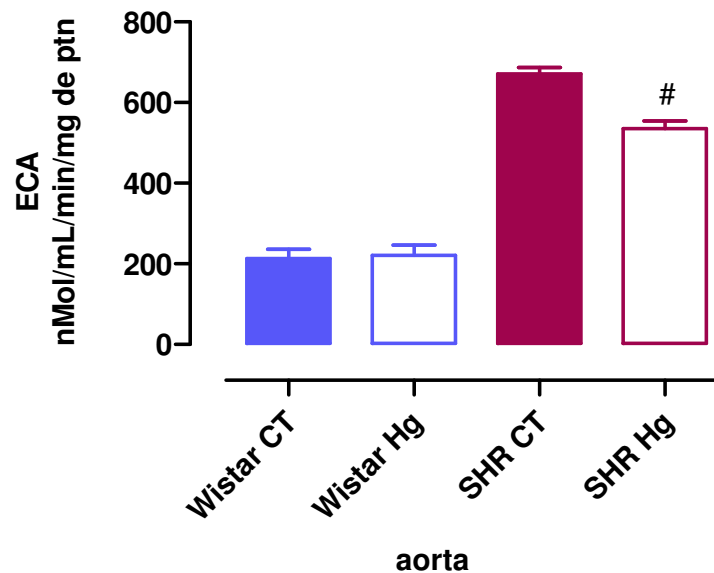


Figura 4- Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) na artéria aorta dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. # $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

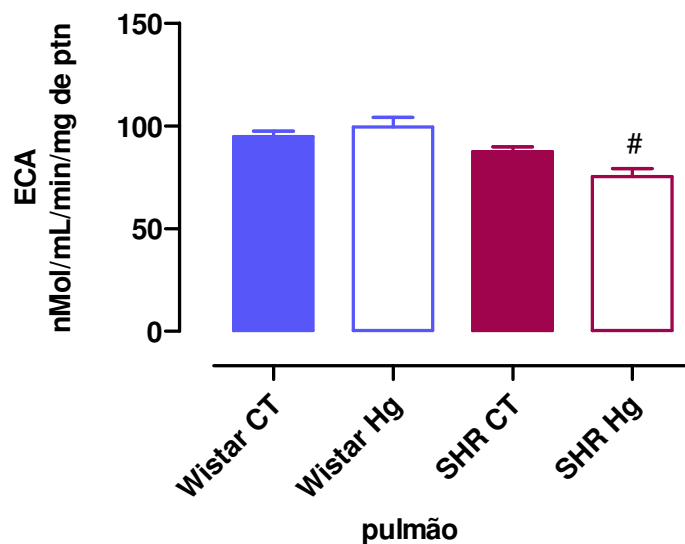


Figura 5- Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) no pulmão dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste t não pareado. [#] $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

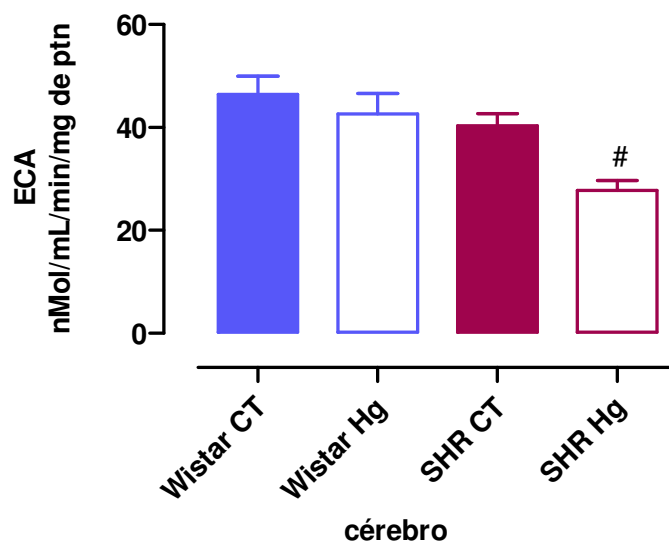


Figura 6- Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) no cérebro dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, CT SHR e SHR Hg. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste t não pareado. [#] $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

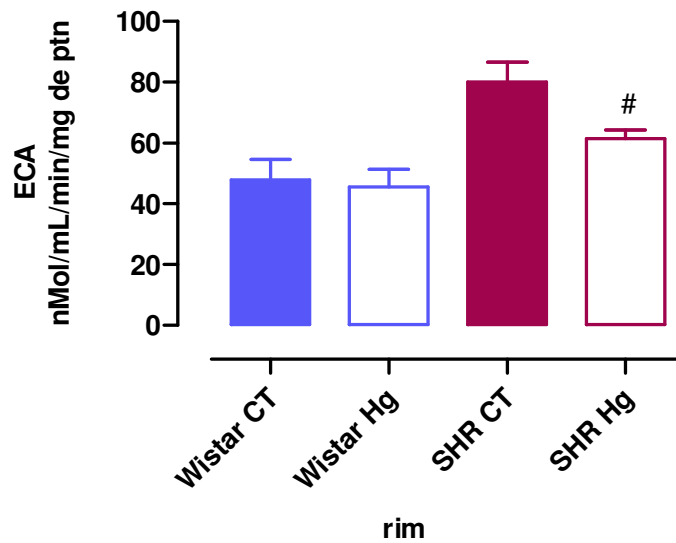


Figura 7- Atividade da ECA ($\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína) no rim dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. [#] $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

Tabela 6: Valores da atividade da enzima conversora de angiotensina dos ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg

	Wistar CT n=6	Wistar Hg n=6	SHR CT n=6	SHR Hg n=6
plasma	187,1 ± 16,2	235,5 ± 14,2*	113,6 ± 11,4	163,2 ± 15,8 [#]
coração	3,4 ± 0,2	4,1 ± 0,1*	17,9 ± 1,1	14,8 ± 0,58 [#]
aorta	213,3 ± 22,3	221,3 ± 24,9	670,4 ± 16,3	534,8 ± 19,2 [#]
pulmão	94,8 ± 2,5	99,4 ± 4,6	87,6 ± 2,2	75,1 ± 4,0 [#]
cérebro	46,4 ± 7,8	42,6 ± 9,9	40,3 ± 2,3	27,8 ± 1,8 [#]
rim	47,8 ± 6,6	45,4 ± 5,8	80,0 ± 6,3	61,4 ± 2,8 [#]

Valores da atividade da ECA expressos em $\eta\text{mol/mL/min/mg}$ de proteína exceto o plasma que está expresso em $\eta\text{mol/mL}$ de plasma/min.

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado.

* $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT e [#] $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

4.8 Medida da produção de malondialdeído (MDA) no plasma e órgãos

Com o intuito de verificar se o estado oxidante (estresse oxidativo) é alterado pelo tratamento com HgCl_2 foram realizadas medidas da produção do malondialdeído no plasma, coração, aorta, rins, cérebro e pulmões dos ratos Wistar e SHR (Tabela 7).

Como se observa nas Figuras 8 e 9, os níveis plasmático e cardíaco de malondialdeído estão aumentados nos animais do grupo Wistar Hg quando comparado ao seu grupo controle. Nos pulmões, aorta e cérebro este aumento não foi observado (Figuras 10, 11 e 12) enquanto nos rins houve diminuição deste parâmetro (Figura 13). A comparação plasmática entre os grupos SHR Hg vs SHR CT não foi significativa (Figura 8), entretanto, a produção de MDA estava aumentada no coração e aorta (Figura 9 e 10) e diminuída nos pulmões, cérebro e rins dos ratos do grupo SHR Hg quando comparados aos do grupo SHR CT (Figuras 11, 12 e 13).

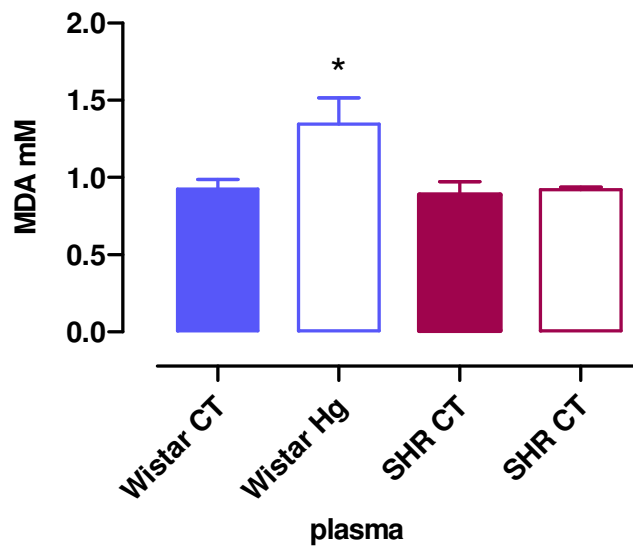


Figura 8- Medida da produção de MDA plasmático (em mM) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT.

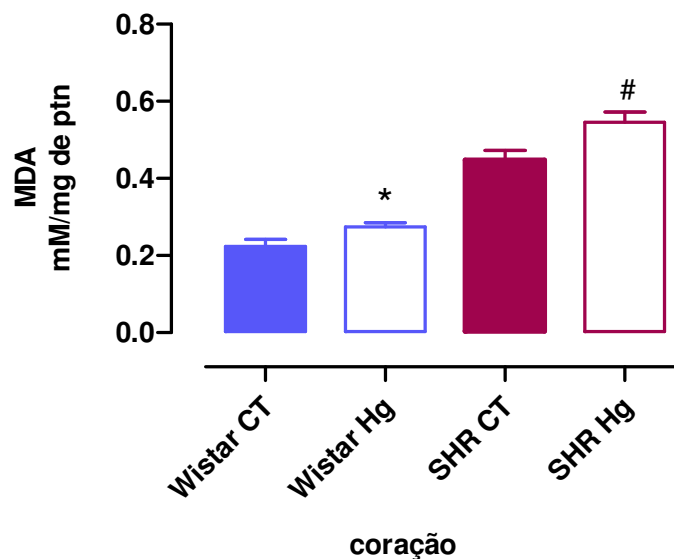


Figura 9- Medida da produção de MDA cardíaco (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT. # $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

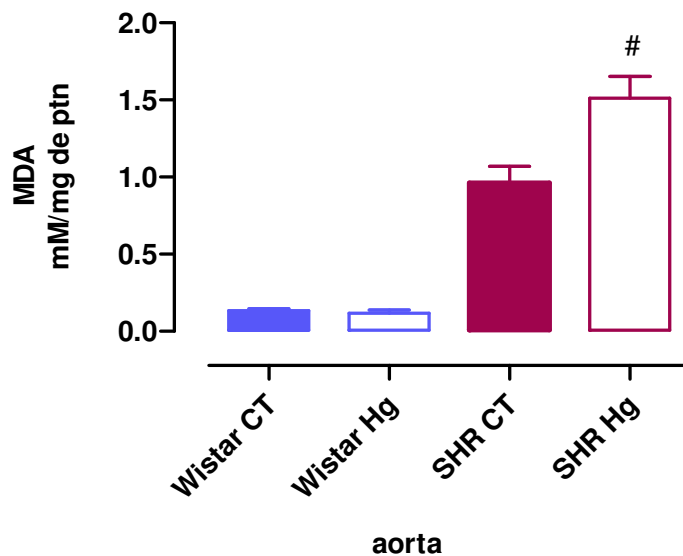


Figura 10- Medida da produção de MDA aórtico (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. [#] $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

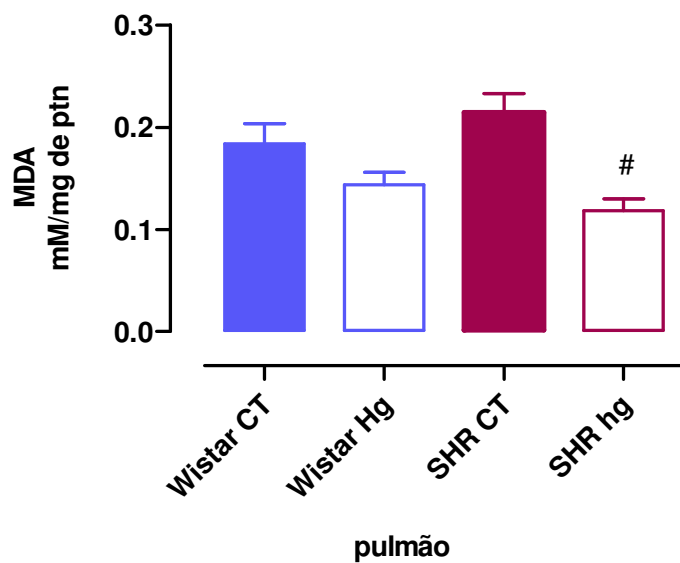


Figura 11- Medida da produção de MDA pulmonar (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. [#] $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

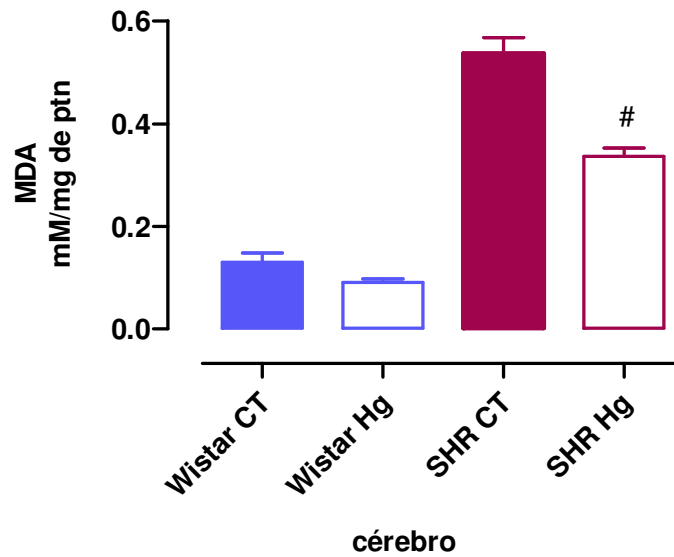


Figura 12- Medida da produção de MDA cerebral (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t*. # $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

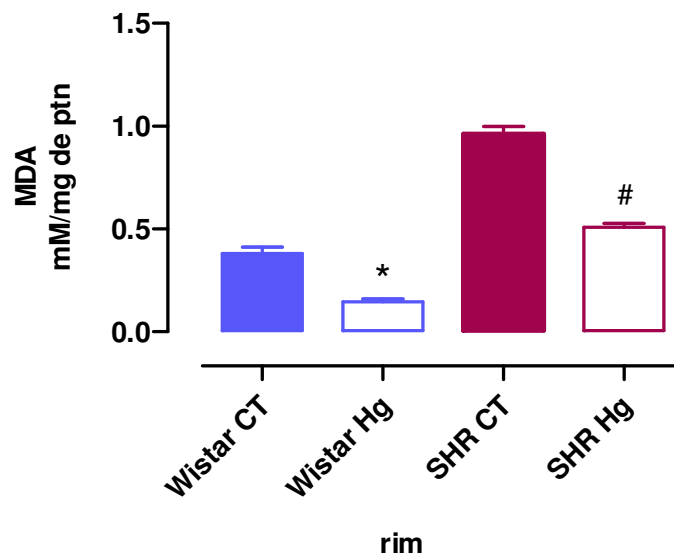


Figura 13- Medida da produção de MDA renal (em mM/mg de proteína) de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg. Dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT. # $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

Tabela 7: Valores da concentração do malondialdeído de ratos dos grupos Wistar CT, Wistar Hg, SHR CT e SHR Hg

	Wistar CT n=6	Wistar Hg n=6	SHR CT n=6	SHR Hg n=6
plasma	0,93 ± 0,06	1,28 ± 0,18*	0,89 ± 0,08	0,92 ± 0,01
coração	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,01*	0,45 ± 0,02	0,55 ± 0,02 [#]
aorta	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,96 ± 0,11	1,51 ± 0,14 [#]
pulmão	0,18 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,12 ± 0,01 [#]
cérebro	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,34 ± 0,01 [#]
rim	0,38 ± 0,03	0,14 ± 0,01*	0,96 ± 0,03	0,51 ± 0,01 [#]

Valores da concentração de MDA expressos em mM no plasma e mM/mg de proteína nos tecidos.

