

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

LORENA BARROS FURIERI

**EXPOSIÇÃO À BAIXA CONCENTRAÇÃO DE HgCl_2
DURANTE 30 DIAS DEPRIME A CONTRATILIDADE
MIOCÁRDICA E PROMOVE DISFUNÇÃO CORONARIANA
EM RATOS**

VITÓRIA
2011

LORENA BARROS FURIERI

**EXPOSIÇÃO À BAIXA CONCENTRAÇÃO DE HgCl_2
DURANTE 30 DIAS DEPRIME A CONTRATILIDADE
MIOCÁRDICA E PROMOVE DISFUNÇÃO CORONARIANA
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração Fisiologia Cardiovascular.
Orientador: Profº Drº Dalton Valentim Vassallo

VITÓRIA
2011

LORENA BARROS FURIERI

**EXPOSIÇÃO À BAIXA CONCENTRAÇÃO DE HgCl₂
DURANTE 30 DIAS DEPRIME A CONTRATILIDADE
MIOCÁRDICA E PROMOVE DISFUNÇÃO CORONARIANA
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração Fisiologia Cardiovascular.

Orientador: Prof^o Dr^o Dalton Valentim Vassallo

Aprovada em 25 de novembro de 2011

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Mercedes Salaces Sánchez
Universidad Autónoma de Madrid
Orientadora Internacional

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Luciana Venturini Rossoni
Universidade de São Paulo

Dr^a. Paula Frizzera Vassallo
Universidade Federal do Espírito Santo

Furieri, Lorena Barros

Exposição à baixa concentração de HgCl_2 durante 30 dias deprime a contratilidade miocárdica e promove disfunção coronariana em ratos./ Lorena Barros Furieri – 2011.

214f

Orientador: Dalton Valentim Vassallo

Tese (doutorado)- Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Mercúrio. 2. Disfunção Endotelial. 3. Contratilidade Miocárdica. I. Vassallo, Dalton Valentim. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

*A Deus, minha família e ao Rogério
que suportou a distância com
certeza e confiança que o nosso
amor suportaria tudo.*

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

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tornar tudo isso possível. Obrigada por me acalantar nos momentos mais difíceis e por colocar pessoas tão abençoadas em meu caminho.

Chefe, Chefinho, obrigada por todos os momentos nesses muitos anos que passamos juntos. Serei eternamente grata pela orientação e, principalmente, pela amizade e cumplicidade. Muito obrigada por tornar meus sonhos possíveis, por dar sempre os melhores conselhos ou, simplesmente, por escutar as lamúrias e choros e mostrar sempre o melhor lado de tudo. Você sempre será o meu **P** (*preferido*).

Querida Dr^a **Mercedes Salaces** intentaré escribir poco, pero podría escribir 200 páginas solamente agradeciendo a ti. Ha sido una orientadora maravillosa y una grande amiga. Te admiro por la manera como conduce el L4 y por el amor con que hace tu trabajo. Gracias por acogerme, tornar este trabajo posible y por acreditar que podría hacerlo.

A Prof^a. Dr^a. **Maria Jesús Alonso** por sus numerosas contribuciones y ayudas cuando he pasado, al principio, algunas semanas en la URJC. Por la ayuda con los datos en todas las reuniones de viernes. Además por su amistad, paciencia, apoyo científico y por nos enseñar tan bien como hacer la tortilla española. Muchas gracias!

À Profa Dr^a **Ivanita**, ou **Iva** pela amizade e disponibilidade em todos os momentos que precisei e pela ajuda na discussão dos dados.

À **Mirinha** uma grande amiga e irmã que Deus me permitiu escolher. Obrigada por todos os momentos que passamos e continuaremos passando juntas. Sempre foi o melhor colo, a melhor amiga e companhia para todas as ocasiões.

Á **Mariana Boechat** minha maravilhosa companheira de “pisso” em Madri e uma amiga para toda a vida. Muito obrigada por me acolher tão bem e por ser uma companheira tão dedicada e preocupada. Nossas viagens juntas e o convívio diário foram inesquecíveis. Sei que posso contar com você sempre! E claro, muito obrigada pela ajuda com a retirada do coração dos porcos. Sem você os cultivos de células endoteliais jamais seriam possíveis.

Durante el año que estuve en España y trabajando en el L4 hice compañeros de trabajo y principalmente amigos para toda la vida. Tengo recuerdos del trabajo, de

las canciones que sonaban en el laboratorio, de los miércoles de los montaditos, de los cumpleaños, de los jueves de risas por lo que pasaba en los miércoles, por las idas por un café. Todo que he vivido en España ha sido muy especial. Gracias **Anita, Marisol, Maria, Sonia y Fernanda** por el convívio diario, por los abrazos cuando me quedaba triste, por la paciencia en los ensinamentos, por las correcciones del español, por hacer me sentir tan bien mismo lejos de los míos. Echo de menos a vosotras. **Anita** siempre sabía todo lo que pasaba en el labo, como hacer todo lo necesario y siempre tenía la palabra más dulce. **Maria** me ha enseñado todo de los cultivos celulares, nunca me dejaba triste y me enseñó lo mejor de España. **Marisol**, como una niña y con un corazón gigante, ha sido una diversión en el L4 con su manera peculiar. **Sonia** una chica que ha llegado ya al final de mi estancia pero que se ha tornado una grande compañera y me ha proporcionado risas con su humor catalán.

Fernanda Roque Redondo muito obrigada por tudo que me ensinou em Madri, as coronárias também se tornaram uma paixão na minha vida. Você se tornou uma grande amiga. É realmente impressionante que mesmo com pouco tempo de convívio a sensação é de uma amizade de toda a vida.

Gracias también a **Roberto, Vicente, Angela, Marta, Amada e Raquel**. No hemos tenido el convivio diario pero siempre me enseñaran todo con presteza, atención y paciencia. Además, muchas gracias por las ayudas en los experimentos.

Muchas gracias a **Andrea** que me ha ayudado a terminar los experimentos con las endoteliales.

Al Dr. Javier Blanco-Rivero o **Javito** muchas gracias por los momentos que pasamos juntos y por todo que me ha ayudado, principalmente con las medidas de NO e aniones em artérias septais. Ha sido el chico L4 y también un grande amigo. Gracias!

Aos **queridos amigos do LEMC**: Alessandra, Aurélia, Bruna, Carol, Cindy, David, Edna, Edu, Evandro, Fabiana Siman, Fabiana Simões, Fernanda, Franck, Giulia, Jonaína, Juliana Hott, Kamila, Kelly, Karina, Leonardo, Maylla, Núbia, Priscila, Rogério, Sâmia, Saulo, Teca, Thaís e Vivi. Vocês transformam nossos trabalhos em momentos de prazer. Obrigada pelas deliciosas gargalhadas, principalmente naqueles momentos que o experimento não dava certo e a vontade era de chorar.

Não consigo imaginar o quão difícil seria esta pós-graduação sem a companhia de vocês, meus grandes amigos.

Aos amigos que desde nossa aprovação no mestrado transformam o PPGCF em um ambiente amável: **Lú Passamani, Fagna, Renata, Patrick, Mariana e Helena.**

Aos **professores** do PPGCF por todos os conhecimentos compartilhados.

Aos **funcionários** do PPGCF pela prontidão em atender.

A todos los funcionarios de la **UAM y URJC.**

Aos amigos do **Departamento de Enfermagem** pelos momentos de risos e, principalmente, a minhas queridas companheiras de disciplina **Cândida, Franciéle, Luciana, Márcia, Maria Helena e Mariana.**

Aos meus pais, **Mauro e Léia** que sempre se sacrificaram para que tivéssemos o melhor. Essa conquista é mais de vocês do que minha! Sempre foram meus grandes incentivadores e aqueles que sempre acreditaram em mim. **Léo** muito obrigada por todos os momentos juntos e pelo amor incondicional que temos um pelo outro.

A minha sogra **Sônia** e meu sogro **Edmílson** que sempre me acolheram com muito amor e carinho e me apoiaram nos momentos que necessitei. Além de serem os responsáveis pela existência de minha maior riqueza, meu marido!

Ao grande amor da minha vida, meu marido **Rogério**. Creio que as palavras faltarão para dizer toda a gratidão que tenho por ele, afinal de contas é muito mais que isso, é o mais puro amor e cumplicidade. Muito obrigada por acreditar em nós, por, assim como eu, ter a certeza que o nosso amor sobreviveria e se fortificaria com a distância. Obrigada por em nenhum momento haver dito que seria difícil, mesmo quando tínhamos lágrimas nos olhos. E ainda assim você me dizia que tudo ficaria bem e que eu deveria realizar esse sonho que, a partir do momento em que nos conhecemos, passou a ser seu também. Te amo imensamente e também faria o que fosse preciso para realizar seus sonhos!

Ao **apoio financeiro** na Espanha: MCINN (SAF 2009- 07201, PHB2005-0008-PC) e ISCIII (Red RECAVA, RD06/0014/0011) e no Brasil: CAPES e CNPq/FAPES/FUNCITEC (39767531/07).

RESUMO

Já está bem demonstrado que a exposição ao mercúrio, seja ele orgânico ou inorgânico, é um fator de risco cardiovascular. No entanto, os mecanismos pelos quais este metal promove alterações cardiovasculares ainda não estão bem esclarecidos. O presente estudo tem como objetivo analisar se a exposição crônica a baixa concentração de HgCl_2 , durante 30 dias, afeta a modulação endotelial da circulação coronariana e da função cardíaca.

Ratos Wistar foram tratados durante 30 dias com HgCl_2 (primeira dose: 4,6 mg/kg e doses subsequentes: 0,07 mg/kg/dia *IM*) ou salina. Foram utilizadas artérias coronárias esquerdas e corações ao final do tratamento.

O tratamento com mercúrio aumentou a reatividade de artérias coronárias à 5-HT e reduziu o relaxamento a acetilcolina. Em artérias isoladas encontramos menor produção de NO e também menor participação deste importante vasodilatador na resposta a acetilcolina e a 5-HT em artérias de ratos expostos ao metal. Quando utilizamos o tiron (1 mmol/L), varredor não enzimático de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e a SOD (150 U/mL) observamos redução da resposta vasoconstrictora a 5-HT e a utilização de tiron (1 mmol/L) e apocinina (0,3 mmol/L) também aumentaram o relaxamento a ACh. Em artérias coronárias houve maior produção de ânions superóxido, maior expressão gênica de NOX-1, NOX-4 e SOD-2. O inibidor não seletivo da COX, indometacina (10 $\mu\text{mol/L}$), diminuiu a resposta a 5-HT e aumentou o relaxamento a ACh em ratos tratados. O TEA (2 mmol/L), inibidor de canais para potássio dependentes de cálcio, potencializou a resposta à 5-HT.

Em corações isolados de ratos expostos ao mercúrio não houve modificação da pressão de perfusão coronariana e da pressão diastólica, no entanto, houve redução da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo assim como da pressão desenvolvida. Nestes corações, a perfusão durante 60 minutos com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) diminuiu a pressão desenvolvida e aumentou a pressão distólica. A pressão de perfusão aumentou em ambos os grupos após perfusão com o inibidor da NOS, no entanto, esse aumento foi maior em corações de ratos expostos ao metal.

O tratamento com HgCl_2 promoveu redução da expressão da SERCA e do PLB fosforilado na serina-16, aumentou a expressão do PLB. Como consequência vimos redução da razão SERCA/PLB. Também há redução da expressão do NCX, da

eNOS, iNOS e da isoforma α -1 da NKA. A expressão da isoforma α -2 da NKA não foi alterada.

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstram que a exposição durante 30 dias ao HgCl_2 promove disfunção endotelial em artérias coronárias, evidenciado por redução da biodisponibilidade de NO relacionado ao aumento do estresse oxidativo. Essas alterações da função coronariana aumentam a resistência ao fluxo, o que, sobre condições de sobrecarga, pode causar disfunção do relaxamento e contração do músculo cardíaco. Nossos achados reforçam as evidências que o mercúrio, mesmo em baixas concentrações, é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Exposure to mercury is known to increase cardiovascular risk but the underlying mechanisms are not well explored. We analysed whether chronic exposure to low mercury doses affects endothelial modulation of the coronary circulation and cardiac function.