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t* não pareado.

* $p < 0,05$ para Wistar Hg vs Wistar CT e [#] $p < 0,05$ para SHR Hg vs SHR CT.

4.9 Avaliação da citotoxicidade do HgCl₂ em células musculares lisas de aorta de ratos Wistar

Experimentos prévios de nosso grupo de pesquisa, indicaram que artérias aortas de ratos Wistar tratados 30 dias com 20 η M de HgCl₂ apresentaram diminuição da espessura de suas paredes. Visando esclarecer se esta diminuição teria uma possível relação com o número celular do tecido aórtico dos ratos tratados, avaliamos a citotoxicidade por 24 horas, de diferentes concentrações de HgCl₂ sobre o cultivo de células musculares lisas aórticas.

Foi encontrado que, o HgCl₂ nas doses de 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M, através da coloração de Hoechst e microscopia confocal, produz condensação da cromatina, indicando dano irreversível nas células musculares lisas de aorta de ratos Wistar (Figura 14).

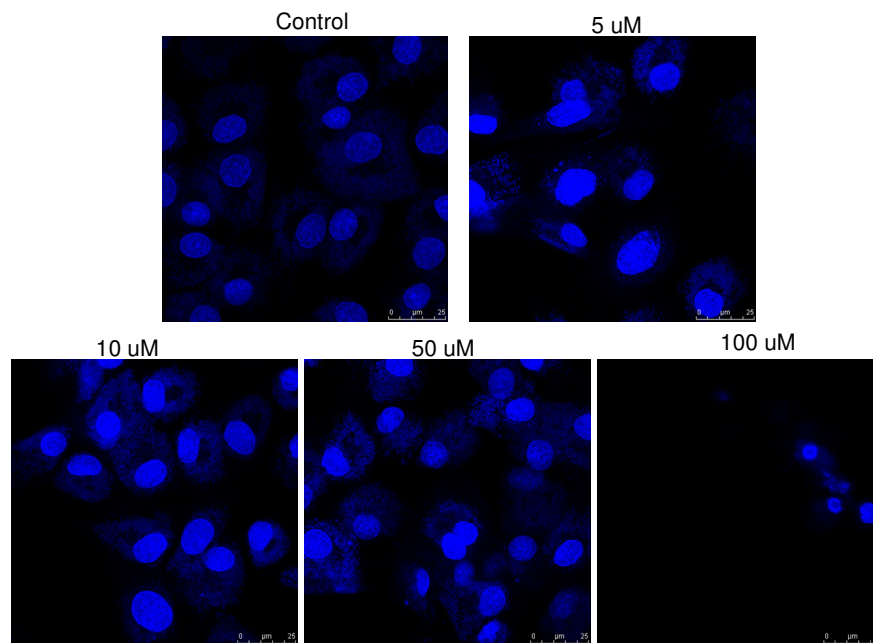


Figura 14- Imagens representam a emissão de fluorescência nuclear produzida pela citotoxicidade de diferentes concentrações do HgCl₂ em células musculares lisas de aorta de ratos Wistar.

DISCUSSÃO

V DISCUSSÃO

O principal resultado deste estudo é a demonstração de que a exposição crônica à doses nanomolares de mercúrio (HgCl_2) pode ser considerada fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e os mecanismos envolvidos englobam alterações hemodinâmicas, hematológicas, bioquímicas, na atividade da enzima conversora de angiotensina e no estresse oxidativo.

Vários estudos têm sido direcionados a investigação da toxicidade do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular (Oliveira *et al.*, 1994b; Massaroni *et al.*, 1995; Vassallo *et al.*, 1996; Rossoni *et al.*, 1999; Vassallo *et al.*, 1999; da Cunha *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2003). Entretanto, poucos foram realizados com concentrações tão pequenas deste metal, similares às encontradas no plasma de indivíduos expostos ao amálgama dentário, sejam profissionais ou pacientes (Langworth *et al.*, 1997). Estes estudos têm demonstrado que a severidade dos efeitos tóxicos está diretamente relacionada à concentração e o tempo de exposição ao mercúrio.

5.1 Avaliação ponderal

Neste estudo, o tratamento por 30 dias com o cloreto de mercúrio (HgCl_2) não alterou o peso dos animais do grupo Wistar no tempo e dose administrados. O peso corporal dos animais ao início e ao final do tratamento foram semelhantes ao peso dos animais controle. Assim, nenhuma diferença foi encontrada nos pesos dos órgãos avaliados (cérebro, coração, rins, pulmões, adrenais, baço e fígado).

Estes achados corroboram com os de Eide e Wesenberg, 1993 quando verificaram que ratos expostos ao de vapor de mercúrio ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) por períodos de 6 horas, 5 dias e 7 dias não apresentaram nenhuma influência sobre o ganho de peso corporal. Institóris *et al.*, 2001a e 2001b, utilizando por 28 dias, $0,4 \text{ mg}/\text{Kg}/\text{dia}$ de HgCl_2 , por gavagem, não encontraram alterações no peso corporal e tampouco no cérebro, timo, pulmões, coração, fígado, baço, rins, adrenais e testículos dos ratos expostos. Entretanto, Rao *et al.*, 2010, descreveram perda de peso corporal e cerebral, quando ratos foram tratados oralmente com $2 \text{ mg}/\text{Kg}$ e $4 \text{ mg}/\text{Kg}$ de HgCl_2 . de Freitas *et al.*, 2009, descreveram que o ganho de peso corporal, do fígado e dos rins de camundongos diminuiu quando expostos 35 dias, via

gavagem, a 2 mg/Kg/dia de MeHg e que o peso do cérebro não foi alterado com o tratamento. Por outro lado, Jin *et al.*, 2009, relataram aumento do peso dos rins em ratos tratados por gavagem, com 0,1 mg/Kg/dia e 3 mg/Kg/dia de MeHg. Komulainen e Tuomisto, 1985, concluíram que ratos tratados por 2 semanas com 50 mg/Kg de MeHg apresentaram peso corporal diminuído, assim como Brandão *et al.*, 2006, relataram que camundongos expostos durante 3 dias, subcutaneamente a 4,6 mg/Kg de HgCl₂, também reduziram o peso corporal. Morgan *et al.*, 2002, estudando a exposição de ratas gestantes à 8 mg/m³ de vapor de mercúrio, verificaram a diminuição do ganho de peso materno e no peso corporal dos neonatos.

Revisando a literatura, a maioria dos relatos encontrados em relação à alterações de peso corporal e dos órgãos dos animais expostos ao mercúrio, parece ser tanto tempo, quanto concentração dependentes e estar relacionada à espécie química da exposição, sendo as principais, o mercúrio orgânico e o mercúrio elementar.

5.2 Avaliação dos parâmetros de pressão arterial

5.2.1 Pressão arterial sistólica (PAS)

Estudos experimentais, assim como relatos de casos clínicos sugerem que a exposição às mais variadas formas de mercúrio, podem levar à hipertensão arterial (Carmignani e Boscolo, 1984; McNeil *et al.*, 1984; Wakita, 1987; Henningsson *et al.*, 1993; Cloarec *et al.*, 1995; Oliveira e Silva, 1996; Boudouin *et al.*, 1997; Velzeboer *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2000; Pelclová *et al.*, 2002; Yorifuji *et al.*, 2010).

Neste estudo, a avaliação da PAS por pletismografia, ou seja, com animais acordados, nas 4 semanas de exposição ao HgCl₂, revelou que os animais do grupo Wistar Hg apresentaram aumento da pressão arterial após 30 dias de tratamento. Resultados semelhantes foram descritos em estudos usando tratamento agudo, como o de Wakita, 1987, no qual o cloreto de metilmercúrio na dose de 0,5 mg/Kg/dia aumentou a pressão sistólica de ratos. Torres *et al.*, 2000, relataram casos clínicos onde duas crianças de 4 e 6 anos, de uma mesma residência, foram intoxicadas com mercúrio elementar e apresentaram hipertensão de 171/123 mmHg e 148/78 mmHg respectivamente. Rossoni *et al.*, 1999, avaliaram os parâmetros

hemodinâmicos e encontraram redução da PAS quando expuseram agudamente, ratos à 5 mg/Kg de HgCl₂.

Dentre os estudos com exposição crônica ao mercúrio, temos o de Carmignani e Boscolo, 1984, no qual ratos submetidos à 50 µg/dia de HgCl₂ na água de beber, por 350 dias apresentaram aumento da PAS. Pelclová *et al.*, 2002, relataram a experiência de um jovem de 21 anos que apresentou sintomas de hipertensão, um mês após, 3 semanas de exposição a um unguento contendo HgNH₂Cl. O estudo de Yorifuji *et al.*, 2010, confirmou a relação causal entre o MeHg e a hipertensão arterial, utilizando dados colhidos de 1971 sobreviventes e habitantes de comunidades vizinhas à região de Minamata (Japão). Entretanto, Grandjean *et al.*, 2004, em um estudo *coort* com 1022 crianças entre 7 anos e 14 anos alimentados com pescados e frutos do mar contaminados com MeHg não encontraram aumento da PAS, tampouco Wiggers *et al.*, 2008a, encontraram aumento da PAS em ratos tratados 30 dias que apresentavam 7,97 ηM de HgCl₂ no sangue. Por outro lado, Fillion *et al.*, 2006, pesquisando 251 pessoas ribeirinhas do Rio Tapajós (Amazônia brasileira), expostas ao MeHg oriundo de práticas agrícolas, encontraram redução da PAS.

O provável mecanismo que leva o mercúrio a produzir hipertensão arterial, como ocorreu neste estudo de exposição crônica, parece ser multifatorial. Neste estudo e no de Wiggers *et al.*, 2008b, foi observado que a exposição crônica ao HgCl₂ foi capaz de aumentar a atividade da enzima conversora de angiotensina plasmática. Uma possibilidade é que, os efeitos pressores do mercúrio tenham relação com a diminuição da concentração circulante de bradicinina e o aumento da produção de angiotensina II. De fato, verificamos que o mercúrio é capaz de estimular a atividade da ECA, o que poderia diminuir a ação vasodilatadora da bradicinina e aumentar a formação de All, favorecendo assim o aumento da pressão arterial. William, em 2008, afirmou que a All, por si, é também capaz de produzir ROS pela ativação dos receptores AT-1 de All e Peçanha *et al.*, 2010, que o aumento da ativação do sistema renina-angiotensina após a exposição cônica ao HgCl₂, parece ter associação com o aumento da atividade da COX-2.

Vários estudos demonstram o envolvimento do mercúrio na indução do estresse oxidativo (Miller e Woods, 1993; Huang *et al.*, 1996; Mahboob *et al.*, 2001; Reus *et al.*, 2003; Kim e Sherma, 2004; Park e Park, 2007; Wolf e Baynes, 2007; Houston, 2007). O óxido nítrico (NO) possui um papel crítico na regulação da

pressão arterial promovendo vasodilatação e diminuição da resistência vascular periférica, excreção renal de água e sódio, inibição central simpática e o remodelamento vascular (Harada *et al.*, 1993; Qiu *et al.*, 1998; Hampl e Herget, 2000). As espécies reativas de oxigênio (ROS) frequentemente oxidam, inativam e/o diminuem a biodisponibilidade de NO (Halliwell, 1997; Wiggers *et al.*, 2008a e 2008b), portanto, o estresse oxidativo pode potencialmente contribuir para a disfunção endotelial e a hipertensão promovida pela inativação do NO, culminando em uma deficiência funcional. Além disso, o estresse oxidativo pode diminuir a produção de NO pelo desacoplamento da eNOS e depleção do co-fator tetrahydrobiopterina. As ROS podem também aumentar a PAS por aumentar a produção de isoprostanóides provenientes da oxidação do ácido aracdônico (Vaziri e Sica, 2004). A ciclooxigenase (COX) é uma enzima que cataliza a conversão do ácido aracdônico em prostanóides. Em vasos sangüíneos saudáveis, a maioria dos prostanóides são formados pela isoforma constitutiva COX-1. Entretanto, este mediador também pode ser formado pela isoforma COX-2, quando induzida por agentes inflamatórios (citocinas e lipopolissacarídeos) capazes de aumentar a sua expressão vascular. Este aumento tem sido associado a condições patológicas como aterosclerose e hipertensão (Adeagbo *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005; Antman *et al.*, 2005).

Sendo assim, concluímos que a exposição á concentrações muito pequenas (nanomolares) e controladas de HgCl₂ são suficientes para se promover aumento da PAS em ratos.

5.2.2 Parâmetros hemodinâmicos

Após 30 dias de exposição ao mercúrio, a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PD2 VE) foi avaliada pelo registro direto com animais anestesiados. A PD2 VE do grupo Wistar Hg estava aumentada quando comparada ao seu respectivo grupo controle. Nenhum outro parâmetro avaliado por esta técnica (PAS, PAD, PSVE, dP/dt + VE, dP/dt - VE, PSVD, PD2 VD, dP/dt + VD, dP/dt - VD e FC), foi diferente.

Na literatura, diferentes achados são encontrados na avaliação dos valores hemodinâmicos associados ao Hg. Carmignani *et al.*, 1989 mostraram um aumento da PAS e no inotropismo cardíaco em ratos submetidos cronicamente, à 50 µg/ml de

HgCl₂ na água de beber por 350 dias. Entretanto, Carmignani *et al.*, 1992, avaliando ratos submetidos à 200 µg/ml de HgCl₂ na água de beber por 180 dias, encontraram aumento da PAS, diminuição do inotropismo cardíaco e nenhuma variação na frequência cardíaca.

Massaroni *et al.*, 1995, em experimento agudo com ratos anestesiados e utilizando concentração de 5 mg/Kg de HgCl₂ encontraram redução da pressão arterial e da frequência cardíaca. Rossoni *et al.*, 1999, observando os efeitos hemodinâmicos de 5 mg/Kg de HgCl₂ *i.v.* em ratos anestesiados, encontraram diminuição da PSVE e aumento das PSVD, PDVE e PDVD e perfundindo o pulmão isolado com 5 µM de HgCl₂, registraram um aumento da resistência vascular pulmonar. Cunha *et al.*, 2001, investigando o tratamento agudo de HgCl₂ em tiras isoladas de VD de ratos, nas concentrações de 0,1 µM à 2,5 µM não observaram mudança na pressão isovolumétrica do VD. A PDVD estava aumentada, porém, o mecanismo de Frank-Starling permaneceu preservado. Houve também, incremento na pressão de perfusão coronariana dos ratos submetidos à concentrações de 0,03 µM à 3 µM de HgCl₂. Machado *et al.*, 2007, encontraram aumento das PS, PD e da FC em ratos tratados agudamente com 680 ng/Kg de HgCl₂.

O mercúrio é capaz de inibir a Ca⁺²-ATPase (Ahammad-Sahib *et al.*, 1988; Reddy *et al.*, 1988; Hechtenberg e Beyersmann 1991), reduzir a hidrólise de ATP (Oliveira *et al.*, 1994a) e inibir a Na⁺K⁺-ATPase em muitos tecidos (Magour *et al.*, 1987; Ahammad-Sahib *et al.*, 1988; Rajanna *et al.*, 1990; Anner *et al.*, 1992; Wang e Horisberger, 1996). A inibição da bomba de Na⁺ faz aumentar o sódio intracelular, o qual reduz a atividade do trocador Na⁺/Ca⁺². Logo, o efluxo de Ca⁺² também diminui, favorecendo o aumento da concentração intracelular de Ca⁺². O mercúrio atuando na redução da atividade da Ca⁺²-ATPase sarcolemal (SERCA) reduz a recaptação do Ca⁺² citoplasmático e favorece a permanência deste íon no citoplasma (Hechtenberg e Beyersmann 1991). Assim, a PD2 VE aumentada, encontrada neste estudo, possivelmente seja resultado do *overload* de cálcio que prejudica o relaxamento e o enchimento cardíaco durante a diástole (Rossoni *et al.*, 1999).

O fato da PAS ter sido avaliada por duas técnicas diferentes, pode ser a causa de resultados diferentes deste parâmetro neste estudo. Na técnica do registro direto, os animais foram anestesiados com uretana, a qual produz uma condição de anestesia caracterizada por pequena diminuição da atividade do sistema nervoso autônomo e produz depressão tanto nas respostas pressoras quanto depressoras

decorrentes do estímulo do sistema nervoso central (Maggi e Meli, 1986). Na técnica da pletismografia, a medida da PAS foi realizada com os animais acordados e sem a interferência do anestésico que poderia, por si só, diminuir a PA.

5.3 Avaliação histológica

A avaliação qualitativa feita nos órgãos (pulmões, coração, aorta, cérebro e rins) através da análise morfológica, após 30 dias de exposição ao HgCl₂ 20 ηM, não indicaram alterações entre os animais Wistar Hg vs Wistar CT e SHR Hg vs SHR CT. Porém, vale ressaltar, que na avaliação dos animais Wistar Hg foi observado hipertrofia da parede de ramos da artéria pulmonar, em 2 dos 5 animais avaliados. Ainda que neste estudo, não tenha sido observado diferenças, existem na literatura, estudos com concentrações maiores e/ou formas químicas diferentes, que demonstram alterações histológicas provocadas pela exposição ao mercúrio.

Pathak e Bhowmik, 1998, investigaram as ações tóxicas do HgCl₂ (100 µg/ml) oferecido à cabras por 90 dias em água de beber, e encontraram alterações morfológicas nos rins como nefrose e nefrite tubular, no fígado, como necrose centrilobular, necrose no baço, intestino e linfonodo, degeneração de Zenker no músculo cardíaco, pneumonia, congestão, edema e vacuolação no cérebro. Além disso, foram encontrados sinais de edema e hemorragia em praticamente todos os órgãos por eles estudados. Hall *et al.*, 1986, utilizaram em ratos, injeções subcutâneas semanais contendo 1,25 mg/Kg a 2 mg/Kg de HgCl₂ por 21 semanas e observaram ao microscópio óptico, lesões renais tubulares, intersticiais e glomerulares. Carmichael e Fowler, 1979, estudando ratos expostos ao HgCl₂ na água de beber administrada por 22 semanas, encontraram lesões ultraestruturais e histopatológicas como degeneração gordurosa periportal e necrose celular no fígado e necrose tubular com aspecto proteináceo nos rins. Carmignani *et al.*, 1992, investigaram ratos que receberam 200 µg/ml de HgCl₂ em água de beber por 180 dias e encontraram 80 % de glomerulonefrite nos glomérulos estudados. Tryphonas e Nielsen, 1970, estudando histologicamente porcos intoxicados com pastilhas contendo 2,28 mg/Kg/dia a 4,56 mg/Kg/dia de cloreto de fenilmercúrio por 90 dias, observaram edema contendo infiltrado inflamatório com exsudato de fibrina e hiperemia e necrose na mucosa intestinal. No fígado, observaram degeneração

hidrópica difusa e necrose e nos rins, calcificação de células epiteliais e necrose tubular. O cérebro não foi afetado histologicamente pelo tratamento.

Eto *et al.*, 1997, investigando em ratos, as ações de 5 ppm de MeHg na comida por 6 dias consecutivos e sacrificados 1 ano após, encontram fibrose nos glomérulos renais e nenhuma alteração cerebral. Brake *et al.*, 1977, expuseram galinhas à 12 mg/Hg/Kg intramuscularmente por 5 dias consecutivos. Observações histológicas cardíacas, revelaram miocardite com infiltrado polimorfonuclear e linfocítico, assim como a presença de degeneração gordurosa.

Morgan *et al.*, 2002, estudando os efeitos do vapor de mercúrio (8 mg/Hg⁰/m³) em ratas por 2 horas/dia nos dias 6 e 15 da gestação não encontraram nenhuma evidência histopatológica nos pulmões, rins ou fígado maternos.

Asano *et al.*, 2000, avaliaram os rins, pulmões e fígado de ratos expostos a 1 mg/m³ - 2 mg/m³, de vapor de mercúrio. Duas horas após a exposição, alterações histológicas pulmonares apareceram na forma de bronquite e pneumonite com formação de membrana hialina e extensiva fibrose pulmonar e os rins apresentaram necrose tubular. Augusti *et al.*, 2008, avaliaram as alterações histológicas ocorridas 12 horas após ratos serem submetidos a injeções contendo 5 mg/Kg de HgCl₂ e encontraram significativa necrose tubular renal. Jaeger *et al.*, 1983, observaram ratos expostos à 6 mg/Hg/m³ de vapor de mercúrio entre 120 min e 240 min. Exames microscópicos revelaram pulmões com edema rico em fibrina, necrose epitelial, presença de membrana hialina e fibrose intersticial. Gajkowska *et al.*, 1992, utilizando 6 mg/Kg de HgCl₂ em injeção única intraperitoneal, encontraram mudanças microscópicas no córtex cerebral de ratos. Golpon *et al.*, 2003, analisando segmentos de artéria aorta de ratos, submetidas agudamente a 10⁻⁷ M de HgCl₂ detectaram alterações nas células endoteliais da membrana basal.

Os resultados encontrados na literatura sugerem que a intensidade das alterações citotóxicas normalmente são proporcionais ao acúmulo de resíduo mercurial nos órgãos (Pathak e Bhowmik, 1998) e que, o grau de anormalidade estrutural nem sempre reflete o nível de disfunção, e pode ser difícil, a partir do exame morfológico, diferenciar um órgão lesado, porém compensado daquele descompensado (Cotran *et al.*, 2000). No presente estudo, não foram encontradas alterações morfológicas nos órgãos estudados, possivelmente porque a exposição crônica ao mercúrio inorgânico, foi feita em concentrações bem menores (nanomolares) do que as encontradas na literatura (crônicas e agudas). Entretanto,

podemos afirmar que, mesmo na ausência de alterações morfológicas, as alterações funcionais tais como as modificações nas pressões arterial e ventricular esquerda, assim como da atividade da ECA e do estresse oxidativo, já ocorrem, mostrando que baixíssimas doses de mercúrio já promovem citotoxicidade.

5.4 Avaliação hematológica

A contagem relativa das células sangüíneas dos animais expostos ao HgCl_2 revelou aumento de neutrófilos e diminuição de linfócitos dos ratos Wistar Hg quando comparados com seus controles. Porém, a contagem total de leucócitos não foi diferente.

Evidências indicam que a exposição crônica à baixas doses de mercúrio, resulta em disfunção imunológica (Clarkson, 1997; Pollard e Hultman, 1997), onde o mercúrio se comporta como um gatilho para doenças imunológicas e infecções crônicas (Silbergeld *et al.*, 1998). Relatos confirmam que a exposição tanto à forma orgânica quanto à inorgânica de mercúrio, levam a episódios alérgicos e doenças autoimunes (Lawrence, 1981; Dieter *et al.*, 1983; Warfvinge e Larsson, 1994; Stejskal *et al.*, 1996; Thuvander *et al.*, 1996; Dantas e Queiroz, 1997).

Brandão *et al.*, 2008, em seus estudos, encontraram redução de leucócitos circulantes em camundongos tratados com mercúrio por 2 semanas e especularam se esta redução não seria consequência da migração destas células para sítios afetados como os rins, já que elas possuem uma importante função de defesa e existem dados confirmando este aumento celular nestes sítios (Girardi *et al.*, 1996).

Day *et al.*, 2007, correlacionaram positivamente a redução do número de linfócitos circulantes à concentração de Hg no sangue de tartarugas que vivem em ambientes exposto ao MeHg. Zheng e Monestier, 2003, observaram que o HgCl_2 (30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ PBS) injetado *s.c.* 3 vezes por semana, durante 28 dias, induziu à proliferação de linfócitos e anticorpos em camundongos. Entretanto, Shenker *et al.*, 1992 e 1993, demonstraram que quando linfócitos humanos são tratados com mercúrio orgânico e inorgânico, ocorre uma diminuição da capacidade proliferativa, da produção de citocinas e da secreção de imunoglobulinas. InSug *et al.*, 1997, estudaram a ação do MeHgCl e concluíram que a ação tóxica do mercúrio era capaz de inibir a função dos monócitos humanos pela indução apoptótica através da formação de ROS, permeabilidade de membrana e perda da reserva redutiva.

Os leucócitos (linfócitos e monócitos) expostos ao tratamento com mercúrio exibem sinais morfológicos e funcionais de morte celular, que incluem a síntese de fosfolípidos alteradas e elevação do cálcio intracelular apresentando mudanças nucleares e na membrana (Shenker *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1998). O processo apoptótico é regulado por diferentes estágios (Vaux e Strasser, 1996; Kroemer *et al.*, 1997; Green, 1998) e tem sido notado precocemente nas vias mediadas pela disfunção mitocondrial. O HgCl₂ e o MeHg afetam a atividade da mitocôndria por induzir uma permeabilidade transitória da membrana dos linfócitos. Este estado é caracterizado pelo declínio do potencial transmembrana e do pH intracelular, bem como pela geração de ROS e consequente diminuição do conteúdo de glutatona intracelular. Além disso, a disfunção mitocondrial e o desenvolvimento de uma permeabilidade transitória podem resultar na liberação do citocromo c para o citoplasma, fator este, pró-apoptótico existente na membrana mitocondrial (Shenker *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1998).

Brandão *et al.*, 2008, verificaram aumento na porcentagem de neutrófilos circulantes em camundongos tratados com mercúrio por duas semanas, e que isto indicaria a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo HgCl₂ (1 mg/Kg/dia). Moisan *et al.*, demonstraram em 2002, que baixas concentrações de mercúrio orgânico e inorgânico (1 µM - 7,5 µM), protegem os neutrófilos (células polimorfonucleares) da morte celular via inibição de apoptoses espontâneas e que os neutrófilos são mais resistentes que as células mononucleares à citotoxicidade mercúrio-induzida. O retardo apoptótico associado ao aumento da resistência celular à toxicidade-induzida, pode levar a um acúmulo excessivo de neutrófilos senescentes, podendo ter implicações na ativação da autoimunidade e processos inflamatórios inerentes ao mercúrio.

O achados descritos acima, ainda que utilizando doses maiores de HgCl₂ tanto crônico quanto agudamente, corroboram os resultados encontrados neste estudo a respeito do aumento percentual de neutrófilos e diminuição percentual de linfócitos apresentado pelo grupo Wistar Hg. Apesar da diminuição da percentual de monócitos não ter sido significativa, houve claramente uma tendência do resultado, neste sentido no grupo Wistar Hg.

No presente estudo ocorreu um aumento do número de plaquetas (trombocitose) no grupo Wistar Hg quando comparado ao grupo Wistar CT. Lee *et al.*, 1998, citando Odell *et al.*, 1964, declararam que a trombocitose está comumente

associada a diversos processos inflamatórios e infecciosos agudos e crônicos e que uma inflamação experimentalmente induzida produz trombocitose em animais, mas que o mecanismo pelo qual ocorria esse fenômeno ainda não havia sido devidamente esclarecido. A trombocitose, assim como o mercúrio, também foi associada a distúrbios inflamatórios no fígado, intestino (Marchasin *et al.*, 1964; Marcus e Zucker, 1965) e doença renal crônica (Gilchrist *et al.*, 1968). Assim, poderíamos supor que esta pequena dose de mercúrio administrada cronicamente nos ratos Wistar poderia induzir uma resposta inflamatória.

Os achados na literatura abordam principalmente a interação do Hg com alterações na atividade plaquetária. Segundo Kostka, 1990, os compostos mercuriais têm alto poder de potencializar a agregação plaquetária ADP-induzida, fato este, corroborado por Salonen *et al.*, 1991, sobre a peroxidação lipídica induzida pelo Hg ser capaz de promover a atividade plaquetária. Wierzbicki *et al.*, 2002, relataram que a exposição ocupacional ao vapor de mercúrio aumentou muitos parâmetros relacionados a coagulação sanguínea. Kumar, 2000, tem demonstrado que metais pesados como o mercúrio, aumentam a agregação plaquetária por estimular a atividade da fosfodiesterase e inibir a adenilato ciclase, reduzindo assim, o nível de AMPc. Entretanto, Chaudhury *et al.*, 1996, verificaram que o Hg⁺² *in vivo* e *in vitro* foi capaz de causar inibição dose-dependente na agregação plaquetária de ratos.

Em relação ao conteúdo plaquetário, Brandão *et al.*, 2008, usando HgCl₂ (1 mg/Kg/dia), injetado subcutaneamente, em camundongos, por 2 semanas, concluíram que o tratamento causou redução no conteúdo plaquetário, ao contrário dos nossos achados. Há de se considerar entretanto, vários aspectos do presente estudo que se diferenciam, como o modelo animal empregado, a via de administração, dose de mercúrio bem menor e um tempo mais prolongado de exposição.

5.5 Avaliação do perfil bioquímico

O resultado da avaliação do perfil bioquímico após 30 dias de tratamento com HgCl₂, indicou aumento da glicemia e diminuição de globulina plasmática do grupo Wistar Hg quando comparado ao grupo Wistar CT. Nenhum outro parâmetro avaliado foi diferente.

Varghese *et al.*, 1992 estudaram caranguejos expostos 24 h, 48 h, 72 h e 96 h ao HgCl_2 e concluíram que com 48 h, foi observada elevação máxima da glicemia e do estresse oxidativo. Ezaki, 1989 mostrou que, agudamente, o HgCl_2 (100 μM) foi capaz de estimular o transporte de glicose em adipócitos primários de ratos e que concentrações mais altas de Hg eram capazes de inibir o transporte de glicose insulino-dependente. Já Barnes *et al.*, 2003 e 2005, verificaram que a exposição aguda ao HgCl_2 (1 μM a 10 μM) diminui o transporte de glicose insulino-dependente, sendo um fator contribuinte para a resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo II.

Concentrações de HgCl_2 e MeHg (0,2 μM à 1 μM) são capazes de disparar a produção das ROS e diminuir a secreção de insulina pelas células pancreáticas de camundongos. A diminuição da insulina plasmática faz disparar um aumento na glicose sangüínea e na peroxidação lipídica plasmática, assim como, uma intolerância à glicose. Estes resultados indicam que o estresse oxidativo está envolvido no mecanismo tóxico do mercúrio ao induzir hipoinsulinemia e hiperglicemia (Chen *et al.*, 2006). Embora neste estudo não tenha sido avaliado os mecanismos causadores da elevação da glicemia no grupo tratado com HgCl_2 , os resultados acima expostos, ainda que em concentrações maiores, poderiam ajudar a explicar este fato. É possível então, que o mercúrio possa, através da elevação da glicemia, promover elevação das ROS nos ratos do grupo Wistar

Em relação à diminuição da globulina sérica no grupo Wistar Hg é interessante notar que as globulinas são proteínas que incluem as α , β , e γ globulinas e uma variedade de enzimas e proteínas transportadoras. A γ -globulina costuma ser a mais abundante das globulinas e a deficiência de anticorpos pode aparecer quando o nível de globulina está baixo (Kaslow, 2010).