Left coronary arteries and hearts from male Wistar rats treated with either HgCl₂ (first dose 4.6 mg·kg⁻¹, subsequent doses 0.07 mg·kg⁻¹ day⁻¹, 30 days *IM*) or vehicle were used. Endothelial cells from pig coronary arteries incubated with HgCl₂ were also used.

Mercury treatment increased 5-HT-induced vasoconstriction but reduced acetylcholine-induced vasodilatation. It also reduced nitric oxide (NO) production and the effects of NO synthase inhibition with L-NAME (100 mmol/L) on 5-HT and acetylcholine responses. Superoxide anion production and mRNA levels of NOX-1 and NOX-4 were all increased. The superoxide anion scavenger tiron (1 mmol/L) and SOD (150 U/mL) reduced 5-HT responses only in vessels from mercury-treated rats. Tiron (1 mmol/L) and apocynin (0.3 mmol/L) increased acetylcholine responses in treated group. In mercury-treated coronary arteries SOD-2 mRNA level was increased.

The inhibitor of COX, indomethacin (10 µmol/L), decreased 5-HT responses and increased acetylcholine responses in treated group. Also, the inhibitor of calcium-dependent potassium channels, TEA (2 mmol/L), enhanced 5-HT responses in mercury exposure animals.

In isolated hearts from mercury-treated rats, coronary perfusion and diastolic pressure were unchanged, but developed isovolumetric systolic pressure was reduced. In these hearts, L-NAME increased coronary perfusion pressure and diastolic pressure, while it further reduced developed systolic pressure. Also, reduced protein expression of SERCA and phosphorylated phospholamban on serine 16 while phospholamban expression increased; as a consequence SERCA/phospholamban ratio reduced; reduced sodium/calcium exchanger (NCX) protein expression and α-1 isoform of NKA, whereas α-2 isoform of NKA did not change; cardiac eNOS and iNOS were reduced.

Chronic exposure to low doses of mercury promotes endothelial dysfunction of coronary arteries, as shown by decreased NO bioavailability induced by increased oxidative stress. These effects on coronary function increase resistance to flow, which under overload conditions might cause ventricular contraction and relaxation impairment. These findings provide further evidence that mercury, even at low doses, could be an environmental risk factor for cardiovascular disease.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

A formatação deste trabalho está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento de sua publicação:

Normalização e apresentação de trabalhos científicos e acadêmicos/ Universidade Federal do Espírito Santo, Biblioteca Central. -Vitória, ES: A Biblioteca, 2006.

Normalização de Referências: NBR: 6023:2002 / Universidade Federal do Espírito Santo, Biblioteca Central. -Vitória, ES: A Biblioteca, 2006.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos de crianças com alterações congênitas decorrentes da exposição intrauterina ao metilmercúrio presentes em peixes.....	37
Figura 2 - Esquema dos possíveis mecanismos de regulação da produção de óxido nítrico em células endoteliais.....	48
Figura 3 - Mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida por estresse oxidativo.....	50
Figura 4 - Participação da NADPH oxidase na produção de radicais livres a partir do oxigênio molecular nos diferentes tipos de células vasculares. Conformação das isoformas NOX-1 e NOX-4 da NADPHoxidase.....	52
Figura 5 - Esquema demonstrando a maneira pela qual a hiperpolarização das células endoteliais leva a hiperpolarização e relaxamento de células do músculo liso vascular.....	55
Figura 6 - Entrada e extrusão do cálcio no miócito cardíaco e participação do cálcio no potencial de ação miocárdico.....	58
Figura 7 - Ações do óxido nítrico no músculo cardíaco.....	60
Figura 8 - Desenho esquemático mostrando a localização do ramo descendente da artéria coronária esquerda (direita). Microfotografia de um coração mostrando a artéria em questão (esquerda).....	68
Figura 9 - Desenho representativo mostrando o miógrafo de arames para pequenos vasos, gaseificado com mistura carbogênica, ligado a um sistema de aquisição de dados.....	69
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental realizado nos experimentos de reatividade vascular em artérias coronárias.....	72
Figura 11 - A- Diâmetro arterial e B- resposta máxima contrátil induzida por 120 mM de KCl em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂	97

Figura 12 - Resposta contrátil induzida pela serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂	98
Figura 13 - Efeito do L-NAME (100 µM), inibidor inespecífico da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C).....	99
Figura 14 - Efeito do tiron (1mM), varredor não enzimático de ânion superóxido, sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B)	101
Figura 15 - Efeito da superóxido dismutase - SOD (150 U/mL) sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B).....	102
Figura 16 - Efeitos da indometacina (10 µM), inibidor inespecífico da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C).....	103
Figura 17 - Efeito do tetraetilamonio (TEA- 2 mM), inibidor dos canais para potássio (K ⁺) dependentes de cálcio (Ca ²⁺), sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C).....	105
Figura 18 - A- Resposta dilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) e B- Resposta dilatadora induzida pela dietilamina (DEA)-NONOate (NO) (DEA-NO) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂	106

Figura 19 - Efeito do L-NAME (100 μ M), inibidor inespecífico da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C).....	108
Figura 20 - Efeito do tiron (1mM), varredor não enzimático de ânion superóxido, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B).....	109
Figura 21 - Efeito da apocinina (0,3 mM), inibidor da NADPHoxidase, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B).....	110
Figura 22 - Efeitos da indometacina (10 μ M), inibidor inespecífico da via do ácido araquidônico e ciclooxygenase, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B).....	112
Figura 23- Efeitos do TEA (10 μ M), bloqueador dos canais para potássio dependentes de cálcio, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B).....	113
Figura 24 - Medida da quantidade total de nitritos no plasma de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂	115
Figura 25 - Produção de óxido nítrico em artérias coronárias septais de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂ em condição basal e após estimulação com serotonina (5-HT- 1 μ M) e acetilcolina (ACh- 10 μ M).....	116
Figura 26 - Produção local de ânion superóxido em artérias coronárias septais de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂	117

Figura 27 - Medida quantitativa, realizada utilizando a técnica de RT-PCR, da expressão gênica da A- subunidade NOX-1 da NADPHoxidase (NOX-1) e da B- subunidade NOX-4 da NADPHoxidase (NOX-4) de artérias coronárias septais de ratos Controle e HgCl ₂	118
Figura 28 - Medida quantitativa, realizada utilizando a técnica de RT-PCR, da expressão gênica da A- isoforma SOD-1 da superóxido dismutase (SOD-1) e da B- isoforma SOD-2 da superóxido dismutase (SOD-2) de artérias coronárias septais de ratos Controle e HgCl ₂	119
Figura 29 - Análise morfométrico de vasos coronarianos de animais expostos ou não ao HgCl ₂ . Área total do vaso coronariano (A), área do lúmen do vaso (B) e área da camada média do vaso (C).....	120
Figura 30 - Painéis com microfotografias representativas de imunofluorescência emitida por células endoteliais marcadas com anticorpo primário específico para fator de Von-Willebrand e anticorpo secundário <i>fluorescein isotiocianate</i> (FITC).....	121
Figura 31 - Painéis com microfotografias representativas da fluorescência emitida por dihidroetídeo (DHE) em células endoteliais de coronárias suínas em situação controle e expostas a 0,05; 0,5 e 5 µg/mL de HgCl ₂	123
Figura 32 - Painéis com microfotografias representativas da fluorescência emitida por dihidroetídeo (DHE) em células endoteliais de coronárias suínas em situação controle e expostas a HgCl ₂ - 5 µg/mL e a HgCl ₂ - 5 µg/mL + Tempol, Apocinina, Catalase ou Tiron.....	124
Figura 33 - Efeitos do tempol (1 mmol/L), apocinina (300 µmol/L), tiron (1 mmol/L) e L-NAME (100 µmol/L) na produção de nitritos em células endoteliais expostas a 5 µg/mL de HgCl ₂ . A produção de nitritos também foi medida em células expostas a 0,05 e 0,5 µg/mL de HgCl ₂	125

Figura 34 - Análise densitométrica de <i>Western blot</i> para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) em células endoteliais de coronárias suínas em situação Controle e expostas a 0,05 e 5 µg/mL de HgCl ₂	126
Figura 35 - A e B- Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE), C e D- Pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂ antes e durante 60 minutos de perfusão com L-NAME (100 µM).....	128
Figura 36 - Pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PDIVE) de corações isolados de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B) antes e durante 60 minutos de perfusão com L-NAME (100 µM).....	129
Figura 37 - Pressão de perfusão coronariana (PPC) de corações isolados de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl ₂ (B) antes e durante 60 minutos de perfusão com L-NAME (100 µM) em corações isolados de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂	130
Figura 38 - Registro típico mostrando a incidência de alterações no ritmo cardíaco após perfusão com L-NAME (100 µM) em corações isolados de ratos dos grupos Controle e HgCl ₂	131
Figura 39 - A- Análise densitométrica de <i>Western blot</i> para expressão protéica da SERCA, B- Fosfolambam (PLB), C- Fosfolambam fosforilado (PLB-Ser16) e D- Relação SERCA/PLB em corações de ratos Controle e HgCl ₂	132
Figura 40 - A- Análise densitométrica de <i>Western blot</i> para expressão protéica do trocador Na ⁺ -Ca ⁺⁺ (NCX), B- isoforma α1 da Na ⁺ -K ⁺ - ATPase (NKA) e C- isoforma α2 da Na ⁺ -K ⁺ - ATPase em corações de ratos Controle e HgCl ₂	133

Figura 41 - A- Análise densitométrica de <i>Western blot</i> para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e B- isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) em corações de ratos Controle e HgCl ₂	134
Figura 42 - Análise morfométrico de cardiomiócitos de animais expostos ou não ao HgCl ₂ . Comprimento do cardiomiócito (A), largura (B), perímetro (C) e área (D).....	136
Figura 43 - Quantificação do colágeno do ventrículo esquerdo de animais expostos ou não ao HgCl ₂	136
Figura 44 - Esquema representando os efeitos da exposição durante 30 dias a baixa concentração de HgCl ₂ sobre artérias coronárias, corações isolados e células endoteliais.....	163
Figura 45 - Esquema representando os efeitos da exposição durante 24 horas a 0,05; 0,5 e 5 µg/mL de de HgCl ₂ em células endoteliais de coronárias suínas.....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de 5-HT necessária para produzir aproximadamente 50% da contração máxima induzida por 120 mM de KCl em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	97
Tabela 2 - Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R _{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	98
Tabela 3 - Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R _{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de L-NAME em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	100
Tabela 4 - Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R _{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de tiron em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	101
Tabela 5 - Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R _{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de SOD em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂ ...	102
Tabela 6 - Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R _{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de indometacina em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	104
Tabela 7 - Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R _{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de TEA em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	105
Tabela 8 - Valores de EC 50 e R _{máx} obtidos através das curvas concentração resposta a ACh e DEA-NO em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	107

Tabela 9 - Valores de EC 50 (ACh log [mol/L] ou DEA-NO log [mol/L]) e R _{máx} (% de relaxamento após pré-contração à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de L-NAME em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	108
Tabela 10 - Valores de EC 50 (ACh log [mol/L]) e R _{máx} (% de relaxamento após pré-contração à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de tiron em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	110
Tabela 11 - Valores de EC 50 (ACh log [mol/L]) e R _{máx} (% de relaxamento após pré-contração à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de apocinina em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	111
Tabela 12 - Valores de EC 50 (ACh log [mol/L]) e R _{máx} (% de relaxamento após pré-contração à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de indometacina em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	112
Tabela 13 - Valores de EC 50 (ACh log [mol/L]) e R _{máx} (% de relaxamento após pré-contração à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de TEA em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl ₂	114