O plasma e o fígado estão envolvidos na produção destas proteínas e estados de nefrose e de disfunção hepática, podem ser causas da diminuição do conteúdo de globulina sérica (Kaslow, 2010). Como já foi descrito anteriormente, estes estados patológicos são verificados na intoxicação por mercúrio (Carmichael e Fowler, 1979; Hall *et al.*, 1986; Carmignani *et al.*, 1992; Pathak e Bhowmik, 1998). No entanto, no presente estudo, não foi detectada qualquer alteração morfológica renal nos animais tratados com mercúrio que pudesse justificar este aumento da globulina e tampouco foi feita qualquer avaliação funcional hepática para associar à este resultado.

5.6 Avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma e nos órgãos

O efeito tóxico exercido pelo mercúrio está relacionado entre outros fatores, ao aumento do estresse oxidativo (Valko *et al.*, 2006), aumento da peroxidação lipídica (Salonen *et al.*, 1995), alteração nas atividades enzimáticas (Gonzalvo *et al.*, 1997; Jie *et al.*, 2007) e alterações no sistema renina-angiotensina (Kozma *et al.*, 1996; Wiggers *et al.*, 2008b).

O mercúrio é capaz de induzir a liberação de renina pelas células justo-glomerulares *in vitro* (Kozma *et al.*, 1996) e aumentar os níveis de renina plasmática em ratos tratados com HgCl₂ que desenvolveram insuficiência renal aguda (Bidani *et al.*, 1980). Baehler *et al.*, 1977, observaram aumento da renina plasmática em cães, 48 horas após tratamento com HgCl₂ (2 mg/Kg). Achados prévios de nosso laboratório sugerem que a administração aguda de mercúrio, exerce efeito sobre enzimas como a ativação da colinesterase plasmática (Rossoni *et al.*, 1999). Em relação à atividade da ECA, pouco se sabe sobre a interação crônica ou aguda do mercúrio com esta enzima. Wiggers *et al.*, 2008b investigando o efeito agudo do HgCl₂ *in vitro*, observaram que concentrações de 1 nM, 10 nM e 10 µM estimularam a atividade da ECA plasmática e que com 100 µM esta atividade passava a diminuir, ainda que continuasse um pouco maior que o controle.

No presente estudo, quando comparados os grupos Wistar Hg vs Wistar CT, a atividade da ECA foi maior no plasma e no coração dos animais tratados por 30 dias com doses nanomolares mercúrio, não havendo alteração na atividade desta enzima na aorta, pulmões, cérebro e rins. Neste sentido, poderíamos sugerir, que diferentes mecanismos estariam implicados na variação dos resultados para a atividade da ECA. Segundo Atlas, 2007, a ECA é uma enzima de membrana e está localizada na membrana plasmática de vários tipos celulares, incluindo células endoteliais vasculares, células renais do túbulo proximal e células neuroepiteliais. É esta ECA localizada nas membranas que parece ser fisiologicamente importante. A ECA também existe em uma forma solúvel no plasma, mas esta forma, parece ser simplesmente um reflexo da circulação e do *clearance* da ECA de membrana. Sendo assim, poderíamos supor que, a maior atividade da ECA plasmática encontrada no grupo Wistar Hg poderia ser reflexo da maior atividade da ECA cardíaca, nos animais deste grupo.

Mecanismos também sugeridos para a atuação do mercúrio sobre a ECA seriam a de que em baixas concentrações, o Hg exerceria um papel estimulador da atividade enzimática através de reações químicas de transmetalção (Artigão, 1984), haveria aumento na produção de All e conseqüentemente, aumento do estresse oxidativo por induzir produção de ROS. Por outro lado, em altas concentrações, provavelmente inibiria a ECA. O Hg^{+2} em baixas concentrações agiria como um estimulador e em altas concentrações, como um inibidor. Ambas as situações ocorreriam, pelo Hg afetar o íon requerido para sua atividade. A reação de transmetalção, seria presumivelmente uma troca do Hg^{+2} com o íon metal que ocorre naturalmente na enzima (Zn^{+2}), sendo a ECA uma metaloenzima (Cushman e Cheung, 1971). Outra hipótese para a inibição ECA seria que a toxicidade de altas concentrações de Hg estaria relacionada com a sua ligação covalente ao radical sulfidril, que constitui sítio ativo da enzima.

Estas hipóteses para o mercúrio, estão baseadas em um fenômeno chamado hormese, e trabalhos como o de Calabrese e Baldwin, 2003, corroboram neste sentido, indicando que a relação de dose-resposta de várias formas de mercúrio inorgânico poderia ser bifásica (estimulação em baixa dose e inibição em alta dose).

5.7 Medida da produção de malondialdeído (MDA) no plasma e nos órgãos

O papel da peroxidação lipídica nas doenças cardiovasculares tem sido confirmado em pesquisas básicas (Halliwell e Gutteridge, 1989; Witztum, 1994; Navab *et al.*, 1996; Heinecke, 1998) e estudos epidemiológicos (Salonen *et al.*, 1992 e 1998; Salonen *et al.*, 1997). No corpo humano, ela é regulada pelos radicais livres provenientes do estresse oxidativo, da disponibilidade de metais catalíticos pró-oxidativos e dos sistemas de defesa anti-oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1989; Witztum, 1994; Navab *et al.*, 1996; Heinecke, 1998; Salonen, 1998). O mercúrio é um destes metais capaz de promover a peroxidação lipídica (Salonen *et al.*, 2000).

Os radicais livres reagem com ácidos poliinsaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados, os quais sofrem redução da sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados. Como um sistema gerador de radicais livres, a peroxidação lipídica tem sido intimamente

relacionada com a toxicidade induzida pelo mercúrio e o MDA, sugerido como um bom indicador do grau de peroxidação lipídica (Tunali-Akbay *et al.*, 2007).

Huang *et al.*, 1996, estudando os efeitos agudos, da administração parenteral (entre 3 horas e 48 horas) de HgCl₂ (5 mg/Kg/dia) verificaram em ratos, um aumento nos níveis de MDA no fígado, rins, pulmões, testículos e plasma, porém, não encontraram diferença nos níveis de MDA no coração, baço e músculo. Lund *et al.*, 1993, demonstraram que a administração do HgCl₂ (1,5 mg/Kg ou 2,25 mg/Kg) em ratos resultou em aumento da peroxidação lipídica das mitocôndrias renais. Já a exposição de camundongos ao mercúrio, resultou em aumento da produção de MDA no fígado e nos rins (Rungby e Ernst, 1992).

Kobal *et al.*, 2004, observaram aumento do MDA na urina de mineiros expostos por longo tempo ao mercúrio. Addya *et al.*, 1986, observaram em ratos, que a administração oral de HgCl₂ (5 mg/Kg/dia) por 15 dias foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos de glutathione peroxidase (GSH-P). Hijova *et al.*, 2005, relataram em seus estudos, que o mercúrio é um indutor de estresse oxidativo no plasma de ratos e que o prejuízo causado pelo HgCl₂ (37 mg/Kg) por 30 dias em água de beber, é proveniente do aumento da formação de MDA. Porém, em concentrações menores de mercúrio, o nível de MDA foi menor que o do controle. Su *et al.*, 2008, encontraram aumento da produção de MDA no fígado e nenhuma diferença renal e no hipocampo dos ratos tratados oralmente com HgCl₂ (1,2 mg/Kg/dia) por 50 dias, após o nascimento. de Freitas *et al.*, 2009, notaram aumento do MDA no rins, fígado, cérebro e cerebelo de ratos submetidos por 35 dias, à 2 mg/Kg de MeHg via gavagem. Moszczyński, 2006, declarou que o mercúrio estimulava a produção de radicais livres pela ligação com radicais sulfidril das enzimas e formava complexos insolúveis com o selênio, logo, o mercúrio era capaz de induzir a peroxidação lipídica e aumentar a concentração sangüínea das lipoproteínas de baixo peso molecular.

Com o intuito de verificar se o estado oxidante (estresse oxidativo) é alterado pelo tratamento de 30 dias à baixa dosagem de HgCl₂, foram realizadas medidas da produção do MDA no plasma, coração, aorta, rins, cérebro e pulmões.

Foi observado neste trabalho, que os níveis plasmático e cardíaco de MDA estão aumentados nos animais do grupo Wistar Hg quando comparado ao seu grupo controle. Nos pulmões, aorta e cérebro este aumento não foi significativo, enquanto nos rins houve diminuição deste parâmetro. Considerando que, o SRA tem relação direta com a produção de ROS, estes achados para o MDA vão ao encontro dos

resultados encontrados para a atividade da ECA nestes sítios, exceto nos rins, onde os níveis de MDA encontrados, foram menores no grupo Wistar Hg que no grupo Wistar CT, e a atividade da ECA, ainda que menor nos animais tratados com mercúrio, não foi significante dos animais controle

Estes resultados sugerem, em conjunto, que doses nanomolares de mercúrio, pelo menos em parte, possam estar realmente estimulando o estresse oxidativo dependente da ativação do SRA. Este fato é corroborado pelo aumento simultâneo da atividade da ECA e da produção de MDA no coração e no plasma. Entretanto, não se sabe ainda, o mecanismo pelo qual o mercúrio estaria atuando nestas doses baixíssimas, e especificamente nestes órgãos. A princípio, poderíamos supor, ser estas diferenças de resposta nos órgãos estudados apenas um efeito dose dependente. Wiggers *et al.*, 2008a e 2008b observaram que a exposição à baixas concentrações de mercúrio promove aumento do estresse oxidativo com a participação da ECA e conseqüentemente, da angiotensina II e, Berry *et al.*, 2001a, observaram que a concentração de ROS estava diminuída em pacientes tratados com inibidores da ECA. Observaram também, que pelo menos outros três mecanismos estão envolvidos na peroxidação lipídica promovida pelo mercúrio. Primeiro, o mercúrio é um metal de transição, podendo agir como um catalisador nas reações do tipo Fenton, resultando na formação de radicais livres (Ganther, 1980) *in vitro* (Halliwell e Gutteridge, 1989; Miller *et al.*, 1991; Jansson e Harms-Ringdahl, 1993) e *in vivo* (Lund *et al.*, 1993). Segundo, o mercúrio tem uma grande afinidade pelos radicais sulfidril (WHO, 1990). Pela ligação com estes grupos, o mercúrio inativa componentes tíois anti-oxidativos como a glutathione, superóxido dismutase e catalase (Naganuma *et al.*, 1980; Benov *et al.*, 1990) e terceiro, o mercúrio forma um complexo insolúvel com o selênio, o seleneto de mercúrio (Civin-Aralar e Furness, 1991), impedindo-o de agir como co-fator para a glutathione peroxidase, um importante varredor do peróxido de hidrogênio e peróxidos de lipídeos. Estes mecanismos, reduzem a capacidade anti-oxidativa e promovem o estresse oxidativo pelos radicais livres e peroxidação lipídica nas membranas celulares e lipoproteínas (Salonen *et al.*, 1995).

5.8 Avaliação da citotoxicidade do HgCl₂ em células musculares lisas de aorta de ratos Wistar

Experimentos prévios de nosso grupo de pesquisa, indicaram que em segmentos de artérias aortas de ratos Wistar tratados 30 dias com 20 η M de HgCl₂ houve diminuição da espessura da parede. Tentando esclarecer se esta alteração teria relação com o número celular do tecido aórtico dos ratos tratados, avaliamos a citotoxicidade por 24 horas, de diferentes concentrações de HgCl₂ sobre o cultivo de células musculares lisas aórticas. As concentrações de mercúrio estudadas foram maiores por serem agudos estes experimentos.

Foi encontrado que, o HgCl₂ nas doses de 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M, através da coloração de Hoechst e microscopia confocal, produz condensação da cromatina, indicando dano irreversível nas células musculares lisas de aorta de ratos Wistar, sugerindo assim, que a diminuição da parede das aortas dos ratos tratados com mercúrio poderia ser devido à redução do número de células por morte celular. Isto seria apenas uma hipótese, já que as doses de HgCl₂ utilizadas para avaliar a citotoxicidade de HgCl₂, foram da ordem micromolar.

Corroborando estes dados, Woods *et al.*, 2002, observaram que o Hg⁺² aumenta a sensibilidade do estímulo apoptótico em células renais. Foi observado que baixas concentrações de HgCl₂ (1 μ M e 10 μ M) induzem apoptose por inibir a função mitocondrial em cultivo de células OK do rim (Carranza-Rosales, 2005). Diferentes vias de citotoxicidade induzidas pelo mercúrio em linfócitos B e T sugerem o envolvimento de ROS, homeostase de Ca⁺² e a expressão gênica de citocinas inflamatórias (Kim e Sharma, 2003). Estudos vêm sendo realizados para identificar o processo pelo qual o mercúrio induz apoptose. O aumento do estresse oxidativo foi apontado como crítico na ativação de vias de sinalização de morte celular. Adicionalmente, o mercúrio induz respostas celulares associadas à apoptose por promover alterações na expressão gênica de sobrevivência e morte celular (Shenker *et al.*, 2002), inibir a atividade NFkB (Woods *et al.*, 2002) e por regular a ativação de caspase mediada pela p38 (Kim e Sharma, 2004).

5.9 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Na literatura, são raras as pesquisas relacionando este modelo animal experimental com a contaminação por mercúrio. A utilização dos SHR neste estudo,

foi uma oportunidade de examinar, em um modelo espontaneamente hipertenso, o comportamento das propriedades cardiovasculares quando submetidas à contaminação crônica nanomolar de HgCl₂. Aqui, foram observadas algumas alterações imunológicas, enzimáticas e oxidativas nos animais expostos ao Hg quando comparados ao seu grupo controle, porém, nenhuma diferença foi encontrada nas avaliações ponderal, hemodinâmica, morfológica e bioquímica.

Os animais do grupo SHR Hg apresentaram, na contagem das células sanguíneas, uma % de neutrófilos diminuída e uma % de linfócitos aumentada quando comparado ao grupo SHR CT, sem alteração na contagem total de leucócitos. A atividade da ECA estava aumentada no plasma e diminuída nos demais órgãos após 30 dias de tratamento e a produção de MDA, aumentada no coração e aorta, diminuída nos pulmões, cérebro e rins e inalterada no plasma dos ratos do grupo SHR Hg quando comparados aos do grupo SHR CT.

Muitos fatores têm sido propostos como causa do aumento da resistência arteriolar na etiologia da hipertensão do modelo SHR: diminuição na disponibilidade de NO vascular (Berry *et al.*, 2001b), hipertrofia medial do músculo liso, rarefação vascular, elevação do tônus em artérias de resistência, atividade simpática aumentada, diferenças na disposição e sensibilidade do transmissor de catecolaminas das células musculares lisas, diferenças na regulação vascular central (Suzuki *et al.*, 1998) e alterações no fluxo de Ca⁺² e na atividade da bomba-Na⁺K⁺ (Swamy e Triggle, 1980). A produção de ROS também é um dos mecanismos relatados, como causadores de injúria nos órgãos humanos e de animais com hipertensão (Berry *et al.*, 2001b; DeLano *et al.*, 2005). Afirmação corroborada por pesquisadores que têm observado que a hipertensão do modelo SHR está relacionada ao aumento da produção vascular de ROS e que esta, é a chave do mecanismo que leva prejuízo e formação de lesões aos órgãos de hipertensos (Suzuki *et al.*, 1998; McIntyre *et al.*, 1999).

Anner *et al.*, 1995, relataram que o tratamento com mercúrio nos animais SHR não produziu nenhuma mudança funcional nas Na⁺K⁺-ATPases cerebral e renal em comparação com ratos normotensos, ainda que severas alterações estruturais fossem observadas neste sistema de transporte.

Podemos supor que, a exposição ao mercúrio produz neste modelo experimental, toxicidade semelhante às encontradas nos ratos normotensos (Wistar) e a maioria envolve o aumento do estresse oxidativo. Porém, levando-se em

consideração que o músculo liso vascular dos SHR, difere intrinsicamente dos ratos normotensos (Swamy e Triggle, 1980), e como foi visto, muitas das alterações mediadas pelo Hg, passam pelo músculo liso vascular, poderíamos especular, ser esta uma das causas das diferenças encontradas nos resultados entre os animais Wistar e SHR expostos, ainda que não tenha sido o propósito deste estudo, a comparação entre os dois modelos experimentais.

Em muitos órgãos, o tratamento nanomolar com mercúrio não alterou os parâmetros avaliados e ainda, algumas vezes diminuiu estes valores cujo o esperado seria o contrário, baseando-se nos achados com os animais normotensos. Hipotetizamos que os valores de ECA e MDA já estejam tão elevados pela própria sobrecarga pressórica e alterações intrínsecas ao modelo SHR, que um processo de *feed-back* negativo esteja atuando como um mecanismo compensatório. Já os parâmetros elevados encontrados, seriam porque estas adaptações tardariam mais a acontecer, como é o caso da do aumento da ECA plasmática e dos valores de MDA no coração e aorta.

5.10 Significado do estudo

Vem aumentando a cada dia, o número de pesquisas feitas para investigar os efeitos deletérios da exposição ao mercúrio e sua associação com o risco de doenças cardiovasculares, e que levam em consideração, os possíveis mecanismos que suportam esta associação. Os resultados obtidos neste estudo, nos permite discutir se a concentração plasmática de mercúrio presente no modelo animal experimental, compatível às encontradas em seres humanos expostos, representa de fato algum risco para saúde. A exposição crônica ao mercúrio e em baixíssima concentração, interferiu na atividade da enzima conversora de angiotensina e na produção de radicais livres. Também alterou valores glicêmicos, plaquetários e imunológicos. Com o estresse oxidativo aumentado e possivelmente diminuindo a biodisponibilidade de óxido nítrico, encontramos aumento da pressão arterial sistólica e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo após o tratamento, nos dando uma idéia de que, os resultados isolados ou interligados, podem contribuir para o entendimento das várias patologias relacionadas à contaminação com o metal. Muitos estudos e em diferentes populações ainda são necessários para encontrar possíveis fatores que possam interferir nos efeitos tóxicos do mercúrio e

principalmente, se o considerarmos um fator agregante de risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

"É preciso refletir na necessidade de um futuro com menor exposição ao mercúrio. Ninguém que vive hoje, está livre de algum nível de contaminação. A Organização Mundial de Saúde, ainda que determine níveis aceitáveis de contaminação, afirma que não existe nível totalmente seguro. Portanto, não agir em relação ao desafio global do mercúrio já deixou de ser uma opção possível" (Folha de São Paulo, 15/02/2009).

CONCLUSÃO

VI CONCLUSÃO

Em conclusão, na avaliação dos efeitos de 30 dias de exposição à baixas concentrações de cloreto de mercúrio (20 η M) sobre o sistema cardiovascular de ratos Wistar e SHR, foi observado que parâmetros importantes foram afetados e que esta exposição representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares nos animais normotensos (Wistar) e um fator agregante aos riscos pré-existentes nos animais hipertensos (SHR).

Com este tratamento, verificamos que:

- os dados ponderais de ratos Wistar e SHR não apresentaram diferença, nem no peso corporal e nem no peso dos órgãos;

- as PAS e PD2 VE dos ratos Wistar aumentaram e nos ratos SHR estes parâmetros não foram modificados;

- na análise histológica qualitativa, nenhuma diferença significativa foi encontrada no coração, aorta, pulmões, cérebro e rins quando comparados os grupos Wistar Hg vs Wistar CT, e SHR Hg vs SHR CT.

- na avaliação hematológica, os ratos Wistar apresentaram o conteúdo plaquetário e a % de neutrófilos aumentados e a % de linfócitos diminuída e os ratos SHR, apresentaram a % de neutrófilos diminuída e a % de linfócitos aumentada;

- na avaliação bioquímica, os ratos Wistar apresentaram valor de glicose aumentado e de globulina diminuído, não sendo diferente estes valores nos ratos SHR;

- a atividade da ECA no plasma e no coração dos ratos Wistar estavam aumentadas e nos ratos SHR, esta atividade estava aumentada no plasma e diminuída nos rins, pulmões, coração, cérebro e aorta;

- a produção de MDA no plasma e no coração dos ratos Wistar estavam aumentadas e diminuída nos rins. Nos ratos SHR, esta produção estava aumentada no coração e na aorta e diminuída nos rins, pulmões e cérebro;

Também foi encontrado que o HgCl_2 nas doses de 5 μM , 10 μM , 50 μM e 100 μM , produz condensação da cromatina, indicando dano irreversível nas células musculares lisas de aorta de ratos Wistar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abram, Z; Korossy, S. Presynaptic and postsynaptic effects of mercuric ions on guinea-pig ileum longitudinal muscle strip preparation. *Neurochem Res.* 19 (12): 1467-1472, 1994.

Addya, S; Chakravarti, K; Das, M; Ghosh, N; Chakravarti, D; Chatterjee, GC. Effects of mercuric chloride antioxidant defense components of rat erythrocyte and plasma: influence of vitamin E supplementation. *Indian J Exp Biol.* 24 (7): 468-470, 1986.

Adeagbo, AS; Zhang, X; Patel, D; Joshua, IG; Wang, Y; Sun, X; Igbo, IN; Oriowo, MA. Cyclo-oxygenase-2 endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 115: 1025-1036, 2005.

Agarwa, I R; Goel, SK; Behari, JR. Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *J Appl Toxicol.* [Epub ahead of print], 2010.

Ahammad-Sahib, KI; Moorthy, KS; Cameron, JA; Desai, D. Isoproterenol potentiation of methyl mercury effects in vivo on cardiac ATPases and 3H-dopamine uptake. *Bull Environ Contam Toxicol.* 40: 249-254, 1988.

Albrecht, J; Szumanska, G; Gadamski, R; Gajkowska, B. Changes of activity and ultrastructural localization of alkaline phosphatase in cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride. *Neurotoxicology.* 15 (4): 897-902, 1994.

Alvarez, Y; Briones, AM; Balfagón, G; Alonso, MJ. Salaices, M. Hipertensión increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 23 (4): 767-777, 2005.

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

Anderson GH. Effect of age on hypertension: analysis of over 4,800 referred hypertensive patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 10 (3): 286-297, 1999.

Anner, BM; Imesch, E; Moosmayer, M. Normal sensitivity of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase isolated from brain and kidney of spontaneously hypertensive rats to sodium, ouabain or mercury. *Biochim Biophys Acta.* 1270 (1): 95-99, 1995.

Anner, BM; Moosmayer, M; Imesch, E. Mercury blocks the Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. *Am J Physiol.* 262: F830–F836, 1992.

Antman, EM; DeMets, D; Loscalzo, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation.* 112: 759-770, 2005.

Artigão, M. Orto-nitrofenil derivados de mercúrio. *Anales de la Universidad de Murcia - Ciencias.* XLIII (1-4), 1984.

Asano, S; Eto, K; Kurisaki, E; Gunji, H; Hiraiwa, K; Sato, M; Sato, H; Hasuike, M; Hagiwara, N; Wakasa, H. Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathol Int.* 50 (3): 169-174, 2000.

Atlas, SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 13 (8 Suppl B): 9-20, 2007.

Augusti, PR; Conterato, GM; Somacal, S; Sobieski, R; Spohr, PR; Torres, JV; Charão, MF; Moro, AM; Rocha, MP; Garcia, SC; Emanuelli, T. Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Food Chem Toxicol.* 46 (1): 212-219, 2008.

Baehler, RW; Kotchen, TA; Burke, JA; Galla, JH; Bhatena, D. Considerations on the pathophysiology of mercuric chloride-induced acute renal failure. *J Lab Clin Med.* 90 (2): 330-340, 1977.

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*. 181 (96): 230-241, 1973.

Ball, LK; Ball, R; Pratt, RD. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. *Pediatrics*. 107 (5): 1147-1154, 2001.

Barnes, DM; Hanlon, PR; Kircher, EA. Effects of inorganic HgCl₂ on adipogenesis. *Toxicol Sci*. 75 (2): 368-377, 2003.

Barnes, DM; Kircher, EA. Effects of mercuric chloride on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Toxicol In Vitro*. 19 (2): 207-214, 2005.

Barregard, L; Sällsten, G; Järholm, B. Mortality and cancer incidence in chloralkali workers exposed to inorganic mercury. *Br J Ind Med*. 47 (2): 99-104, 1990.

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

Baudouin, V; Bocquet, N; Rybojad, M; Lissak, N; Broux, F; Grall, M; Loirat, C. Clinical quiz. Mercury poisoning in children. *Pediatr Nephrol*. 11: 263-264, 1997.

Behrendt, D; Ganz, P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*. 90: 40L-48L, 2002.

Benov, LC; Benchev, IC; Monovich, OH. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chem Biol Interact*. 76: 321-332, 1990.

Berry, C; Anderson, N; Kirk, AJ; Dominiczak, AF; McMurray, JJ. Renin angiotensin system inhibition is associated with reduced free radical concentrations in arteries of patients with coronary heart disease. *Heart*. 86 (2): 217-220, 2001a.

Berry, C; Brosnan, MJ; Fennell, J; Hamilton, CA; Dominiczak, AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*10 (2): 247-255, 2001b.

Bidani, A; Churchill, PC; Fleischmann, L; Becker-McKenna, B. HgCl₂-induced acute renal failure in the developing rat. *Pediatr Res.* 14 (3): 183-186, 1980.

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

Bizarro, P; Acevedo, S; Niño-Cabrera, G; Mussali-Galante, P; Pasos, F; Avila Costa, MR; Fortoul, TI. Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reprod. Toxicol.* 17: 561-566, 2003.

Björkman, L; Sandborgh-Englund; G, Ekstrand, J. Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. *Toxicol Appl Pharmacol.* 144 (1): 156-162, 1997.

Boffeta, P; Sallsten, G; Garcia-Gomez, M; Pompe-Kim, V; Zaridze, D; Bulbulyan, M; Caballero, JD; Ceccareli, F; Kopal, AB; Merler, E. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med.* 58 (7): 461-466, 2001.

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

Boyd, SA; Seger, D; Vannucci, S; Langley, M; Abraham, JL; King Jr, LE. Mercury Exposure and Cutaneous Disease. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 43 (1): 81-90, 2000.

Brake, J; Thaxton, P; Hester, PY. Mercury induced cardiovascular abnormalities in the chicken. *Arch Environ Contam Toxicol.* 6 (2-3): 269-277, 1977.

Branches, FJP; Erickson, TB; Aks, SE; Hryhorczuk, DO. *Clin. Toxicol.* 31: 295, 1993.

Brandão, R; Borges, LP; de Oliveira, R; Rocha, JB; Nogueira, CW. Diphenyl diselenide protects against hematological and immunological alterations induced by mercury in mice. *J Biochem Mol Toxicol.* 22 (5): 311-319, 2008.

Brandão, R; Santos; FW, Zeni, G; Rocha, JB; Nogueira, CW. DMPS and N-acetylcysteine induced renal toxicity in mice exposed to mercury. *Biometals.* 19 (4): 389-398, 2006.

Brilla, CG; Zhou, G; Rupp, H; Maisch, B; Weber, KT. Role of angiotensin II and prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. *Am J Cardiol.* 76: 8D–13D, 1995.

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

Buñag, RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol.* 34 (2): 279-282, 1973.

Calabrese, EJ; Baldwin, LA. Inorganics and hormesis. *Crit Rev Toxicol.* 33 (3-4): 215-304, 2003.

Campbell, DJ. The site of angiotensin production. *J Hypertens.* 3 (3): 199-207, 1985.

Canela, MC. Determinação de mercúrio. UNICAMP, 1995.

Carmichael, NG; Fowler, BA. Effects of separate and combined chronic mercuric chloride and sodium selenate administration in rats: histological, ultrastructural, and x-ray microanalytical studies of liver and kidney. *J Environ Pathol Toxicol.* 3 (1-2): 399-412, 1979.

Carmen Agramunt, M; Domingo, A; Domingo, JL; Corbella, J. Monitoring internal exposure to metals and organic substances in workers at hazardous waste incinerator after 3 years of operation. *Toxicol Lett.* 146 (1): 83-91, 2003.

Carmignani, M; Boscolo, P. Cardiovascular homeostasis in rats chronically exposed to mercuric chloride. *Arch Toxicol Suppl.* 7: 383-388, 1984.

Carmignani, M; Boscolo, P; Preziosi, P. Renal ultrastructural alterations and cardiovascular functional changes in rats exposed to mercury chloride. 13: 353-356, 1989.

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.* 49 (4): 226-232, 1992.

Carpenter, DO. Effects of metals on the nervous system of humans and animals. *Int J Occup Med Environ Health.* 14 (3): 209-218, 2001.

Carranza-Rosales, P; Said-Fernández, S; Sepúlveda-Saavedra, J; Cruz-Vega, DE; Gandolfi, AJ. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology.* 210 (2-3): 111-121, 2005.

Catt, KJ; Cain, MD; Coghlan, JP; Zimmet, PZ; Cran, E; Best, JB. Metabolism and blood levels of angiotensin II in normal subjects, renal disease, and essential hypertension. *Circ Res.* 27 (Suppl 2-2): 177, 1970.

Celermajer, DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 30: 325-333, 1997.

Cernichiari, E; Brewer, R; Myers, GJ; Marsh, DO; Lapham, LW; Cox, C. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. *Neurotoxicology.* 16: 705-710, 1995.

Chang, XZ; Lu, HM; Zhang, YH; Qin, J. Hypertension and erythromelalgia as prominent manifestations of mercury intoxication. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 39 (4): 377-380, 2007.

Chaudhury, S; Mukhopadhyay, B; Bose, S; Bhattacharya, S. Involvement of mercury in platelet aggregation--probable mechanism of action. *Biomed Environ Sci.* 9 (1): 26-36, 1996.

Chen, YW; Huang, CF; Tsai, KS; Yang, RS; Yen, CC; Yang, CY; Lin-Shiau, SY;Liu, SH. The role of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling in low-dose mercury-induced mouse pancreatic beta-cell dysfunction in vitro and in vivo. *Diabetes.* (6): 1614-1624, 2006.

Chetty, CS; Rajanna, B; Rajanna, S. Inhibition of rat brain microsomal Na⁺/K⁺-ATPase and ouabain binding by mercuric chloride. *Toxicol Lett.* 51 (1): 109-116, 1990.

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

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

Clarkson, TW. Mercury. In: Sarkar B, ed. *Heavy metals in the environment.* New York: Marcel Dekker, Inc: 457-501, 2002a.

Clarkson, TW. The toxicology of mercury. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 34: 369-403, 1997.

Clarkson, TW; Magos, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol.* 36: 609-662, 2006.