LISTA DE ABREVIATURAS

%- porcentagem

[Ca²⁺]_i – concentração intracelular de cálcio

[Na⁺]_i – Concentração intracelular de sódio

°C- graus Celsius

μM- micromolar

5-HT - 5- Hidroxitriptamina ou serotonina

a.C. – antes de Cristo

AA-COX – ácido araquidônico- ciclooxigenase

AC – adenilato ciclase

ACh – acetilcolina

AD – átrio direito

ADP – difosfato de adenosina

AE – átrio Esquerdo

Ag/AgCl – prata/cloreto de prata

Akt – proteína quinase B

ANOVA- análise de variância

ATP- trifosfato de adenosina

BH₄ - tetrahidrobiopterina

Bpm – batimentos por minuto

CaCKII - cálcio calmodulina quinase

CAM- Ca²⁺ - ATPase miosínica

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

CO₂ – gás carbônico

COX - ciclooxigenase

DAF - 4,5-diaminofluoresceína

DAG - diacilglicerol

DEA-NO - dietilamina NONOate

DHE - diidroetídeo

dP/dt máx – Derivada máxima de pressão

EC₅₀ – resposta máxima ao fármaco

ECA – enzima conversora de angiotensina

EDCF – fator contrátil derivado do endotélio

EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF - fator relaxante derivado do endotélio

eNOS – isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico

EPM- erro padrão da média

EROs – espécies reativas de oxigênio

ET-1 - endotelina

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FC – Frequência Cardíaca

FMN - flavina mononucleotídeo

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc - 3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina

GPx – glutathione peroxidase

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

Hg- Mercúrio

HgCl₂ - Cloreto de Mercúrio

HSP – *heat shock protein*

Hz- Hertz

i.p.- Intra-peritoneal

I_f – corrente *funny*

iNOS - isoforma induzível da sintase do óxido nítrico

IP - receptor específico da PGI₂

IP₃ – inositol trifosfato

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

L-NAME - L-NG-nitro-arginina metil éster-

M- Molar

MDA- Malondialdeído

MLCK - cadeia leve da miosina

mM- milimolar

mmHg- Milímetros de mercúrio

MPLC- Cadeia leve fosforilável da miosina

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

ms – Milissegundos

n- número de unidades experimentais

NA- noradrenalina

NADPHoxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato- oxidase

NCX – trocador Na⁺/Ca²⁺

NKA- Na⁺/K⁺- ATPase

nM- nanomolar

nNOS - isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico

NO –óxido nítrico

NOS – sintase do óxido nítrico

NOX-1; NOX-2; NOX-3; NOX-4; NOX-5; Duox1; Duox2 -

NPS – nitroprussiato sódico

O₂ - Oxigênio

O₂^{•-} - ânion superóxido

OH⁻ - radical hidroxila

OONO⁻ - peroxinitrito

PA- Pressão arterial

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PAM – Pressão Arterial Média

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PC final - Peso corporal final

PC inicial - Peso corporal inicial

PD – Pressão diastólica

PDE - fosfodiesterase

PDfVE – Pressão Diastólica final do Ventrículo Esquerdo

PDIVE – Pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo

PGD2 – prostaglandina D2

PGE2 – prostaglandina E2

PGF2 α – prostaglandina F2 α

PGH2 – prostaglandina H2

PGI2 - prostaciclina

PKA – Proteína cinase dependente de AMPc

PKC - Proteína cinase C

PKG- Proteína cinase dependente de GMPc

PLA2 - fosfolipase A2

PLB - fosfolambam

PLC – fosfolipase C

PPC- pressão de perfusão coronariana

ppm- Partículas por milhão

PPP- Potenciação pós-pausa

PRC- Contrações após repouso de 10 minutos

PSVD - Pressão Sistólica do Ventrículo Direito

PSVE – Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo

PVC – Polivinil carbonato

PVD- Pressão do Ventrículo Direito

PVE- Pressão do Ventrículo Esquerdo

R_{máx} – resposta máxima ao fármaco

RS- Retículo sarcoplasmático

RyR- Receptor de rianodina

SERCA – bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático

-SH – Grupamentos sulfidrílicos

SNC – sistema nervosa central

SOD – superóxido dismutase

SOD-1; SOD-2; SOD-3 – isoformas da superóxido dismutase

TEA - tetraetilamônio

TnI- Troponina I

TXA₂ – tromboxano A₂

UFES- Universidade Federal do Espírito Santo

V – Volts

VD – Ventrículo Direito

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

VE – Ventrículo Esquerdo

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

α 1 da NKA – isoforma α 1 da NKA

α 2 da NKA – isoforma α 2 da NKA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	34
1.1 O MERCÚRIO.....	34
1.2 EXPOSIÇÃO POPULACIONAL E OCUPACIONAL.....	35
1.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	36
1.4 EFEITOS DO MERCÚRIO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	39
1.5 EFEITOS CARDIOVASCULARES DO MERCÚRIO.....	41
1.6 CIRCULAÇÃO CORONARIANA.....	45
1.6.1 Participação do óxido nítrico.....	46
1.6.2 Espécies reativas de oxigênio.....	48
1.6.3 Prostanóides	52
1.6.4 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio.....	53
1.7 CICLO DE CÁLCIO NO CARDIOMIÓCITO.....	56
1.8 EFEITOS PARÁCRINOS E AUTÓCRINOS DO ÓXIDO NÍTRICO NO MÚSCULO CARDÍACO.....	59
2 OBJETIVOS.....	63
2.1 OBJETIVO GERAL.....	63
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	66

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	66
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	67
3.3 REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS CORONÁRIAS.....	68
3.3.1 Efeitos da exposição ao HgCl₂ sobre a resposta constritora à 5-Hidroxitriptamina (5-HT) e dilatadora a acetilcolina (ACh) e ao diethylamine NONOate (DEA-NO) em artérias coronárias de ratos.....	70
3.3.2 Participação do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos prostanóides e dos canais para o potássio na resposta contrátil a 5-Hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.....	71
3.3.3 Participação do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos prostanóides e dos canais para o potássio na resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.....	71
3.4 NITRITOS E NITRATOS PLASMÁTICOS.....	73
3.5 LIBERAÇÃO LOCAL DE ÓXIDO NÍTRICO.....	74
3.6 PRODUÇÃO LOCAL DE ÂNION SUPERÓXIDO.....	75
3.7 EXPRESSÃO GÊNICA DAS SUBUNIDADES NOX-1 E NOX-4 DA NADPH-OXIDASE E DAS ISOFORMAS SOD-1 E SOD-2 DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	76
3.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICO DE VASOS CORONARIANOS.....	77
3.9 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	78
3.9.1 Caracterização.....	79

3.9.2 Produção de ânion superóxido	79
3.9.3 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS).....	80
3.9.4 Produção de nitritos e nitratos em meio de cultivo de células endoteliais.....	81
3.10 CORAÇÕES ISOLADOS.....	82
3.11 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS MIÓCITOS E QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO DE CORAÇÕES DE RATOS EXPOSTOS OU NÃO AO HgCl₂.....	84
3.11.1 Morfometria dos cardiomiócitos.....	84
3.11.2 Quantificação do colágeno cardíaco.....	84
3.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DO MOVIMENTO DO CÁLCIO MIOCÁRDICO	86
3.13 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	89
3.14 FÁRMACOS E REAGENTES.....	91
4 RESULTADOS.....	96
4.1 REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS CORONÁRIAS.....	96
4.1.1 Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl 120 mmol/l) em artérias coronárias de ratos.....	96
4.1.2 Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.....	97
4.1.3 Participação do óxido nítrico sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.....	98

4.1.4 Participação de espécies reativas de oxigênio sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.....	100
4.1.5 Participação de prostanóides derivados da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase (AA-COX) sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.....	102
4.1.6 Participação dos canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.....	104
4.1.7 Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) e ao DEA-NO em artérias coronárias de ratos.....	106
4.1.8 Participação do óxido nítrico sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos.....	107
4.1.9 Participação de espécies reativas de oxigênio sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos.....	109
4.1.10 Participação de prostanóides derivados da via do AA-COX sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos....	111
4.1.11 Participação dos canais para potássio ativados por cálcio sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos....	112
4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ SOBRE A QUANTIDADE PLASMÁTICA DE NITRITOS.....	115
4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ SOBRE A PRODUÇÃO LOCAL DE ÓXIDO NÍTRICO EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS DE RATOS.....	116
4.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ SOBRE A PRODUÇÃO LOCAL DE ÂNION SUPERÓXIDO EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS DE RATOS.....	117

4.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl ₂ SOBRE EXPRESSÃO GÊNICA DAS SUBUNIDADES NOX-1 E NOX-4 DA NADPH OXIDASE.....	118
4.6 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl ₂ SOBRE EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS SOD-1 E SOD-2 DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	119
4.7 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO HgCl ₂ SOBRE A MORFOLOGIA CORONARIANA.....	120
4.8 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl ₂ EM CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORONÁRIAS SUÍNAS.....	121
4.8.1 Caracterização de células endoteliais.....	121
4.8.2 Produção de ânion superóxido em células endoteliais.....	121
4.8.3 Produção de nitritos e nitratos em meio de cultivo de células endoteliais.....	124
4.8.4 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico em células endoteliais.....	125
4.9 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA FUNÇÃO DE CORAÇÕES ISOLADOS EXPOSTOS AO HgCl ₂	127
4.9.1 Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo.....	127
4.9.2 Pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo.....	128
4.9.3 Pressão de perfusão coronariana.....	129
4.9.4 Incidência de alterações no ritmo cardíaco.....	130
4.10 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO HgCl ₂ DURANTE 30 DIAS SOBRE A EXPRESSÃO PROTÉICA EM CORAÇÕES DE RATOS.....	132

4.10.1 Efeito da exposição ao HgCl₂ sobre a expressão protéica de SERCA e Fosfolambam cardíacos.....	132
4.10.2 Efeito da exposição ao HgCl₂ sobre a expressão protéica da NKA e NCX.....	133
4.10.3 Efeito da exposição ao HgCl₂ sobre a expressão protéica da eNOS e iNOS cardíaca.....	134
4.11 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ SOBRE A MORFOLOGIA DE CARDIOMIÓCITOS E CONTEÚDO DE COLÁGENO EM CORAÇÕES.....	135
5 DISCUSSÃO.....	138
5.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DURANTE 30 DIAS A BAIXA CONCENTRAÇÃO DE HgCl₂ EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS.....	141
5.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPLANTADAS DE CORONÁRIAS SUÍNAS.....	150
5.3 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA FUNÇÃO DE CORAÇÕES ISOLADOS EXPOSTOS AO HgCl₂.....	153
6 SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	161
7 CONCLUSÃO.....	166
8 REFERÊNCIAS.....	168
9 ANEXOS.....	195
9.1 ANEXO I	195
9.2 ANEXO II	208

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O MERCÚRIO

A história da humanidade está intimamente relacionada à utilização de metais pesados, como chumbo, mercúrio e cádmio. Existem relatos da utilização do mercúrio e chumbo para fabricação de utensílios e ferramentas datados dos séculos XV e XVI a.C (ESPAÑOL CANO, 2001).

O mercúrio é um metal branco-prateado e está localizado no grupo IIb da tabela periódica, juntamente com o cádmio e zinco. A larga utilização do mercúrio desde tempos remotos até os dias de hoje é facilmente justificada por suas características físico-químicas. A temperatura ambiente encontra-se líquido e é o único metal que permanece neste estado a 0° C. Tem uma densidade muito elevada, tensão superficial muito alta, baixa capacidade calorífica e a importante capacidade de amalgamação, ou seja, se combina facilmente com outros metais (AZEVEDO, 2003).

A temperatura ambiente é um mau condutor elétrico, no entanto, em altas temperaturas se transforma em um ótimo condutor, principalmente na sua forma de vapor. Por isso, é utilizado na manufatura de lâmpadas de vapor de mercúrio, que são usadas em larga escala na iluminação de ruas, jardins públicos, postos de gasolina, garagens, campos de futebol, e possuem como característica uma luz branco-azulada agradável à visão e muito adequada para iluminação de ambientes externos (ASANO *et al.*, 2000).