Clarkson TW; Magos L; Myers GJ. The toxicology of mercury current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med.* 349: 1731-1737, 2003.

Cleverly, DH; Morrison, RM; Riddle, BL; Kellam, RG. Regulatory analysis of pollutat emissions. Including polychlorinated dibenzo-pdioxins (CODs) and dibenzofurans (CDFs), from the stacks of municipal waste combustors. *Chemosphere*. 18: 1143-1153, 1989.

Cloarec, S; Deschenes, G; Sagnier, M; Rolland, JC; Nivet, H. Hypertension arterielle par intoxication au mercure: interet diagnostique du captopril. *Arch Pediatr*. 2: 43-46, 1995.

Cotran, RS; Kumar, V; Collins, T. Robbins: Patologia funcional e estrutural. Sexta edição. Guanabara-Koogan. 13: 498, 2000.

Cunha, MES. Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos. Dissertação de doutoramento em Ciências Biomédicas. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto, 2008.

Cunha, FN; de Assis, GP; Silva, CE; Stefanon, I; Pinto, VD; Vassallo, DV. Effects of mercury on the contractile activity of the right ventricular myocardium. *Arch Environ Contam Toxicol*. 41 (3): 374-380, 2001.

Cushman, DW; Cheung, HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*. 20: 1637-1648, 1971.

Cuvin-Aralar, ML; Furness, RW. Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol Environ Safety*. 21: 348-364, 1991.

da Cunha, V; Souza, HP; Rossoni, LV; França, AS; Vassallo, DV. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. *Arch Environ Contam Toxicol*. 39 (1): 124-130, 2000.

Dantas, DCM; Queiroz, MLS. Immunoglobulin E and autoantibodies in mercury-exposed workers. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 19: 383-392, 1997.

Dantzig, PI. Parkinson's disease, macular degeneration and cutaneous signs of mercury toxicity. *J Occup Environ Med.* 48 (7): 656, 2006.

Davidson, PW; Myers, GJ; Weiss, B. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics.* 113 (4 Suppl): 1023-1029, 2004.

Day, RD; Segars, AL; Arendt, MD; Lee, AM; Peden-Adams, MM. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environ Health Perspect.* 115 (10): 1421-1428, 2007.

de Azevedo, FA. Toxicologia do mercúrio. São Carlos: RiMa, 2003.

de Freitas, AS; Funck, VR; Rotta Mdos, S; Bohrer, D; Mörschbächer, V; Puntelm, RL; Nogueiram CW; Farinam M; Aschner, M; Rocham JB. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull.* 79 (1): 77-84, 2009.

DeLano, FA; Balete, R; Schmid-Schönbein, GW. Control of oxidative stress in microcirculation of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288 (2): H805-H812, 2005.

de Oliveira, JJ; Silva, SRAS. Hipertensão arterial secundária a intoxicação por mercúrio com síndrome clínico laboratorial simulando feocromocitoma. *Arq Bras Cardiol.* 66 (1): 29-31, 1996.

Dieter, MP; Luster, MI; Boorman, GA; Jameson, CW; Dean, JH; Cox, JW. Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 68: 218-228, 1983.

Dinehart, SM; Dillard, R; Raimer, SS; Diven, S; Cobos, R; Pupo, R. Cutaneous manifestations of acrodynia (pink disease). *Arch Dermatol.* 124: 107-109, 1988.

Dufault, R; Schnoll, R; Lukiw, WJ; Leblanc, B; Cornett, C; Patrick, L; Wallinga, D; Gilbert, SG; Crider, R. Mercury exposure, nutritional deficiencies and metabolic disruptions may affect learning in children. *Behav Brain Funct.* 27: 5-44, 2009.

Dyall-Smith, DJ; Scurry, JP. Mercury pigmentation and high mercury levels from the use of a cosmetic cream. *Med. J. Aust.* 153: 409-415, 1990.

Dzau, VJ; Bernstein, K; Celermajer, D; Cohen, J; Dahlöf, B; Deanfield, J; Diez, J; Drexler, H; Ferrari, R; van Gilst, W; Hansson, L; Hornig, B; Husain, A; Johnston, C; Lazar, H; Lonn, E; Lüscher, T; Mancini, J; Mimran, A; Pepine, C; Rabelink, T; Remme, W; Ruilope, L; Ruzicka, M; Schunkert, H; Swedberg, K; Unger, T; Vaughan, D; Weber, M. Working Group on Tissue Angiotensin-converting enzyme, International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol.* 88 (9A): 1L-20L, 2001.

Eide, R; Wesenberg, GR. Mercury contents of indicators and target organs in rats after long-term, low-level, mercury vapor exposure. *Environ Res.* 61 (2): 212-222, 1993.

EI-Demerdash, FM. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver and blood of rats. *J Environ. Sci. Health B.* 36: 489-499, 2001.

Erler, M; Schiele, R; Löffler, A. Is there a link between the mercury release of amalgam fillings and the results of psychological questionnaires? *Versicherungsmedizin.* 61 (4): 163-166, 2009.

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

Ezaki, O. Iib group metal ions (Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺) stimulate glucose transport activity by post-insulin receptor kinase mechanism in rat adipocytes. *J Biol Chem.* 264 (27): 16118-16122, 1989.

Faro, LRF; Rodrigues, KJA; Santana, MB; Vidal, L; Alfonso, M; Durán, R. Comparative effect of organic and inorganic mercury on in vivo dopamine release in freely moving rats. *Braz J Med Biol Res.* 40: 1361-1365, 2007.

Fei, DT; Scoggins, BA; Tregear, GW; Coghlan, JP. Angiotensin I, II, and III in sheep. A model of angiotensin production and metabolism. *Hypertension.* 3 (6): 730-737, 1981.

Ferreira, AJ; Santos, RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 38 (4): 499-507, 2005.

Ferrer, A. Metal poisoning. *ANALES Sis San Navarra.* 26: 141-153, 2003.

Frenkel, GD; Wilson, H; Ducote, J. Effects of exposure of DNA to methyl mercury on its activity as a template-primer for DNA polymerases. *J Inorg Biochem.* 27 (2): 113-121, 1986.

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.* 10 (5): 29, 2006.

Fitzgerald, W. Is mercury increasing in the atmosphere? The need for an atmospheric mercury network (AMNET). *Water, Air and Soil Pollution.* 80 (1): 245-254, 1995.

Fukuda, M. Effects of mercury compounds on growth, cell composition and glucose uptake in *Tetrahymena pyriformis*. *Nippon Eiseigaku Zasshi.* 49 (2): 616-620, 1994.

Gajkowska, B; Szumanska, G; Gadamski, R. Ultrastructural alterations of brain cortex in rat following intraperitoneal administration of mercuric chloride. *J Hirnforsch.* 33 (4-5): 471-476, 1992.

Ganther, HE. Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann N Y Acad Sci.* 355: 212-226, 1980.

Ganther, HF; Goudie, C; Sunde, ML; Kopecky, MJ; Wagner, P. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Scienc.* 175: 1122-1124, 1972.

Gassó, S; Cristófol, RM; Selema, G; Rosa, R; Rodríguez-Farré, E; Sanfeliu, C. Antioxidant compounds and Ca²⁺ pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. *J Neurosci Res.* 66: 135-145, 2001.

Gerhardsson, L; Lundh, T; Minthon, L; Londos, E. Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 25 (6): 508-515, 2008.

Gilchrist, GS; Fine, RN; Donnell, GN. The hemostatic defect in glycogen storage disease, type 1. *Acta Paediatr Scand.* 57 (3): 205-208, 1968.

Gingras, B; Rodier, G; Giasson, E; Coulombe, P; Chassagne, C; Meloche, S. Expression of angiotensin type II receptor downregulates Cdk4 synthesis and inhibits cell-cycle progression. *Oncogene.* 22: 2633-2642, 2003.

Girardi, G; Elías, MM. Effectiveness of N-acetyl-cysteine in protecting mercuric chloride nephrotoxicity. *Toxicology.* 67: 155-164, 1991.

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

Girardi, G; Saball, DE; Salvarrey, MS; Elías, MM. Glomerular compromise in mercuric chloride nephrotoxicity. *J Biochem Toxicol.* 11: 189-196, 1996.

Girardi, G; Torres, AM; Elías, MM. The implication of renal glutathione levels on mercuric chloride nephrotoxicity. *Toxicology.* 58: 187-195, 1989.

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

Goldman, LR; Shannon, MW. American Academy of Pediatrics: committee on Environmental Health Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics.* 108; 197-205, 2001.

Golpon, HA; Püchner, A; Schmidt, L; Jungclas, H; Barth, P; Welte, T; Wichert, PV; Feddersen, CO. Mercury contamination of rat amylin mimics vasoactivity and cytotoxic effects. *Peptides.* 24 (8): 1157-1162, 2003.

Gonzalvo, MC; Gil, F; Hernandez, AF; Villanueva, E; Pla, A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact.* 105 (3): 169-179, 1997.

Goyer, RA. Toxic effects of metals. In: *Klaassen, C.D. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 5th ed. McGraw-Hill: 709-712, 1996.

Goering, PL.; Thomas, D; Rojko, JL; Lucas, AD. Mercuric chloride-induced apoptosis is dependent on protein synthesis. *Toxicol. Lett.* 105: 183-195, 1999.

Graeme, KA; Pollack, CV. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *J Emerg Med.* 16:45-56, 1998.

Grandjean, P; Murata, K; Budtz-Jorgensen, E; Weihe, P. Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *J Pediatr.* 144 (2): 169-176, 2004.

Grandjean, P; Weihe, P; White, RF; Debes, F; Araki, S; Yokoyama, K.; Murata, K.; Sorensen, N; Dahl, R; Jorgensen, PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicology*. 19: 417-428, 1997.

Green, DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*. 94 (6): 695-708, 1998.

Griendling, KK; FitzGerald, GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 108: 1912-1916, 2003.

Grigoletto, JC; Oliveira, AS; Muñoz, SIS; Alberguini, LBA; Takayanagui, AMM. Exposição ocupacional por uso de mercúrio em odontologia: uma revisão bibliográfica. *Ciênc. Saúde Coletiva*. 13 (2): 533-542, 2008.

Guallar, E; Sanz-Gallardo, I; Van't Veer, P; Bode, P; Aro, A; Gómez-Aracena, J; Kark, JD; Riemersma, RA; Martín-Moreno, JM; Kok, FJ. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 347: 1747-1754, 2002.

Guo, TL; Miller, M; Shapiro, IM; Shenker, BJ. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: Evidence of mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 153: 250-257, 1998.

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

Halbach, S; Schonsteiner, G; Ebner, F; Reiter, M. The effects of p-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBS) on force of contraction of mammalian myocardium and on ATP hydrolysis by sarcolemmal ATPase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 318: 121-129, 1981.

Hall, RL; Wilke, WL; Fettman, MJ. Renal resistance to mercuric chloride toxicity during prolonged exposure in rats. *Vet Hum Toxicol*. 28 (4): 305-307, 1986.

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

404, 2001.

Halliwell, B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.* 411: 157-160, 1997.

Halliwell, B; Gutteridge, JMC. Free radicals in biology and medicine. *Claredon Press.* 1989.

HAMPL, V; Herget, J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev.* 80 (4): 1337-1372, 2000.

Harada, S; Tokunaga, S; Momohara M; Masaki, H; Tagawa, T; Imaizumi, T; Takeshita, A. Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitarius increases renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Circ Res.* 72: 511-516, 1993.

Hechtenberg, S; Beyersmann, D. Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity by cadmium, lead and mercury. *Enzyme.* 45: 109-115, 1991.

Heinecke, JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 141: 1-15, 1998.

Henningson, C; Hoffman, S; McGungile, L; Winter, JS. Acute mercury poisoning (acrodynia) mimicking pheochromocytoma in an adolescent. *J Pediatr.* 122: 252-253, 1993.

Hijova, E; Nistiar, F; Sipulova, A. Changes in ascorbic acid and malondialdehyde in rats after exposure to mercury. *Bratisl Lek Listy.* 106 (8-9): 248-251, 2005.

Houston, MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med.* 13 (2): S128-S133, 2007.

Huang, YL; Cheng, SL; Lin, TH. Lipid peroxidation in rats administered with

mercuric chloride. *Biol Trace Elem Res.* 52: 193-206, 1996.

Huang, CS; Narahashi, T. Mercury chloride modulation of the GABAA receptor-channel complex in rat dorsal root ganglion neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 140: 508-520, 1996.

Hunter, JW; Mullen, GP; McManus, JR; Heatherly, JM; Duke, A; Rand, JB. Neurologin-deficient mutants of *C. elegans* have sensory processing deficits and are hypersensitive to oxidative stress and mercury toxicity. *Dis Model Mech.* 3: Epub ahead of print, 2010.

Imesch, E; Moosmayer, M; Anner, BM. Mercury weakens membrane anchoring of Na-K-ATPase. *Am J Physiol.* 262 (5 Pt 2): F837-F842, 1992.

Inskip, MJ; Piotrowisk, JK. Review of the health effects of methylmercury. *Journal of Applied Toxicology.* 5 (3): 113-133, 1985.

Institóris, L; Siroki, O; Undeger, U; Basaran, N; Banerjee, BD; Dési, I. Detection of the effects of repeated dose combined propoxur and heavy metal exposure by measurement of certain toxicological, haematological and immune function parameters in rats. *Toxicology.* 21,163 (2-3): 185-193, 2001a.

Institóris, L; Siroki, O; Undeger, U; Basaran, N; Dési, I. Immunotoxicological investigations on rats treated subacutely with dimethoate, As³⁺ and Hg²⁺ in combination. *Hum Exp Toxicol.* 20 (7): 329-236, 2001b.

InSug, O; Datar, S; Koch, CJ; Shapiro, IM; Shenker, BJ. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology.* 124 (3): 211-224, 1997.

Issa, Y; Watts, DC; Duxbury, AJ; Brunton, PA; Watson, MB; Waters, CM. Mercuric chloride: toxicity and apoptosis in a human oligodendroglial cell line MO3.13. *Biomaterials.* 24: 981-987, 2003.

Jaeger, A; Leroy, M; Ledig, M; Warter, A; Zaehringer, M; Heimbürger, R; Bahman, S; Mantz, JM. The pulmonary toxicity of mercury vapors in the rat. *Toxicol Eur Res.* 5 (5): 229-232, 1983.

Jansson, G; Harms-Ringdahl, M. Stimulating effects of mercuric and silver ions on the superoxide anion production in human polymorphonuclear leucocytes. *Free Rad Res Commun.* 18: 87-98, 1993

Jardim, WF. *Ciência Hoje.* 41: 78, 1988.

Jie, XL; Jin, GW; Cheng, JP; Wang, WH; Lu, J; Ou, LY. Consumption of mercury-contaminated rice induces oxidative stress and free radical aggravation in rats. *Biomed Environ Sci.* 20 (1): 84-89, 2007.

Jin, X; Lok, E; Caldwell, D; Mueller, R; Kapal, K; Liston, V; Kubow, S; Chan, HM; Mehta, R. Dietary fats altered nephrotoxicity profile of methylmercury in rats. *J Appl Toxicol.* 29 (2): 126-140, 2009.

Johansson, C; Castoldi, AF; Onishchenko, N; Manzo, L; Vahter, M; Ceccatelli, S. Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotox Res.* 11 (3-4): 241-260, 2007.

Kabeer, IAS; Moorthy, KS; Cameron, JA; Desalah, D. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 40: 249-254, 1988.

Kaslow, JE. Proteins - Albumin, globulins, etc. 2010. www.drkaslow.com/html/protein_albumin_globulins_.html em 15/04/10.