O mercúrio também é muito utilizado em aparelhos de medição, como termômetros e barômetros. Isso se dá por seu coeficiente de dilatação praticamente uniforme numa ampla faixa de temperatura (0° a 300° C) (AZEVEDO, 2003). Na medicina foi usado durante anos na composição de pomadas para dermatites e como fungicidas e diuréticos. Ainda hoje alguns países, como o Brasil, utilizam o mercúrio como conservante em vacinas para inibir o crescimento de microorganismos em frascos que contém múltiplas doses (CDC, 1999; BRASIL, 2001).

Devido a sua alta utilização e também mobilidade ambiental, qualquer produto, seja ele natural ou artificial irá conter, pelo menos, traços de mercúrio no seu conteúdo (ESPAÑOL CANO, 2001).

1.2 EXPOSIÇÃO POPULACIONAL E OCUPACIONAL

A exposição ocupacional ao mercúrio, normalmente, resulta da exposição ao vapor de mercúrio e mercúrio inorgânico. Dentistas, técnicos de consultórios odontológicos, trabalhadores de indústrias de cloro e soda, mineiros, trabalhadores de indústrias de equipamentos de medição e de lâmpadas fluorescente são os principais indivíduos expostos ocupacionalmente (MAHAFFEY, 2005; ZAVARIZ & GLINA, 1992; ASANO *et al.*, 2000).

A concentração de vapor de mercúrio elementar considerada segura para inalação crônica pela OMS é de $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{Kg}/\text{dia}$. A inalação não deve exceder $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no ar por ano e na água a concentração não deve ultrapassar $1 \mu\text{g}/\text{L}$ (WHO, 2000; WHO 2004).

Em encontro realizado em 2004 (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA)) foi estabelecido que a concentração de ingestão segura de metilmercúrio, sem que haja o aparecimento de desordens neurológicas, é de $1,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. No entanto, em 2006, o JECFA esclarece que essa concentração não é segura para exposição intrauterina, pois os fetos são mais sensíveis ao aparecimento de desordens neurológicas após exposição ao metilmercúrio (JECFA, 2006).

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

O timerosal é um composto organomercurial que desde 1930 vem sendo amplamente utilizado como conservante em drogas biológicas, como vacinas e soros (FDA, 2008). No Brasil, o manual de normas de vacinação do Ministério da Saúde, publicado em junho de 2001, mostra que o timerosal é utilizado em muitas vacinas administradas. Essas vacinas previnem a gripe (vacina contra *influenza*), a raiva (vacina anti-rábica), a infecção por meningococo do sorogrupo b e a hepatite B (BRASIL, 2001).

1.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

O primeiro relato de efeitos adversos decorrente de exposição ocupacional ao mercúrio é datado da era Romana na mina de Almadén, na Espanha, onde trabalhadores sofreram intoxicação. Em 752 d.C, um caso de intoxicação aguda foi relatado em Nara city, no Japão: trabalhadores sofreram intoxicação aguda durante a construção de um Buda gigante de bronze que foi revestido com mercúrio e estanho (ASANO *et al.*, 2000; ESPAÑOL CANO, 2001).

Os casos de intoxicação mais graves ocorreram no Iraque e em Minamata (Japão). Em Minamata, entre as décadas de 20 e 60, uma empresa japonesa especializada na produção de acetaldeído e PVC despejava metilmercúrio diretamente na baía da cidade. Estima-se que em quatro décadas foram despejados cerca de 150 toneladas de metilmercúrio na baía, levando à contaminação de peixe e à contaminação da população que comia esses peixes contaminados. No total, dois milhões de pessoas foram expostas, 900 pessoas morreram e 3000 pessoas sofreram a “Doença de Minamata” (ASANO *et al.*, 2000).

Após a exposição ao metilmercúrio pelo consumo de peixes contaminados quatro pessoas apareceram com sintomas neurológicos, como convulsões severas, surtos de psicose, perda de consciência e coma. Inicialmente, e erroneamente, a doença foi diagnosticada de etiologia infecciosa, mas outras pessoas e também animais domésticos e pássaros passaram a apresentar os mesmos sintomas. Foi então descoberto um fator comum entre todos os atingidos pela doença: todas as vítimas haviam ingerido grande quantidade de peixes da Baía de Minamata. A “Doença de Minamata” é uma doença caracterizada por danos cerebrais, ataxia, retardo mental, danos hepáticos, hipertensão arterial, convulsões e distúrbios metabólicos (ETO, 2000; ETO, 2006). A figura 1 mostra imagens de crianças que nasceram com alterações congênitas decorrentes da exposição intrauterina ao metilmercúrio.



Figura 1: Fotos de crianças com alterações congênitas decorrentes da exposição intrauterina ao metilmercúrio presentes em peixes. (disponível em <http://nossoreidosreisjesus.blogspot.com/2010>).

No Iraque, entre o fim da década de 60 e início da década de 70, outro caso de intoxicação populacional por mercúrio ocorreu. Grãos de soja e cevada foram tratados com fungicidas mercuriais e deveriam ser utilizados exclusivamente para plantio. No entanto, famílias utilizaram esses grãos para produção direta de pães e de outros alimentos. Após ingestão de mercúrio orgânico presente nos pães e outros alimentos produzidos com os grãos contaminados, 6900 pessoas foram hospitalizadas, 475 pessoas morreram e 15 crianças nasceram com anormalidades congênitas (BAKIR *et al.*, 1973).

No Brasil, a bacia amazônica é o local onde há maior contaminação por mercúrio. A preocupação decorrente da contaminação pelo metal surgiu na década de 80 pela grande quantidade de metal lançado no ambiente pelas atividades de garimpo iniciadas em 1979 (CLEARY, 1994). A exposição populacional se dava pela inalação do vapor de mercúrio pelos garimpeiros e pelo consumo de peixes contaminados com metilmercúrio (HACON, 1997; HACON, 2000).

Hoje a atividade garimpeira é muito pequena na bacia amazônica, no entanto, estima-se que foi lançado no ambiente, nas décadas de 80 e 90, cerca de duas mil toneladas de mercúrio (MALLAS & BENEDITO, 1986; CLEARY, 1994; LACERDA, 1995). Ainda, podemos somar a essa quantidade todo o mercúrio lançado pelos

espanhóis durante os períodos colonial e pós-colonial na América do Sul e Central (cerca de 200 mil toneladas) (NRIAGU *et al.*, 1992).

Até pouco tempo todo o mercúrio presente em peixes na bacia amazônica era atribuído à atividade garimpeira, já que as rochas amazônicas continham, naturalmente, baixas concentrações de mercúrio. No entanto, pesquisadores brasileiros e canadenses encontraram concentrações muito elevadas de mercúrio nos solos da bacia amazônica (ROULETE & LUCOTTE, 1995). Segundo estes pesquisadores mais de 90 % do mercúrio presente na Amazônia teria origem natural e não antropogênica como se imaginava anteriormente (ROULET *et al.*, 2000). Assim, o mercúrio presente nos solos atinge os rios e, após metilação, contamina os peixes (ROULET *et al.*, 1998; ROULET *et al.*, 2000).

O consumo de peixes contaminados com mercúrio é uma importante fonte de exposição na bacia amazônica. Estudos mostram que a concentração de mercúrio em músculos de peixes largamente consumidos na região amazônica são maiores que o limite estabelecido pela OMS como seguro para consumo humano (0,5 mg/kg-limite máximo para consumo em peixes) (WHO, 1990; DÓREA *et al.*, 2009). E a população ribeirinha possui altas concentrações de mercúrio no cabelo (BOISCHIO & BARBOSA, 1993) além de correlação positiva entre exposição ao mercúrio e pressão arterial sanguínea (FILLION *et al.*, 2006).

1.4 EFEITOS DO MERCÚRIO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

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

Outro sistema no qual o mercúrio exerce alta toxicidade é no sistema renal. Responsável por lesão glomerular, injúria tubular, insuficiência renal e apoptose (PESCE *et al.*, 1977; CARMIGNANI *et al.*, 1989; YASUTAKE *et al.*, 1989; CARMIGNANI *et al.*, 1992; ETO *et al.*, 1997; ZALUPS, 2000; CARRANZA-ROSALES *et al.*, 2005).

No trato gastrointestinal, mesmo sendo pouco absorvidos, os compostos inorgânicos e o mercúrio metálico provocam estomatites, náuseas, vômitos, dores abdominais, anorexia, diarréias, colite, necrose da parede intestinal, hematêmese, salivação excessiva e até perda dos dentes (BERGLUND & MOLIN, 1997; GRAEME & POLLACK, 1998).

No sistema nervoso central (SNC) os efeitos mais freqüentes da exposição ao mercúrio inorgânico são: irritabilidade, fadiga, mudanças comportamentais, tremores, cefaléia, perda auditiva e cognitiva, disartria, incoordenação motora, alucinações e pode até ocasionar a morte (GRAEME & POLLACK, 1998).

Muitos dos efeitos podem ser decorrentes da inibição de receptores, como os muscarínicos, dopaminérgicos e nicotínicos, promovendo o bloqueio de canais para Ca^{2+} em neurônios ganglionares (WEINSBERG *et al.*, 1995). E também por redução da atividade da colinesterase e monoamino oxidase, que são enzimas importantes na síntese e degradação de neurotransmissores (BASU *et al.*, 2007).

A exposição ao metilmercúrio leva às situações mais graves. Em crianças, o contato com o mercúrio promove importantes alterações no desenvolvimento do SNC (GRAEME & POLLACK, 1998; NASCIMENTO & CHASIN, 2001).

A exposição a compostos de mercúrio exercem efeitos também sobre os pulmões, sistema imunológico, reprodutor e alguns estudos relacionam a exposição ao metal

com aumento da incidência de câncer (GLEICHMANN *et al.*, 1989; GÓMEZ *et al.*, 2007). Estudo recente mostra que a exposição a metais como chumbo, cádmio e mercúrio pode estar associada ao desenvolvimento de câncer de mama (FLOREA & BÜSSELBERG, 2011).

1.5 EFEITOS CARDIOVASCULARES DO MERCÚRIO

Poucos estudos retratam os efeitos cardiovasculares do mercúrio após a exposição a curtos períodos de tempo e a pequenas concentrações. No entanto, vários são os estudos, experimentais e populacionais, que mostram associação entre exposição ao mercúrio, seja ele orgânico ou inorgânico, e alterações cardiovasculares.

BASTOS e colaboradores mostraram, em populações que vivem na bacia Amazônica, que as concentrações de mercúrio no cabelo chegaram a até 150 µg/g e que quase a totalidade dos habitantes dos 40 municípios estudados possuem concentrações sanguíneas acima dos valores de referência (BASTOS *et al.*, 2006). Nessa população já foi demonstrado que a exposição ao mercúrio através do consumo freqüente de peixes, possui forte correlação positiva com o aumento da pressão arterial sanguínea (FILLION *et al.*, 2006). Outros estudos também correlacionam a exposição ao mercúrio com aumento do risco de ocorrência de hipertensão arterial, infarto do miocárdio, disfunção coronariana e aterosclerose (YOSHIZAWA *et al.*, 2002; GUALLAR *et al.*, 2002; VIRTANEN *et al.*, 2005; HOUSTON, 2007).

Alguns autores demonstram que mesmo o consumo de peixes sendo considerado um fator protetor cardiovascular pela presença de ácidos graxos, como o ômega-3, a presença de mercúrio torna o consumo de peixes um importante fator de risco cardiovascular. Estima-se que para cada 30 g de peixe contaminado com mercúrio consumido por dia há um aumento de mais de duas vezes do risco de episódios isquêmicos do miocárdio (SALONEN *et al.*, 1995; RISSANEN *et al.*, 2000)

Estudos mostram diminuição da PAM, FC, aumento do intervalo PR do eletrocardiograma, diminuição da resposta hipotensora e cronotrópica negativa à acetilcolina, elevada incidência de arritmias, pequena redução na pressão sistólica do ventrículo esquerdo, aumento da pressão sistólica do ventrículo direito e da pressão diastólica dos ventrículos esquerdo e direito após infusão endovenosa de 5 mg/kg de HgCl₂ em ratos anestesiados (MASSARONI *et al.*, 1995; ROSSONI *et al.*, 1999). Porém, a exposição aguda a concentração nanomolar aumentou a PAS, PAD, FC e reatividade pressórica à fenilefrina (MACHADO *et al.*, 2007).