Kempuraj, D; Asadi, S; Zhang, B; Manola, A; Hogan, J; Peterson, E; Theoharides, TC. Mercury induces inflammatory mediator release from human mast cells. *J Neuroinflammation.* 11: 7-20, 2010.

Kim, SH; Sharma, RP. Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species, Ca(2+) homeostasis and cyto- kine gene expression. *Toxicol In Vitro.* 17: 385-395, 2003.

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

Kingman, A; Albertini, T; Brown, LJ. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US military population. *J Dent Res.* 77 (3): 461-471, 1998.

Kishimoto, T; Oguri, T; Abe, M; Kajitani, H; Tada, M. Inhibitory effect of methylmercury on migration and tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Arch Toxicol.* 69 (6): 357-361, 1995.

Klaassen, DC. Metais pesados e seus antagonistas. *Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica.* Seção XVIII. Toxicologia. Cap. 66: 1064, 1991.

Klaassen, CD; Watkins III JB. TOXICOLOGIA a ciência básica dos tóxicos de Casarett & Doull's. Compêndio. 5.^a edição. pag.3, 2001.

Kobal, AB; Horvat, M; Prezelj, M; Briski, AS; Krsnik, M; Dizdarevic, T; Mazej, D; Falnoga, I; Stibilj, V; Arneric, N; Kobal, D; Osredkar, J. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol.* 17: 261-274, 2004.

Komulainen, H; Tuomisto, J. 3H-dopamine uptake and 3H-haloperidol binding in striatum after administration of methyl mercury to rats. *Arch Toxicol.* 57 (4): 268-271, 1985.

Kostka B. Potentiation of ADP-induced platelet aggregation by mercury compounds. *Thromb Res.* 57 (5): 795-801, 1990.

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

Krishnamurthy, SJ. *Chem. Educ.* 69: 347, 1992.

Kroemer, G; Zamzami, N; Susin, SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*. 18 (1):44-51, 1997.

Kumar, SV. In vitro toxicity of mercury, cadmium and arsenic to platelet aggregation: Influence of adenylate cyclase and phosphodiesterase activity. *In VitroMol Toxicol*. 13: 137-144, 2000.

Lacerda, LD. *Ciência Hoje*. 23: 25, 1997.

Lakshmi, SV; Padmaja, G; Kuppusamy, P; Kutala, VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys*. 46 (6): 421-440, 2009.

Landrigan, PJ. What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Curr Opin Pediatr*. 22 (2): 219-225, 2010.

Langworth, S; Sällsten, G; Barregard, L; Cynkier, I; Lind, ML; Söderman, E. Exposure to mercury vapor and impact on health in the dental profession in Sweden. *J Dent Res*. 76 (7): 1397-1404, 1997.

Lash LH; Putt DA; Zalups RK. Role of extracellular thiols in accumulation and distribution of inorganic mercury in rat renal proximal and distal tubular cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 285 (3): 1039-1050, 1998.

Lavoie, JL; Sigmund, CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. 144 (6): 2179-2183, 2003.

Lawrence, D. Heavy metal modulation of lymphocyte activation. I. *In vitro* effects of heavy metals on primary humoral immune responses. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 57: 439-451, 1981.

Lee, RG; Bithell, TC; Foerster, J; Athens, JW; Lukens, JN. Wintrobe - Hematologia Clínica. Volume II. ed. Manole Ltda. Cap. 54. p.1531, 1998.

Lee, YW; Ha, MS; Kim, YK, R. Role of reactive oxygen species and glutathione in inorganic mercury-induced injury in human glioma cells. *Neurochemical Research*. 16 (11): 1187-1193, 2002.

Livardjani, F; Ledig, M; Kopp, P; Dahlet, M; Leroy, M; Jaeger, A. Lung and blood superoxide dismutase activity in mercury vapor exposed rats: effect of N-acetylcysteine treatment. *Toxicology*. 66 (3): 289-295, 1991.

Llobet, JM; Falco, G; Casas, C; Teixido, A; Domingo, JL. Concentrations of arsenic, cadmium, mercury and lead in common foods AND estimated daily intake by children, adolescents, adults, AND seniors of Catalonia, Spain. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 838-842, 2003.

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

Lund, BO; Miller, DM; Woods, JS. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 42: S181-S187, 1991.

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*. 45 (10): 2017-2024, 1993.

Lusher, TF; Barton, M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*. 20: 11310, 1997.

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

Mackert, JR Jr. Randomized controlled trial demonstrates that exposure to mercury from dental amalgam does not adversely affect neurological development in children. *J Evid Based Dent Pract*. 10 (1): 25-29, 2010.

Maggi, CA; Meli, A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 3: other systems and conclusions. *Cardiovascular System. Experientia* 40 (part 2): 51-59, 1986.

Magos, L; Clarkson, TW; Hudson, AR. The effects of dose of elemental mercury and first-pass circulation time on exhalation and organ distribution of inorganic mercury in rats. *Biochim Biophys Acta.* 991 (1): 85-89, 1989.

Magour, S; Maser, H; Greim, H. The effect of mercury chloride and methyl mercury on brain microsomal Na⁺-K⁺-ATPase after partial delipidisation with lubrol. *Pharmacol Toxicol.* 60: 184-186, 1987.

Mahboob, M; Shireen, KF; Atkinson, A; Khan, AT. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B.* 36 (5): 687-697, 2001.

Malm, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ. Res.* 77: 73-78, 1998.

Marchasin, S; Wallerstein, RO; Aggeler, PM. Variations of the platelet count in disease. *Calif Med.* 101: 95-100, 1964.

Marcus, AJ; Zucker, MB. The physiology of blood platelets. New York: Grune & Stratton, 1965.

Mari, M; Domingo, JL. Toxic emissions from crematories: a review. *Environ Int.* 36 (1): 131-137, 2010.

Marshall, RP; McAnulty, RJ; Laurent, GJ. Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor. *Am J Respir Crit Care Med.* 161 (6): 1999-2004, 2000.

Massaroni, L; Oliveira, EM; Stefanon, I; Vassallo, DV. Effects of mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Braz J Med Biol Res.* 25 (8): 861-864, 1992.

Massaroni, L; Rossoni, LV; Amaral, SM; Stefanon, I; Oliveira, EM; Vassallo, DV. Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of mercury in anaesthetized rats and in langendorff perfused rat hearts. *Pharmacol Res.* 32 (1-2): 27-36, 1995.

McIntyre, M; Bohr, DF; Dominiczak, AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension.* 34 (4 Pt 1): 539-545, 1999.

McKelvey, W; Gwyn, RC; Jeffry, N; Kass, D; Thorpe, LE; Garg, RK; Palmer, CD; Parsons, PJ. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York City adults. *Environ Health Perspect.* 115: 1435-1441, 2007.

McNeil, NI; Issler, HC; Olver, RE; Wrong, OM. Domestic metallic mercury poisoning. *Lancet.* 1: 269-271, 1984.

Micaroni, RCCM; Bueno, MIMS; Jardim, WF. Mercury compounds. Review on determination, treatment and disposal methods. *Química Nova.* 23 (4): 487-495, 2000.

Michel, JB. Renin-angiotensin system and vascular remodelling. *Med Sci.* 20 (4): 409-413, 2004.

Miller, OM; Lund, BO; Woods, JS. Reactivity of Hg(II) with superoxide: evidence for the catalytic dismutation of superoxide by Hg(II). *J Biochem Toxicol.* 6: 293-298, 1991.

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

Moberg, LE. Effects of mercuric ions on isolated guinea-pig ileum. *Acta Odontol Scand.* 44 (4): 207-123, 1986.

Moisan, E; Arbour, S; Nguyen, N; Hébert, MJ; Girard, D; Bernier, J; Fournier, M; Kouassi, E. Prolongation of human neutrophil survival by low-level mercury via inhibition of spontaneous apoptosis. *J Toxicol Environ Health A.* 65 (2): 183-203, 2002.

Molin, M; Bergman, B; Marklund, SL; Schultz, A; Skerfving, S. Mercury, selenium and glutathione peroxidase before and after amalgam removal in man. *Acta Odontol. Scand.* 48: 189-202, 1990.

Moreira, CM; Oliveira, EM; Bonan, CD; Sarkis, JJ; Vassallo, DV. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 135C (3): 269-275, 2003.

Morgan, DL; Chanda, SM; Price, HC; Fernando, R; Liu, J; Brambila, E; O'Connor, RW; Beliles, RP; Barone, S Jr. Disposition of inhaled mercury vapor in pregnant rats: maternal toxicity and effects on developmental outcome. *Toxicol Sci.* 66 (2): 261-273, 2002.

Morrell, NW; Grieshaber, SS; Danilov, SM; Majack, RA; Stenmark, KR. Developmental regulation of angiotensin converting enzyme and angiotensin type 1 receptor in the rat pulmonary circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 14 (6): 526-537, 1996.

Moszczyński, P. Mercury and the risk of coronary heart disease. *Przegl Lek.* 63: Suppl 7: 84-87, 2006.

Ms CEME – Memento Terapêutico CEME da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Brasília. *Rename.* 59, 1989.

Mutter, J; Naumann, J; Schneider, R; Walach, H. Mercury and Alzheimer's disease. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 75 (9): 528-538, 2007.

Naganuma, A; Koyama, Y; Imura, N. Behavior of methylmercury in mammalian erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 54: 405-410, 1980.

Nakai, K; Suzuki, K; Oka, T; Murata, K; Sakamoto, M; Okamura, K; Hosokawa, T; Sakai, T; Nakamura, T; Saito, Y; Kurokawa, N; Kameo, S; Satoh, H. The Tohoku study of child development: A cohort study of effects of perinatal exposure to methylmercury and environmentally persistent organic pollutants on neurobehavioral development in Japanese children. *Tohoku J. Exp. Med.* 202: 227-237, 2004.

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

National Research Council (NRC). Risk assessment in the Federal Government: managing the process. *National Academy of Science Press.* Washington, 2000a.

National Research Council (NRC). Committee on the Toxicology Effects of Methylmercury. Toxicological Effects of Methylmercury. *National Academy of Science. Press.* Washington, 2000b.

Navab, M; Berliner, JA; Watson, AD; Hama, SY; Territo, MC; Lusis, AJ; Shih, DM; Van Lenten; BJ; Frank, JS; Demer, LL; Edwards, PA; Fogelman, AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16: 831-842, 1996.

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

Noda, K. Angiotensin receptor in the lung. *Nippon Rinsho.* 57 (5): 1049-1053, 1999.

Odell, TT Jr; Mcdonald, TP; Howsden, FL. Native and foreign stimulators of platelet production. *J Lab Clin Med.* 64: 418-424, 1964.

Oliveira, EM; Moreira, FA; Saleh, AS; Rocha, JBT; Sarkis, JJF. Anais da VI reunião anual da FESBE, abstract, 1.92: 42, 1991.

Oliveira, EM; Rocha, JB; Sarkis, JJ. In vitro and in vivo effects of HgCl₂ on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 102 (5): 251-254, 1994a.

Oliveira, EM; Vassallo, DV. Effects of mercury on the contractility of isolated rat cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res.* 25 (10): 1037-1040, 1992.

Oliveira, EM; Vassallo, DV; Sarkis, JJ; Mill, JG. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. *Toxicol Appl Pharmacol.* 128 (1): 86-91, 1994.

Oskarsson, A; Schültz, A; Skerfving, S; Hallén, IP; Ohlin, B; Lagerkvist, BJ. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch Environ Health.* 51 (3): 234-241, 1996.

Pamphlett, R; Kum-Jew S. Mercury vapor uptake into the nervous system of developing mice. *Neurotoxicol Teratol.* 23 (2): 191-196, 2001.

Papaggianis, I; Kagalou, I; Leonardos, J; Petridis, D; Kalfakakou, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environ. Int.* 30 (3): 357-362, 2004.

Park, EJ; Park, K. Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. *Toxicol In Vitro.* 21(5): 789-794, 2007.

Pathak, SK; Bhowmik, MK. The chronic toxicity of inorganic mercury in goats: clinical signs, toxicopathological changes and residual concentrations. *Vet Res Commun.* 22 (2):131-138, 1998.

Peçanha, FM; Wiggers, GA; Briones, AM; Perez-Giron, JV; Miguel, M; Garcia-Redondo, AB; Vassallo, DV; Alonso, MJ; Salaices, M. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is

increased by exposure to low mercury concentration. *J Physiol Pharmacol.* 61 (1): 29-36, 2010.

Pedersen, MB; Hansen, JC; Mulvad, G; Pedersen, HS; Gregersen, M; Danscher, G. Mercury accumulations in brains from populations exposed to high and low dietary levels of methyl mercury. Concentration, chemical form and distribution of mercury in brain samples from autopsies. *Int J Circumpolar Health.* 58 (2): 96-107, 1999.

Pelclová, D; Lukás, E; Urban, P; Preiss, J; Rysavá, R; Lebenhart, P; Okrouhlík, B; Fenclová, Z; Lebedová, J; Stejskalová, A; Ridzon, P. Mercury intoxication from skin ointment containing mercuric ammonium chloride. *Int Arch Occup Environ Health.* 75 Suppl: S54-S59, 2002.

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

Pfaller, W; Gstraunthaler, G; Willinger, CC. Morphology of renal tubular damage from nephrotoxins. *Toxicol. Lett.* 53: 39-43, 1990.

Phelps, RW; Clarkson, TW; Kershaw, TG; Wheatley, B. Interrelationships of blood and hair mercury concentrations in a North American population exposed to methylmercury. *Arch. Environ. Health,* 35: 161-168, 1980.

Prado, MJV; de Oliveira, RC; Ferreira, RSF; Vieira, RCPA; de Pinho, JJRG. The withdrawal of thimerosal from pharmaceutical market and its substitution by quaternary ammonium derivatives. Evaluation of risk/benefit. *Lecta.* 22 (1/2): 37-47, 2004.

Prasad, A; Koh, KK; Schenke, WH; Mincemoyer, R; Csako, G; Fleischer, TA; Brown, M; Selvaggi, TA; Quyyumi, AA. Role of angiotensin II type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis. *Am Heart J.* 142 (2): 248-253, 2001.

Pollard, KM; Hultman, P. Effects of Mercury on the Immune System. *Metal Ions Biol. Syst.* 34: 421-440, 1997.

Pôrto, WG. Cu-Zn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in motor neurone disease and Parkinson's disease. *MsC thesis, King's College, University of London*, 1996.

Pôrto, WG. Radicais livres e neurodegeneração. Entendimento fisiológico: Base para nova terapia? *Rev. Neurociências.* 9 (2): 70-76, 2001.

PR Vade-Mécum odontológico. São Paulo: *Soriak.* 316: 163, 1997.

Queiroz, EK; Waissmann, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad Saude Publica.* 22 (3): 485-493, 2006.

Qiu, C; Muchant, D; Beierwaltes, WH, Racusen, L; Baylis, C. Evolution of chronic nitric oxide inhibition hypertension: relationship to renal function. *Hypertension.* 31: 21-26, 1998.

Raap, U; Stiesch, M; Reh, H; Kapp, A; Werfel, T. Investigation of contact allergy to dental metals in 206 patients. *Contact Dermatitis.* 60 (6): 339-343, 2009.

Radunovic, A; Pôrto, WG; Zeman, S; Leigh, PN. Increased mitochondrial superoxide dismutase activity in Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Neurosci Lett.* 239 (2-3): 105-108, 1997.

Rajanna, B; Chetty, CS; Rajanna, S. Effect of mercury chloride on the kinetics of cationic and substrate activation of the rat brain microsomal ATPase system. *Biochemical Pharmacology.* 39: 1935-1940, 1990.