Em corações isolados e perfundidos pela técnica de Langendorff, a exposição ao metal promove aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo de corações

expostos agudamente a 20 nM de HgCl_2 (ASSIS *et al.*, 2003) e aumento dependente da dose (0,1 a 3 μM de HgCl_2), desse parâmetro em ventrículo direito (DA CUNHA *et al.* 2001). O mercúrio também promove diminuição da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo imediatamente após exposição a 0,5; 1; 2; 10 μM e após 30 minutos de exposição a 20 nM (MASSARONI *et al.*, 1995; ASSIS *et al.* 2003).

Estudos mostram que diferentes concentrações de HgCl_2 influenciam na força contrátil de músculos papilares e tiras de ventrículo direito, alteram a cinética do cálcio ativador, a atividade das proteínas contráteis, o funcionamento do retículo sarcoplasmático (RS) e inibição a Na^+/K^+ -ATPase, da Ca^{2+} -ATPase miosínica, da SERCA e da $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (SHAMOO & MACLENNAN, 1975; BRUNDER *et al.*, 1988; HALBACH *et al.*, 1989; ANNER *et al.*, 1990; HECHTENBERG & BEYERSMANN, 1991; ANNER *et al.*, 1992; ANNER & MOOSMAYER, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1994; DA CUNHA *et al.*, 2001; ASSIS *et al.*, 2003; FALCOCHIO *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2003. SU & CHEN (1979) mostraram que o metilmercúrio promove um efeito bifásico em tecido atrial de ratos, podendo causar efeito inotrópico positivo ou negativo, dependendo da dose de exposição.

Estudo realizado no Brasil mostrou que a concentração de mercúrio em escolares após a vacinação contra hepatite B é de 4,2 a 21,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (DÓREA *et al.*, 2009), que está associado ao aparecimento de desordens neurológicas e cardíacas em crianças (GEIGER & GEIGER, 2003). Estudo recente mostra que em lactantes residentes em Madri, Espanha, a concentração de mercúrio em leite materno oscila entre 0,36 a 0,74 $\mu\text{g}/\text{L}$ (GARCÍA-ESQUINAS *et al.*, 2011).

Ratos que recebiam doses diárias de 0,16 mg/kg de HgCl_2 por 30 dias demonstraram diminuição da capacidade antioxidante plasmática e aumento significativo de radicais livres circulantes (GUTIERREZ *et al.*, 2006). E aqueles que foram submetidos a exposição crônica a pequena concentração tiveram aumento da produção vascular de ânion superóxido, da expressão da eNOS (isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico) e da concentração plasmática de MDA (malondialdeído) (WIGGERS^b *et al.*, 2008).

WIGGERS e colaboradores em 2008 também mostraram que baixa concentração de mercúrio induz disfunção arterial em aorta e artéria mesentéricas de resistência por

aumento da geração de radicais livres pela NADPHoxidase e redução da disponibilidade de NO. Em mesmo modelo de exposição também foi demonstrado aumento da contração arterial a fenilefrina por aumento da participação de prostanóides derivados da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase em aorta (PEÇANHA *et al.*, 2010).

A exposição aguda a baixas doses de mercúrio também foi capaz de induz a vasoconstricção em artérias caudais, provavelmente por redução da biodisponibilidade de NO ocasionada por aumento do estresse oxidativo e também por aumento de formação de Angiotensina II, evidenciado por aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (VASSALLO *et al.*, 1999; WIGGERS^a *et al.*, 2008).

Existem efeitos do mercúrio em vasos, que mostram tanto vasodilatação como vasoconstricção induzida pelo metal (DA CUNHA *et al.*, 2000; GOLPON^a *et al.*, 2003). Os efeitos encontrados são atribuídos a alterações na via do óxido nítrico, geração de espécies reativas de oxigênio, alterações morfológicas e do ciclo de cálcio (OKA *et al.*, 1979; GOLPON^b *et al.*, 2003).

Em células endoteliais a exposição ao metilmercúrio promove efeito citotóxico, que diminui a produção de NO (KISHIMOTO^a *et al.*, 1995), ativa a PLA2 por aumento de cálcio e EROs. O metilmercúrio também ativa peroxidação lipídica e alterações na morfologia das células (MAZERIK *et al.*, 2007). A exposição de cultivos celulares endoteliais ao mercúrio iônico, em altas concentrações, produz citotoxicidade, lesão da monocamada de células, quase completa inibição da atividade de enzimas antioxidantes, redução da atividade da NOS e acúmulo de EROs. No entanto, a exposição a baixa concentração do metal promove aumento compensatório de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (WOLF & BAYNES, 2007).

Apesar de inúmeros estudos demonstrarem que o mercúrio induz estresse oxidativo com subsequente dano em vários órgãos e sistemas e alterações funcionais em diversos leitos vasculares (WAKITA, 1987; CARMIGNANI *et al.*, 1992; MILLER & WOODS, 1993; KISHIMOTO^b *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1996; MAHBOOB *et al.*, 2001; TOUYZ, 2004; WOLF & BAYNES, 2007; PARK & PARK, 2007; HOUSTON 2007; HUANG *et al.*, 2008), o efeito da exposição controlada, durante apenas 30

dias, a baixa concentração de mercúrio sobre a função de artérias coronárias ainda não foi demonstrado.

1.6 CIRCULAÇÃO CORONARIANA

As artérias coronárias utilizadas nesse trabalho constituem um importante objeto de estudo por serem responsáveis por suprir o coração com oxigênio durante atividade basal e em todas as situações fisiológicas de aumento ou redução de demanda metabólica (KREUZER *et al.*, 1969). As pequenas artérias têm importância significativa para a resistência vascular, contribuindo de maneira importante para regulação e manutenção da resistência ao fluxo sanguíneo para o miocárdio (CHRISTENSEN & MULVANY, 2001).

O tônus vascular coronariano é regulado por vários fatores neuro-humorais. Fisiologicamente, ocorre balanço entre os fatores vasodilatadores e vasoconstritores exercidos por influências do endotélio, do estado metabólico e de fatores neuro-hormonais (DUNCKER & BACHE, 2008). A regulação do tônus de artérias coronárias de maior diâmetro tem maior dependência de fatores derivados do endotélio, enquanto que em arteríolas os principais mecanismos envolvidos no controle do tônus são o miogênico e metabólico (MULLER *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1995; FELICIANO & HENNING, 1999).

O leito vascular coronariano é dividido, simplifadamente, em artérias que oferecem pouca resistência ao fluxo e participam pouco da regulação da perfusão miocárdica e os vasos com menor diâmetro interno e que representam o maior local de resistência ao fluxo (DUNCKER & BACHE, 2008).

CHILLIAN e colaboradores em 1986 mostraram que em artérias coronárias de gatos 25 % do total da resistência coronariana basal reside em artérias com diâmetro entre 175 e 200 μm e, aproximadamente, 50 % em arteríolas com diâmetro próximo a 75 e 130 μm . Em contraste, em condições de mudança de tônus arterial também observamos modificações no controle da resistência vascular. Em situações de vasoconstricção há aumento da participação de artérias com diâmetros próximos a 200 μm . (CHILLIAN *et al.*, 1986). Em 2008, DUNCKER & BACHE mostraram, utilizando avançadas técnicas de medidas de pressão intravascular, que em condições basais até 40% da resistência coronária total reside em pequenas artérias entre 100 e 400 μm de diâmetro, e que durante a vasodilatação estes vasos contribuem com maior fração da resistência coronária total. Em contrapartida, as grandes artérias epicárdicas no coração saudável (diâmetro > 400 μm) são vasos de

condutância que contribuem com menos que 5% para a resistência coronária total (DUNCKER & BACHE, 2008).

O principal determinante de mudança da resistência vascular é a alteração do diâmetro da luz do vaso. A alteração do lúmen arterial pode se dar por modificações estruturais ou do balanço de fatores vasodilatadores e vasoconstritores produzidos, principalmente, pelo endotélio vascular. Dentre as propriedades passivas dos vasos podemos citar o número e organização das células musculares lisas, assim como a área de secção transversal. Já as mudanças ativas do lúmen arterial ocorrem pelo grau de ativação das células musculares lisas. Os principais responsáveis pelo tônus arterial coronariano são os fatores miogênico, metabólico, neuro-humorais e endoteliais (LEVY *et al.*, 2009).

A maior produção de fatores vasoconstritores aumenta a contração do músculo liso vascular, diminuindo o diâmetro interno do vaso e, conseqüentemente, a pressão arterial. Quando há maior produção de fatores vasodilatadores ocorre o inverso, o que leva a redução da pressão no interior do vaso (DEUSSEN *et al.*, 2006).

O endotélio possui uma importante função na homeostase, modulação e regulação de várias funções fisiológicas, como a inflamação, agregação plaquetária, fibrinólise, angiogênese e mecanorecepção (JAFFE, 1985; VANE *et al.*, 1990; RAMOS, 1992; WU & THIAGARAHAN, 1996). Além de manter o balanço entre vasodilatação e vasoconstricção, também exerce efeito sobre a inibição, promoção da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (FELÉTOU, 2009).

O endotélio vascular sintetiza uma grande variedade de substâncias parácrinas, que são: os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) e os fatores contráteis derivados do endotélio (EDCF), além de fatores de crescimento celular, que controlam a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea (VANE *et al.*, 1990). A seguir falaremos um pouco mais sobre alguns produtos derivados do endotélio que possuem importante participação na modulação do tônus vascular.

1.6.1 Participação do óxido nítrico

Em 1980 foi identificada a existência do EDRF por FURCHGOTT & ZAWADZKI. Eles demonstraram a capacidade das células endoteliais liberarem um potente

vasodilatador (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1984; MONCADA *et al.*, 1994). Inicialmente se achava que o EDRF era um fator derivado da via do ácido araquidônico ou que era uma substância lábil produzida pelas reações redutoras em pH fisiológico (FURCHGOTT, 1984; MARÍN & SÁNCHEZ-FERRER, 1990). Posteriormente, foi demonstrado, em cultura de células endoteliais de aorta suína, que o EDRF é o radical livre biatômico óxido nítrico (NO) (PALMER *et al.*, 1987; ANGUS & COCKS, 1989; MARÍN & SÁNCHEZ-FERRER, 1990; MONCADA *et al.*, 1994; MARIN & RODRIGUEZ- MARTINEZ, 1995). O NO é um gás que possui reduzida solubilidade em água, concentração de cerca de 1,9 mmol/L em solução saturada, curta meia vida e alta permeabilidade em membranas celulares (KERWIN *et al.*, 1995).

O NO é sintetizado por ação da sintase do óxido nítrico (NOS) pela conversão de L-arginina a L-citrulina e NO, necessitando de oxigênio, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e BH₄ (tetrahidrobiopterina) (Figura 2). Existem três isoformas da sintase do NO: duas constitutivas, presentes em células endoteliais (eNOS) ou em células neuronais (nNOS), e que tem sua ativação dependente do complexo cálcio-calmodulina; e outra que não está presente constitutivamente mas que pode ser induzida por estímulos imunológicos, que levam ao aumento de cálcio intracelular e ativação da expressão em macrófagos, células endoteliais, cardiomiócitos, dentre outros tipos celulares (FORSTERMANN *et al.*, 1994).

A síntese de NO é induzida por vários estímulos físicos e químicos, como estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de cisalhamento, agregação plaquetária, histamina, catecolaminas, aldosterona, vasopressina, bradicinina, adenosina difosfato (ADP), serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh) entre outras (MONCADA *et al.*, 1994; MARÍN & RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 1995) (Figura 2).