Rao, MV; Purohit, A; Patel, T. Melatonin protection on mercury-exerted brain toxicity in the rat. *Drug Chem Toxicol.* 33 (2): 209-216, 2010 .

Ratcliffe, HE; Swanson, GM; Fischer, LJ. Human exposure to mercury: a critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J. Toxicol. Environ. Health.* 49: 221-270, 1996.

Reddy, RS; Jinna, RR; Uzodinma, JE; Desai, D. In vitro effect of mercury and cadmium on brain Ca²⁺-ATPase of the catfish *Ictalurus punctatus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 41 (3): 324-328, 1988.

Reinhardt, JW. Side-effects: mercury contribution to body burden from dental amalgam. *Adv Dent Res.* 6: 110-103, 1992.

Remuzzi, G; Bertani, T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med.* 339: 1448-1456, 1998.

Remuzzi, G; Perico, N; Macia, M; Ruggenenti, P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* (99): S57-S65, 2005.

Reus, IS; Bando, I; Andrés, D; Cascales, M. Relationship between expression of HSP70 and metallothionein and oxidative stress during mercury chloride induced acute liver injury in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 17: 161-168, 2003.

Ribarov, SR; Benov, LC. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 640: 721-726, 1981.

Rice, DC. The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. *Environ Res.* 95 (3): 406-413, 2004.

Rodríguez-Martínez, MA; Ruiz-Torres, A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev.* 66: 213-222, 1992.

Rossoni, LV; Amaral, SMC; Vassallo, PF; França, A; Oliveira, EM; Varner, KJ; Vassallo, DV. Effects of mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. *Braz J Med Biol Res.* 32 (8): 989-997, 1999.

Rowens, B; Guerrero-Betancourt, D; Gottlieb, CA; Boyes, RJ; Eichenhorn, MS. Respiratory failure and death following. Acute inhalation of mercury vapor. A clinical and histological perspective. *Chest.* 99: 185-190, 1991.

Rungby, J; Ernst, E. Experimentally induced lipid peroxidation after exposure to chromium, mercury or silver: interactions with carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol.* 70 (3): 205-207, 1992.

Rush, JW; Aultman, CD. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab.* 33 (1): 162-172, 2008.

Salonen, JT. Epidemiological studies on antioxidants, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Arch Toxicol Suppl.* 20: 249-267, 1998.

Salonen, JT; Malin, R; Tuomainen, TP; Nyyssonen, K; Lakka, TA; Lehtimäki, T. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *BMJ.* 319 (7208): 487-488, 1999.

Salonen, JT; Nyyssönen, K; Salonen, R; Porkkala-Sarataho, E; Tuomainen, TP; Diczfalusy, U; Björkhem, I. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation.* 95 (4): 840-845, 1997.

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

Salonen, JT; Salonen, R; Seppänen, K; Rinta-Kiikka, S; Kuukka, M; Korpela, H; Alfthan, G; Kantola, M; Schalch, W. Effects of antioxidant supplementation on

platelet function: a randomized pair-matched, placebo-controlled, double-blind trial in men with low antioxidant status. *Am J Clin Nutr.* 53 (5): 1222-1229, 1991.

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.* 148 (2): 265-273, 2000.

Salonen, JT; Ylä-Herttuala, S; Yamamoto, R; Butler, S; Korpela, H; Salonen, R; Nyyssönen, K; Palinski, W; Witztum, JL. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 339 (8798): 883-887, 1992.

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

Schuttert, JB; Liu, MH; Gliem, N; Fiedler, GM; Zopf, S; Mayer, C; Müller, GA; Grunewald, RW. Human renal fibroblasts derived from normal and fibrotic kidneys show differences in increase of extracellular matrix synthesis and cell proliferation upon angiotensin II exposure. *Pflugers Arch.* 446: 387-393, 2003.

Schuurs, AH. Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *J Dent.* 27 (4): 249-256, 1999.

Shenker, BJ; Berthold, P; Rooney, C; Vitale, LA; DeBolt, K; Shapiro, IM. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15: 87-112, 1993.

Shenker, BJ; Datar, S; Mansfield, K; Shapiro, IM. Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: A flow cytometric analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143: 397-406, 1997.

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

Shenker, BJ; Guo, TL; Shapiro, IM. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ. Res.* 84: 89-99, 2000.

Shenker, BJ; Pankoski, L; Zekavat, A; Shapiro, IM. Mercury induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antioxid Redox Signal.* 4: 379-389, 2002.

Shenker, BJ; Rooney, C; Vitale, LA; Shapiro, IM. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 14: 539-553, 1992.

Silbergeld, EK; Trevani, C; Strickland, GT; Liggans, G; Woodruff, S; Sacchi, J; Azad, A; McKenna, K. Effects of mercury on resistance to *P. yoelli* malaria in a mouse model. *Toxicol. Sci.* 42: 205-205, 1998.

Skerfving, S. Methylmercury exposure, mercury levels in blood and hair, and health status in Swedes consuming contaminated fish. *Toxicology.* 2 (1): 3-23, 1974.

Stejskal, VDM; Forsbeck, M; Cederbrant, K; Asteman, O. Mercury-specific lymphocytes: an indication of mercury allergy in man. *J. Clin. Immunol.* 16: 31-40, 1996.

Stern, AH. Balancing the risks and benefits of fish consumption. *Ann Intern Med.* 142 (11): 949, 2005.

Stohs, SJ; Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 18 (2): 321-336, 1995.

Su, L; Wang, M; Yin, ST; Wang, HL; Chen, L; Sun, LG; Ruan, DY. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicol Environ Saf.* 70 (3): 483-489, 2008.

Sundberg, J; Jönsson, S; Karlsson, MO; Hallén, IP; Oskarsson, A. Kinetics of methylmercury and inorganic mercury in lactating and nonlactating mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 151 (2): 319-329, 1998.

Suzuki, H; DeLano, FA; Parks, DA; Jamshidi, N; Granger, DN; Ishii, H; Suematsu, M; Zweifach, BW; Schmid-Schönbein, GW. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 (8): 4754-4759, 1998.

Svensson, BG; Schütz, A; Nilsson, A; Akesson, I; Akesson, B; Skerfving, S. Fish as a source of exposure to mercury and selenium. *Sci Total Environ.* 11: 126 (1-2): 61-74, 1992.

Swamy, VC; Triggle, DJ. The reactivity of iliac vascular strips from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Blood Vessels.* 17 (5): 246-256, 1980.

Sweet, LI; Zelikoff, JT. Toxicology and immunotoxicology of mercury: a comparative review in fish and humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 4: 161-205, 2001.

Szumańska, G; Gadamski, R; Albrecht, J. Changes of the Na/K ATPase activity in the cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride: histochemical demonstration with light and electron microscopy. *Acta Neuropathol.* 86 (1): 65-70, 1993.

Thomas, WG; Thekkumkara, TJ; Baker, KM. Cardiac effects of All. AT1A receptor signaling, desensitization, and internalization. *Adv Exp Med Biol.* 396: 59-69, 1996.

Thuvander, A; Sundberg, J; Oskarsson, A. Immunomodulating effects after perinatal exposure to methylmercury in mice. *Toxicology.* 114: 163-175, 1996.

Timmermans, PB; Wong, PC; Chiu, AT; Herblin, WF; Benfield, P; Carini, DJ; Lee, RJ; Wexler, RR; Saye, JA; Smith, RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45: 205-251, 1993.

Torres, AD; Rai, AN; Hardiek, ML. Mercury intoxication and arterial hypertension: report of two patients and review of the literature. *Pediatrics*. 105 (3): E34, 2000.

Triunfante, P; Soares, ME; Santos, A; Tavares, S; Carmo, H; Bastos, ML. Mercury fatal intoxication: two case reports. *Forensic Sci Int*. 30: 184 (1-3): e1-6, 2009.

Tryphonas, L; Nielsen, NO. The pathology of arylmercurial poisoning in swine. *Can J Comp Med*. 34 (3): 181-190, 1970.

Tunali-Akbay, T; Sener, G; Salvarli, H; Sehirli, O; Yarat, A. Protective effects of Ginkgo biloba extract against mercury(II)-induced cardiovascular oxidative damage in rats. *Phytother Res*. 21 (1): 26-31, 2007.

Valko, M; Rhodes, CJ; Moncol, J; Izakovic, M; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 1-40, 2006.

Valle, LBS; Oliveira-Filho, RM.; Delucia, R; Oga, S. Antissépticos, desinfetantes, esterilizantes. *Farmacologia integrada*. In: DEMUSI, M. São Paulo: Atheneu 2: 575-606, 1991.

Vamnes, JS; Eide, R; Isrenn, R; Höl, PJ; Gjerdet, NR. Diagnostic value of a chelating agent in patients with symptoms allegedly caused by amalgam fillings. *J Dent Res*. 79 (3): 868-874, 2000.

Vane, JR. In Angiotensin. Handbook of experimental pharmacology. Vol 37. I.H. Page and F.M. Bumpus, editors. Springer-Verlag, NY 17-39, 1974.

Vane, JR; Anggard, EE; Botting, RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 323: 27-36, 1990.

Vapaatalo, H; Mervaala, E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit*. 7: 1075-1085, 2001 .

Varghese, G; Naik, PS; Katdare, M. Respiratory responses and blood sugar level of the crab, *Barytelphusa cunicularis* (Westwood), exposed to mercury, copper and zinc. *Indian J Exp Biol.* 30 (4): 308-312,1992.

Vassallo, DV; Massaroni, L; Oliveira, EM; Rossoni, LV; do Amaral, SM; Vassallo, PF. Acute toxic actions of mercury on the cardiovascular system. *Arq Bras Cardiol.* 67 (1): 39-45, 1996.

Vassallo, DV; Moreira, CM; Oliveira, EM; Bertollo, DM; Veloso, TC. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 156 (2): 113-118, 1999.

Vaziri, ND; Sica, DA. Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *Curr Hypertens Rep.* 6 (4): 314-320, 2004.

Vaux, DL; Strasser, A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci.* 93 (6): 2239-2244, 1996.

Velzeboer, SCJM; Frenkel, J; de Wolff, FA. Case report: a hypertensive toddler. *Lancet.* 349: 1810, 1997.

Vimy, MJ; Lorscheider, FL. Serial measurements of intra-oral air mercury: estimation of daily dose from dental amalgam. *J Dent Res.* 64 (8): 1072-1075, 1985.

Vimy, MJ; Takahashi, Y; Lorscheider, FL. Maternal-fetal distribution of mercury (203Hg) released from dental amalgam fillings. *Am J Physiol.* 258 (4 Pt 2): R939-R945, 1990.

Virtanen, JK; Rissanen, TH; Voutilainen, S; Tuomainen, TP. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem.* 18 (2): 75-85, 2007.

Vroom, FQ; Greer, M. Mercury vapour intoxication. *Brain.* 95: 305-318,1972.

Wakita, Y. Hypertension induced by methyl mercury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 89 (1): 144-147, 1987.

Wang, X; Horisberger, JD. Mercury binding site on Na⁺/K⁺-ATPase: a cysteine in the first transmembrane segment. *Mol Pharmacol.* 50 (3): 687-691, 1996.

Warfvinge, G; Larsson, A . Contact stomatitis to mercury associated with spontaneous mononuclear cell infiltrates in Brown Norway (BN) rats with HgCl₂-induced autoimmunity. *J. Oral Pathol. Med.* 23: 441-445, 1994.

Washington State Department of Health. Suspension of thimerosal (mercury). Limits for H1N1 (Swine flu) vaccine: frequently asked questions, 2009. Acessado <http://www.doh.wa.gov/h1n1> em 01/04/2010.

Weber, RF; de Baat, C. Male fertility. Possibly affected by occupational exposure to mercury. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 107 (12): 495-508, 2000.

Weidenhammer, W; Hausteiner, C; Zilker, T; Melchart, D; Bornschein, S. Does a specific dental amalgam syndrome exist? A comparative study. *Acta Odontol Scand.* 24: 1-7, 2009.

Welch, WJ. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 52 (1): 51-56, 2008.

Weldon, MM; Smolinski, MS; Maroufi, A; Hasty, BW; Gilliss, DL; Boulanger, LL; Dutton, RJ. Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. *West J. Med.* 173: 15-18, 2000.

Witztum, JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 344: 793-795, 1994.

WHO - World Health Organization. Mercury - Environmental aspects. *Environmental Health Criteria. International Program on Chemical Safety* 86: 26,1989.

WHO - World Health Organization. Methylmercury. *Environmental Health Criteria. International Program on Chemical Safety.* 101-144,1990.

WHO - World Health Organization. Inorganic Mercury. *Environmental Health Criteria. International Program on Chemical Safety.* Geneva. 118, 1991.

Wierzbicki, R; Prazanowski, M; Michalska, M; Krajewska, U; Mielicki, WP. Disorders in blood coagulation in humans occupationally exposed to mercuric vapors. *J Trace Elem Exp Med.* 15: 21-29, 2002.

Wiggers, GA; Peçanha, FM; Briones, AM; Pérez-Girón, JV; Miguel, M; Vassallo, DV; Cachofeiro, V; Alonso, MJ; Salaices, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295: H1033–H1043, 2008a.

Wiggers, GA; Stefanon, I; Padilha, AS; Peçanha, FM; Vassallo, DV; Oliveira, EM. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 147 (2): 252-260, 2008b.

William, JW. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 52: 51-56, 2008.

Wright, JW; Harding, JW. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev.* 18 (1): 21-53, 1994.

Wolf, MB; Baynes, JW. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals.* 20 (1): 73-81, 2007.

Woods, JS; Dieguez-Acuna, FJ; Ellis, ME; Kushleika, J; Simmonds, PL. Attenuation of nuclear factor KappaB (NF-kappaB) promotes apoptosis of kidney epithelial cells: a potential mechanism of mercury induced nephro- toxicity. *Environ Health Perspect.* 110: 819-822, 2002.

Xing, XJ; Rui, Q; Du, M; Wang, DY. Exposure to lead and mercury in young larvae induces more severe deficits in neuronal survival and synaptic function than in adult nematodes. *Arch Environ Contam Toxicol.* 56 (4): 732-741, 2009.

Yamamoto, T; Wang, L; Shimakura, K; Sanaka, M; Koike, Y; Mineshita, S. Angiotensin II-induced pulmonary edema in a rabbit model. *Jpn J Pharmacol.* 73 (1): 33-40, 1997.

Yang, JM; Jiang, XZ; Chen, QY; Li, PJ; Zhou, YF; Wang, YL. The distribution of HgCl₂ in rat body and its effects on fetus. *Biomed Environ Sci.* 9 (4): 437-442, 1996.

Yasutake, A; Matsumoto, M; Yamaguchi, M; Hachiya, N. Current hair mercury levels in Japanese: Survey in five districts. *Tohoku J. Exp. Med.* 199: 161-169, 2003.

Yasutake, A; Matsumoto, M; Yamaguchi, M; Hachiya, N. Current hair mercury levels in Japanese for estimation of methylmercury exposure. *J. Health Sci.* 50: 120-125, 2004.

Yorifuji, T; Tsuda, T; Kashima, S; Takao, S; Harada, M. Long-term exposure to methylmercury and its effects on hypertension in Minamata. *Environ Res.* 110 (1): 40-46, 2010.

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

Zheng, W; Aschner, M; Gherzi-Egea, JF. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol Appl Pharmacol.* 192 (1): 1-11, 2003.

Zheng, Y; Monestier, M. Inhibitory signal override increases susceptibility to mercury-induced autoimmunity. *J Immunol.* 171 (3): 1596-1601, 2003.