Para produzir relaxamento vascular o NO se difunde para o músculo liso vascular e por ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) promove aumento da concentração intracelular de GMPc (3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e assim o relaxamento vascular. Além disso, a PKG via canais para K⁺ dependentes de Ca²⁺ e voltagem hiperpolarizam a

membrana plasmática promovendo relaxamento. Dentre todas as ações da PKG que também promovem relaxamento vascular podemos ressaltar a fosforilação do fosfolambam (PLB) que deixa de inibir a Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumentando a recaptação de cálcio e a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLCK) diminuindo sua sensibilidade ao Ca^{2+} (MARÍN & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1995; LINCOLN *et al.*, 2001).

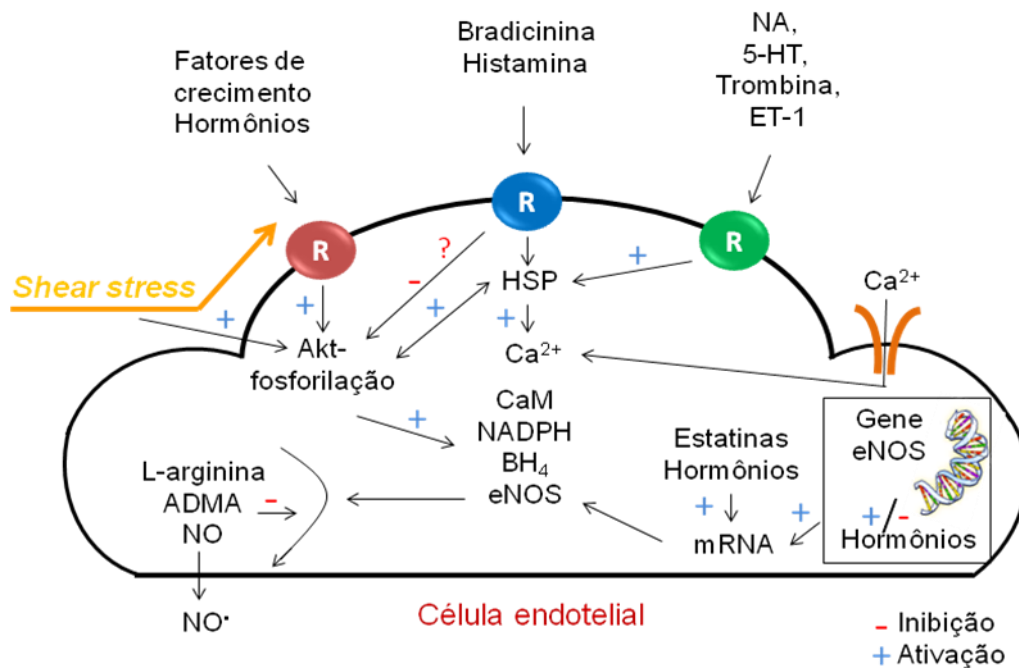


Figura 2: Esquema dos possíveis mecanismos de regulação da produção de óxido nítrico em células endoteliais. O NO é produzido pela conversão de L-arginina pela sintase endotelial do NO (eNOS). A transcrição da enzima é regulada genomicamente por hormônios e fatores de crescimento. A atividade normal da eNOS requer cálcio, calmodulina, NADPH e 5,6,7,8-tetra-hidrobipterina (BH₄). A ativação de outros receptores modulam a produção de NO através das *heat shock protein* (HSP) ou fosforilação da Akt. O ADMA, metabólito da L-arginina, reduz a produção de NO por se ligar competitivamente a eNOS (modificado de VANHOUTTE, 2009).

1.6.2 Espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita (BECKMAN *et al.*, 1990; HALLIWELL, 1997; BERGENDI *et al.*, 1999). A maioria dos radicais livres de interesse em sistemas biológicos são aqueles derivados do oxigênio, por isso, muitas vezes, aparecem simplesmente com a denominação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs incluem o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peroxinitrito

(OONO⁻), dentre outros. O O₂^{•-} é produzido a partir do oxigênio molecular e possui um elétron desemparelhado que o torna mais reativo e instável. A ação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) reduz o O₂^{•-} a H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), que apresenta características mais estáveis e com a meia-vida mais longa que os radicais livres. O H₂O₂ por sua vez, pode ser hidrolisado pela catalase ou glutathione peroxidase e pode também ser o precursor de outros radicais como OH[•] (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004).

Os radicais livres são permeáveis à membrana plasmática e podem danificar o DNA, proteínas, lipídeos e outros componentes celulares. As EROs estão presentes normalmente em concentrações muito baixas no corpo humano (10⁻⁵ a 10⁻⁹ mol/L) pois cerca de 5 % de todo o oxigênio consumido é convertido em EROs. No entanto, em condições fisiológicas os sistemas antioxidantes biológicos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat) e glutathione peroxidase (GPx) são capazes de manter as concentrações sempre em níveis baixos (Figura 3) (HALLIWELL, 1996; BERGENDI *et al.*, 1999).

A SOD é a principal enzima responsável por detoxificar os sistemas biológicos de O₂^{•-} e representa a maior defesa celular contra a formação O₂^{•-} e peroxinitrito. Existem três isoformas bem identificadas da SOD: a forma citosólica que contém cobre e zinco (Cu/ZnSOD ou SOD 1), a isoforma mitocondrial que contém em sua estrutura o manganês (MnSOD ou SOD 2) e a isoforma extracelular (ecSOD ou SOD 3) que também contém cobre e zinco em sua composição (STRÂLIN *et al.*, 1995).

A disfunção endotelial é um termo usado para se referir a várias condições patológicas, como alterações das propriedades anticoagulantes e antiinflamatórias do endotélio, assim como sua capacidade de regular o crescimento e remodelamento vascular. A diminuição da biodisponibilidade de NO pode se dever a redução da expressão da sua sintase endotelial, redução dos co-fatores necessários para sua produção, falha nos mecanismos de sinalização que promovem adequada ativação da eNOS e, por fim, aumento da degradação pelas EROs (HARRISON, 1997).

Dentre as espécies reativas de oxigênio a que influencia mais na redução de biodisponibilidade de NO é o ânion superóxido. A interação entre NO e O₂^{•-} ocorre

numa taxa de $6,7 \times 10^9 \text{ mol/L} \cdot \text{s}^{-1}$, sendo 3 vezes mais rápida que a reação do $\text{O}_2^{\cdot -}$ com a SOD (THOMSON *et al.*, 1995).

Fatores como hipertensão arterial, diabetes, hipercolesterolemia, tabagismo, dentre outros, estão diretamente relacionados com aumento da produção de EROs. Várias são as vias de produção de EROs em células humanas, dentre as principais fontes podemos citar a respiração mitocondrial, lipooxigenases, ciclooxigenases, citocromo p450s, xantina oxidase, NADH/NADPH oxidases, NO sintases, peroxidases e outras hemoproteínas (CAI & HARRISON, 2010). O aumento da produção de radicais livres reduz a biodisponibilidade de NO causando disfunção endotelial por aumento da agregação plaquetária, redução da vasodilatação e remodelamento vascular (Figura 3) (CAI & HARRISON, 2000).

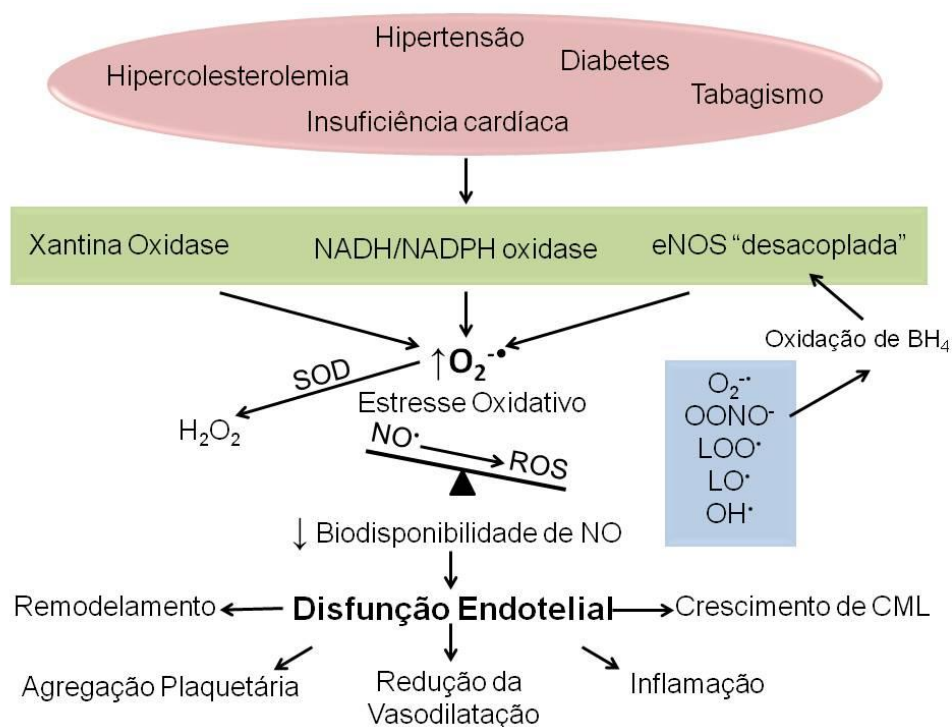


Figura 3: Mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida por estresse oxidativo. CML: Células musculares lisas; NO: óxido nítrico; $\text{O}_2^{\cdot -}$: Ânion superóxido; OONO^{\cdot} : peroxinitrito; LOO^{\cdot} e LO^{\cdot} : radicais lipídicos; OH^{\cdot} : radical hidroxila (modificado de CAI e HARRISON, 2000).

Vários estudos demonstram que a principal fonte de EROs no sistema vascular é a NADPH oxidase (GRIENGLING *et al.*, 1994; BHUNIA *et al.*, 1997; MARUMO *et al.*, 1997; DE KEULENAER *et al.*, 1998; HOLLAND *et al.*, 1998; GRIENGLING *et al.*,

2000). A NADPH oxidase é uma enzima que catalisa a produção de $O_2^{\cdot-}$ do oxigênio e NADPH de acordo com a seguinte reação (AGO *et al.*, 1999):



A NADPH oxidase é a única via enzimática que produz $O_2^{\cdot-}$ como função primária a partir do oxigênio molecular usando NADPH como um doador de elétrons. Diferente de outras enzimas *redox* que produzem o $O_2^{\cdot-}$ como um bioproduto. Podemos citar a xantina oxidase, que catalisa a oxidação de hipoxantina em xantina para formar $O_2^{\cdot-}$, ou ainda, o desacoplamento da NOS. (Figura 4) (PARAVICINI & TOUYZ, 2008; CHAN *et al.*, 2009; SEDEEK *et al.*, 2009).

A estrutura da NADPH oxidase possui em sua estrutura dois elementos de membrana (gp91PHOX e p22PHOX) e três componentes citosólicos (p67PHOX, p47PHOX e p40PHOX) (Figura 4) (BABIOR, 1999). A NADPH oxidase foi identificada inicialmente em células fagocíticas, como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e monócitos. Nessas células a subunidade gp91 PHOX é também denominada NOX-2 (SEGAL *et al.*, 1981). No entanto, posteriormente, a descoberta de homólogos da gp91 PHOX demonstrou que a NADPH oxidase estava expressa também em outros tipos celulares. A partir de então os homólogos da gp91 PHOX passaram a ser denominados de família NOX da NADPH oxidase que compreende 7 elementos (NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4, NOX-5, Duox1 e Duox2) expressos em vários tipos celulares como rim, baço, coração, vasos, entre outros (CHENG *et al.*, 2001). Em células das três camadas vasculares os principais elementos expressos são NOX-1, NOX-2, NOX-4 e NOX-5. Em células endoteliais e em células do músculo liso vascular a isoforma mais abundante é a NOX-4. Tanto NOX-1 quanto NOX-2 estão expressas em células do músculo liso vascular, mas a NOX-1 está mais presente em vasos de condutância e a NOX-2 em vasos de resistência (BEDARD & KRAUSE, 2007; CHAN *et al.*, 2009).

Vários são os fatores físicos e humorais que regulam a atividade da NADPH oxidase. O principal fator físico responsável por aumento da atividade da enzima e, conseqüentemente, aumento do estresse oxidativo é o *shear stress* ou estresse de cisalhamento na parede vascular. Os fatores humorais são: citocinas pró-

inflamatórias, fatores de crescimento e substâncias vasoativas (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004).

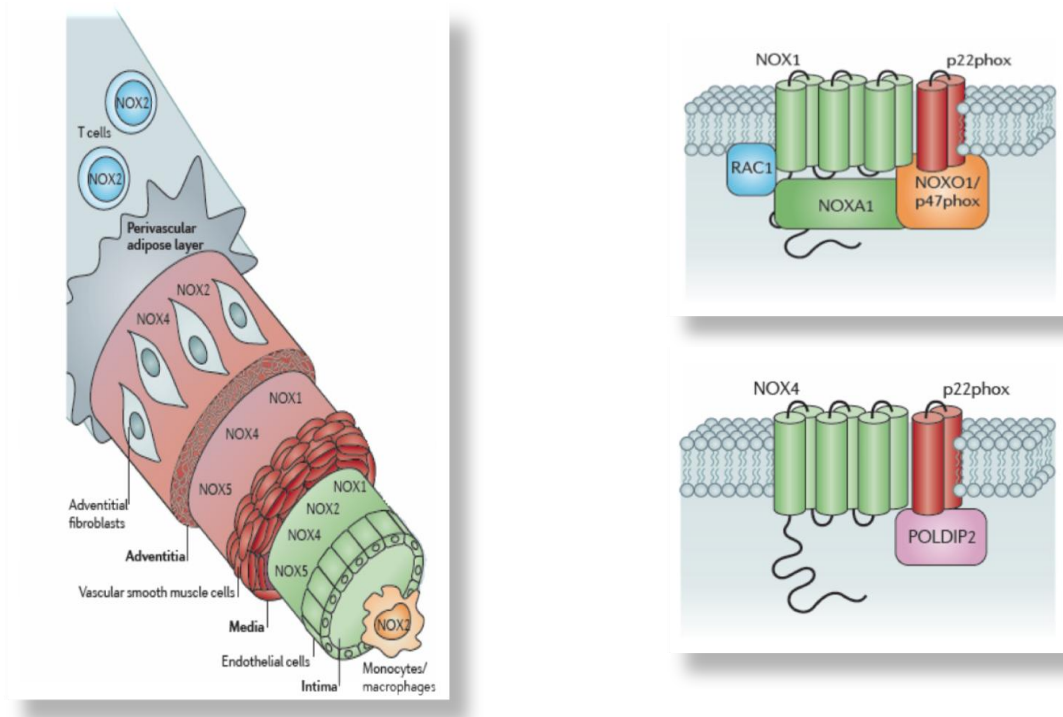


Figura 4: Participação da NADPH oxidase na produção de radicais livres a partir do oxigênio molecular nos diferentes tipos de células vasculares. Conformação das isoformas NOX-1 e NOX-4 da NADPHoxidase (modificado de DRUMOND *et al.*, 2011).

1.6.3 Prostanóides

Após a descoberta em 1980 do EDRF, acreditava-se que o endotélio era responsável somente pela produção de fatores relaxantes. No entanto, observou-se, posteriormente, que o endotélio vascular também produzia fatores vasoconstritores além dos vasodilatadores (DE MEY & VANHOUTTE, 1982). O principal achado que auxiliou na descoberta dos fatores vasoconstritores derivados do endotélio foi a inibição da contração vascular induzida por diversos inibidores da ciclooxigenase (MILLER & VANHOUTTE, 1985). Hoje se sabe que os EDCF são prostanóides derivados do ácido araquidônico (AA). O ácido araquidônico é um constituinte dos fosfolípidios de membrana, que é liberado por ação da fosfolipase A2 (PLA2). Após sua liberação o AA será oxidado pela COX e convertido a prostaglandina H2 (PGH2), precursor imediato de muitos prostanóides (BOS, et al., 2004).

Existem inúmeros prostanóides derivados da via do AA-COX. Cada prostanóide exerce sua função vasoconstritora ou vasodilatadora quando acoplado a um receptor específico ligado à proteína Gs (estimulatória) ou Gi (inibitória), que quando ativados estimulam ou inibem a adenilato ciclase (AC), e, como consequência produzem, respectivamente, aumento ou redução dos níveis intracelulares de AMPc e, então, promovem o relaxamento do músculo liso vascular ou vasoconstrição (FELÉTOU *et al.*, 2010).

Os prostanóides mais comuns são PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF₂α e o tromboxano A₂ (TXA₂). Cada tipo de prostanóide possui seu receptor específico de membrana acoplados a proteínas G. A PGI₂, PGE₂ e PGD₂ se ligam aos receptores específicos IP, EP₂/EP₄ e DP, respectivamente, que estão acoplados a proteína Gs e sua ativação, após toda a sinalização intracelular, produzirá vasodilatação. A PGE₂ se une ao receptor EP₃, acoplado a proteína Gi, e produz vasoconstrição. Em adição, a própria PGE₂, a PGF₂α e o TXA₂ produzem contração por união aos receptores EP₁, FP e TP, respectivamente, que estão acoplados a proteína Gq. Esta união ativa a fosfolipase C (PLC) formando os segundos mensageiros inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), ativando a mobilização de cálcio intracelular e PKC (proteína quinase C) e iniciando a contração (BOS *et al.*, 2004).

1.6.4 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

A vasodilatação promovida pelo NO e pela prostaciclina já está bem demonstrada e seus mecanismos elucidados. No entanto, estudos demonstraram que mesmo após a utilização de potentes inibidores da sintase do NO e da via da COX, ainda há um relaxamento residual. Concluiu-se então que existia outro vasodilatador que não os derivados da L-arginina e da COX. Ainda, observou-se que essa vasodilatação não vinha acompanhada de aumentos dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc em células musculares lisas (TAYLOR *et al.*, 1988; COWAN & COHEN, 1991; ZYGMUNT *et al.*, 1994; GARCIA-PASCUAL *et al.*, 1995; MOMBOULI *et al.*, 1997).

Desta forma, após estudos que mostravam a existência de mudança do potencial de repouso da membrana plasmática do músculo liso vascular, concluíram que a hiperpolarização da membrana muscular lisa é o mecanismo que explica o relaxamento dependente do endotélio (NAGAO & VANHOUTTE, 1991; NAGAO *et al.*, 1992; GARLAND & McPHERSON, 1992). A hiperpolarização das células

musculares lisas induz relaxamento por reduzir a probabilidade de abertura dos canais de influxo de cálcio (NELSON *et al.*, 1990). Esse fator foi então denominado Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF). O EDHF contribui para a dilatação vascular após estímulos como o *shear stress* e ação de fatores químicos (MOMBOULI & VANHOUTTE, 1997). Muitos são os estudos que especulam qual é a substância responsável pela hiperpolarização, no entanto, a natureza química do EDHF ainda não está bem estabelecida (FELÉTOU & VANHOUTTE, 2004).

A Figura 5 esquematiza a maneira como a hiperpolarização das células endoteliais leva ao relaxamento das células musculares lisas. O EDHF age aumentando o conteúdo de cálcio intracelular via IP_3 em células endoteliais e, conseqüentemente, promove a produção de NO, PGI_2 , EETs e anandamina. Esses compostos são capazes de bloquear os canais para K^+ , o que reduz a probabilidade de sua abertura e, desta maneira, ativação da contração muscular. As *gap junctions* também auxiliam na propagação do potencial de membrana das células endoteliais para as células musculares lisas (MOMBOULI & VANHOUTTE, 1997).

Existem 3 principais tipos de canais para K^+ : os canais para potássio dependentes de: cálcio, voltagem e ATP. Os três subtipos de canais para potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}) são os de alta, intermediária e baixa condutância (BK_{Ca} , IK_{Ca} e SK_{Ca} , respectivamente). Em artérias saudáveis os canais de larga condutância são expressos preferencialmente no músculo liso vascular, enquanto que os de intermediária e baixa condutância estão presentes em células endoteliais (FELÉTOU, 2009). E a contribuição do EDHF é significativamente maior em vasos de pequeno diâmetro que em grandes artérias (WOOLFSON & POSTON, 1990; HURAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997)

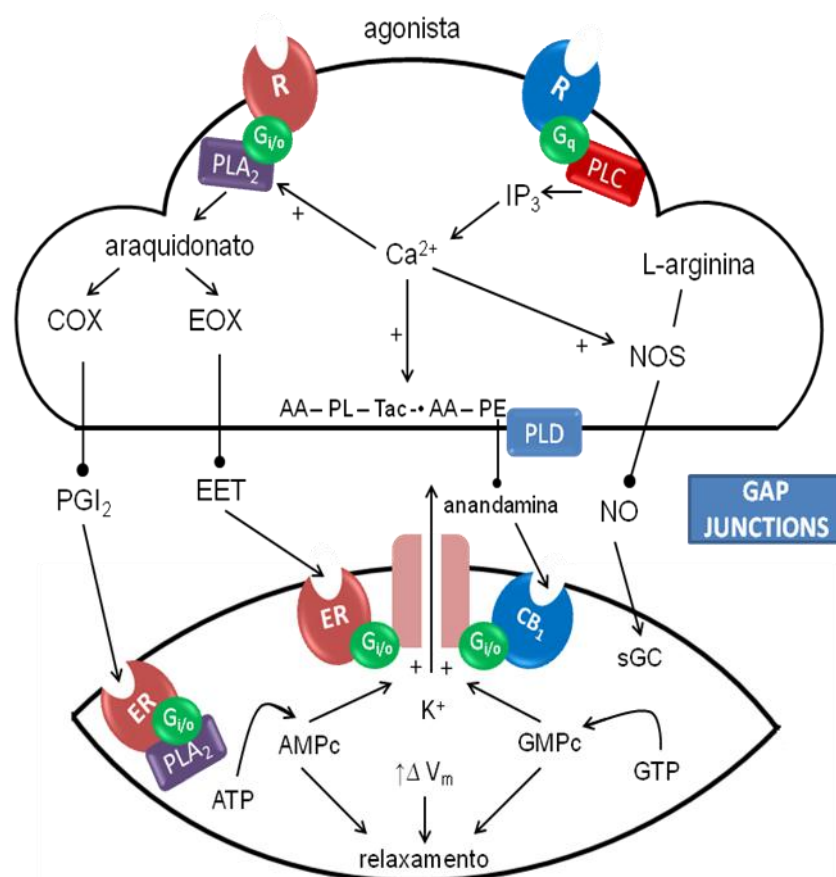


Figura 5: Esquema demonstrando a maneira pela qual a hiperpolarização das células endoteliais leva a hiperpolarização e relaxamento de células do músculo liso vascular. PLA₂: fosfolipase A₂; G: proteína G; PGI₂: prostaciclina; EET: ácido epoxieicosatrienóico; COX: ciclooxigenase; EOX: epoxigenase; Tac: EETs esterificados; PLD: fosfolipase D; AC: adenilato ciclase; CB1: receptor canabinoide; GMPc: guanosina monofosfato cíclico; EP e IP: receptores de prostanóides; GTP: guanosina trifosfato; IP₃: inositol (1,4,5) trifosfato; PLC: fosfolipase C; sGC: guanilato ciclase solúvel; V_m: voltagem de membrana (modificado de MOMBOULI & VANHOUTTE, 1997).

1.7 CICLO DE CÁLCIO NO CARDIOMIÓCITO

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

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

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

Para que ocorra o relaxamento do músculo cardíaco é necessário que o cálcio se desligue da troponina C e seja removido para o meio extracelular e para os compartimentos intracelulares que estocam cálcio. O transporte de cálcio para fora do citosol envolve quatro vias: a bomba de cálcio do RS (SERCA), o trocador Na^+/Ca^{2+} , a bomba de cálcio do sarcolema e o uniporte de cálcio mitocondrial. Alterações nos mecanismo de extrusão de cálcio também podem modificar a contratilidade, visto que interferem na concentração intracelular de cálcio (BERS, 2002).

A função da NKA é induzir a extrusão de Na^+ para fora da célula ao mesmo tempo que o K^+ é transportado para o meio intracelular. O seu funcionamento é dependente das concentrações intra e extracelulares desses dois íons. A inibição da NKA

ocasiona aumento da $[Na^+]_i$, visto que diminui sua extrusão. O aumento da concentração intracelular de Na promove diminuição da troca Na^+/Ca^{2+} , conseqüente aumento da concentração intracelular de cálcio e efeito inotrópico positivo (BLAUSTEIN, 1988).

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

Além de exercer papel fundamental na liberação de cálcio ativada por cálcio na gênese da contração miocárdica, o retículo também desempenha papel importante na recaptção de cálcio e diminuição do cálcio mioplasmático. A principal responsável pela recaptção de cálcio nessa organela é a Ca^{2+} ATPase (SERCA) do retículo sarcoplasmático (RS). O fosfolambam (PLB) é um inibidor endógeno da SERCA que quando fosforilado, devido ao aumento do AMPc (ativando PKA) ou cálcio calmodulina quinase (CaCKII), deixa de inibir a bomba e permite o influxo ativo de cálcio para dentro do reículo sarcoplasmático. Um dos locais de fosforilação do PLB é a serina 16 (SCHWINGER *et al.*, 1999; BERS, 2002).

Todos os mecanismos envolvidos na entrada, liberação e extrusão de cálcio; e a participação desse íon no potencial de ação e contração miocárdica estão ilustrados na figura 6.

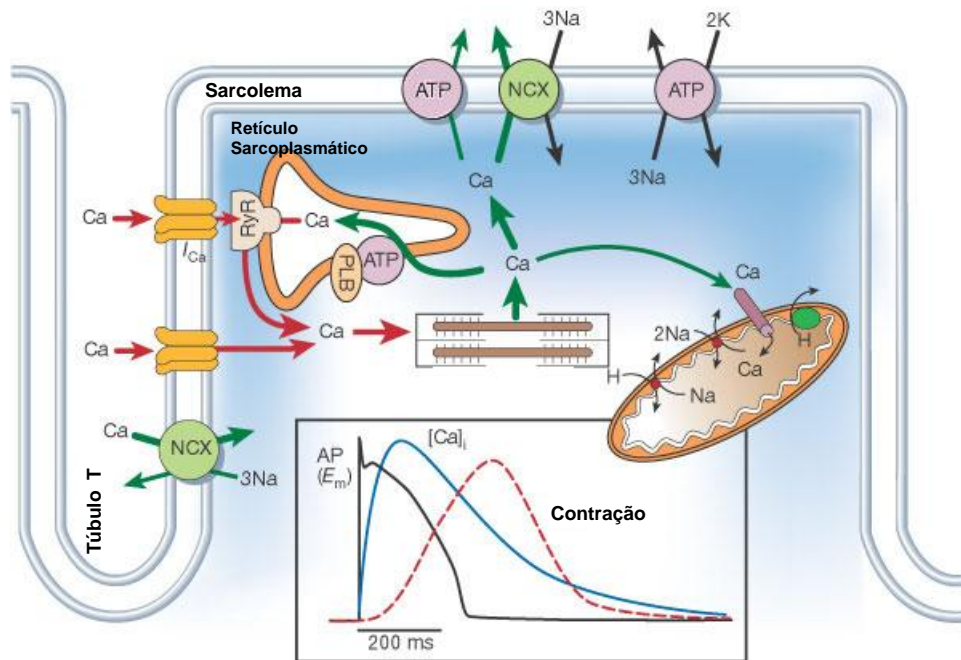


Figura 6: Entrada e extrusão do cálcio no miócito cardíaco e participação do cálcio no potencial de ação miocárdico (Modificado de BERS, 2002).

1.8 EFEITOS PARÁCRINOS E AUTÓCRINOS DO ÓXIDO NÍTRICO NO MÚSCULO CARDÍACO

Existem complexas interações entre as células endoteliais do leito vascular coronariano e os miócitos cardíacos, assim como ocorre entre as células endoteliais e o músculo liso vascular. As células endoteliais liberam e metabolizam diversas substâncias que se difundem para o músculo cardíaco e que modulam seu funcionamento, sem necessariamente ocorrer alteração do fluxo coronariano, como o NO, endotelina-1, angiotensina-II, dentre outras (BRUTSAERT *et al.*, 1998).

O NO, principal produto gerado por células endoteliais, é capaz modular os aspectos fisiológicos do funcionamento cardíaco, como o acoplamento excitação/contração, relaxamento miocárdico, função diastólica, mecanismo de Frank-Starling, frequência cardíaca, resposta inotrópica β -adrenérgica e metabolismo energético (SHAH & MACCARTHY, 2000).

Muitas ações do NO no músculo cardíaco têm sido demonstradas. As diferenças existentes entre os estudos que demonstram diferentes efeitos são: a fonte celular do NO; a quantidade liberada ou experimentalmente utilizada; o “status” antioxidante; fluxo coronariano e frequência cardíaca (que alteram o *shear stress*); o tecido alvo (átrios ou ventrículos); as interações com estímulos neuro-humorais; a presença de ativação imune ou doenças; a ativação de vias de sinalização dependentes ou independentes de GMPc; e os diferentes doadores de NO (SHAH & MACCARTHY, 2000).

O óxido nítrico (NO) liga-se a guanilato ciclase solúvel, levando à formação de GMPc. O GMPc ativa proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), iniciando uma gama de respostas intracelulares (ISOLDI & CASTRUCCI, 2008). Em cardiomiócitos, a PKG fosforila a troponina I, diminuindo a afinidade da troponina C ao cálcio. A redução da sensibilidade dos miofilamentos também resulta da acidificação citosólica induzida pela alteração da função do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ via GMPc (Figura 7). A PKG também é capaz de suprimir o aumento da corrente de cálcio ocasionado pela fosforilação dos canais de cálcio do tipo L pela PKA formada, por exemplo, após uma ativação simpática (LAYLAND *et al.*, 2002)

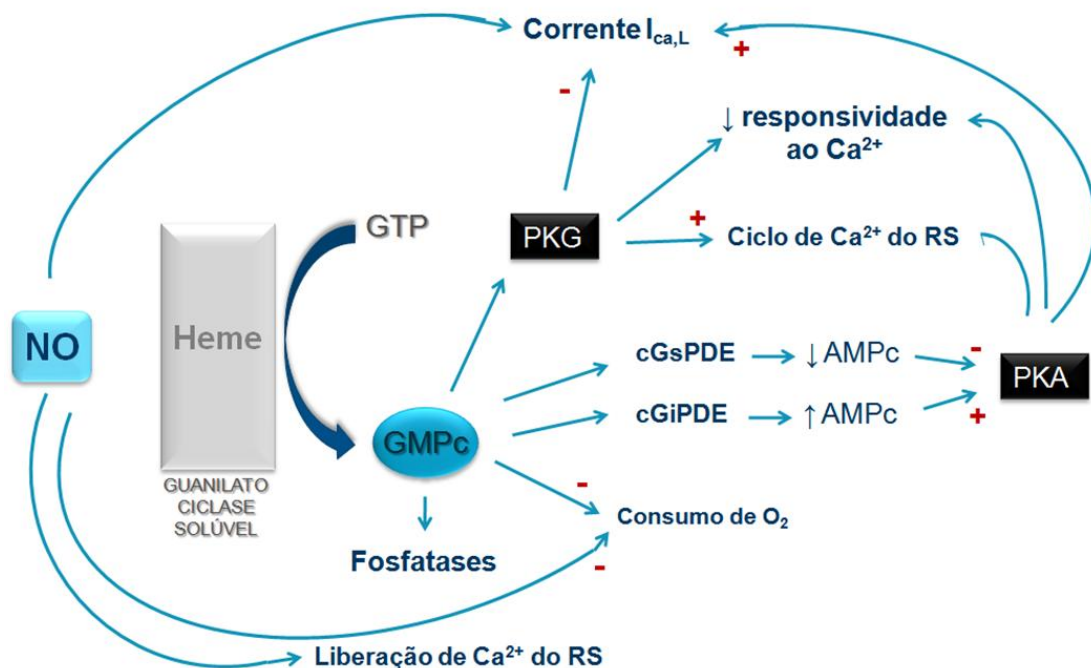


Figura 7: Ações do óxido nítrico no músculo cardíaco. O óxido nítrico (NO) está envolvido no aumento intracelular do GMPc, por se ligar à guanilato ciclase solúvel. Os principais alvos intracelulares do GMPc são a proteínas quinase dependente de GMPc (PKG), e as fosfodiesterases inibidas e estimuladas pelo GMPc (cGsPDE e cGiPDE). A proteína quinase G (PKG) modula a corrente de cálcio pelos canais de cálcio do Tipo L, diminui a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, altera a função do RS, diminui o consumo de oxigênio, modula o potencial de ação e o volume celular (Modificado de SHAH & MACCARTHY, 2000).

O NO é capaz de promover tanto efeito inotrópico positivo quanto negativo. Foi demonstrado efeito inotrópico positivo em miócitos cardíacos e papilares de gatos após uso de doadores de NO (KOJDA *et al.*, 1996; VILA-PETROFF *et al.*, 1999) e em miócitos atriais de humanos após uso de nitroprussiato sódico e milrinone (inibidor da GMPc PDE) (KIRSTEIN *et al.*, 1995). Em corações de ratos, perfundidos pela técnica de Langendorff, o uso de L-NMMA deprimiu a contratilidade sem alterar a pressão de perfusão coronariana (KLABUNDE *et al.*, 1991). Já os efeitos inotrópicos negativos ocorrem via ativação da PKG. Um estudo mostra aumento da $I_{Ca,L}$ após exposição a L-NMMA (GALLO *et al.*, 1998).

Um outra importante regulação parácrina do NO ocorre sobre a função diastólica. A infusão intracoronariana de NPS promove início precoce do relaxamento ventricular e uma concomitante redução do pico e da pressão sistólica final, sem mudança da

dP/dt_{max} . assim como uma queda da pressão diastólica mínima e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE), com aumento do volume diastólico final. (PAULLUS *et al.*, 1997). O NO também atua sobre a frequência cardíaca. Alguns autores mostraram que baixas doses de doadores de NO aumentam a magnitude da I_f e altas doses têm efeitos opostos (SEARS *et al.*, 1998).

Inúmeros trabalhos demonstram os diferentes e tóxicos efeitos da exposição ao mercúrio, seja ele orgânico, inorgânico ou elementar, sobre os vários órgãos e sistemas e, em especial, sobre o sistema cardiovascular (WAKITA, 1987; CARMIGNANI *et al.*, 1992; MILLER & WOODS, 1993; KISHIMOTO^a *et al.*, 1995; KISHIMOTO^b *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1996; MAHBOOB *et al.*, 2001; TOUYZ 2004; WOLF & BAYNES 2007; PARK & PARK 2007; HOUSTON, 2007).

Mesmo existindo estudos que mostram os efeitos da exposição durante 30 dias sobre a reatividade de diferentes leitos vasculares, como aorta e artérias mesentéricas de resistência (WIGGERS^b *et al.*, 2008; PEÇANHA *et al.*, 2010), ainda não existem estudos que demonstrem os efeitos de baixas concentrações de $HgCl_2$, como as encontradas em trabalhadores expostos, em pessoas que consomem peixes contaminados ou que retiraram amálgamas dentários, sobre a reatividade de artérias coronárias. E ainda que correlacionem os efeitos em artérias coronárias com os efeitos cardíacos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição controlada durante 30 dias a baixa concentração de HgCl_2 sobre a reatividade de artérias coronárias de resistência e sobre a função contrátil de corações isolados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar possíveis alterações na resposta vasoconstrictora à serotonina (5-HT) em artérias coronárias após exposição crônica ao HgCl_2 .
- Averiguar se a exposição crônica ao HgCl_2 altera a participação do óxido nítrico, dos prostanóides derivados da via do AA-COX, dos canais para potássio e do estresse oxidativo na resposta vasoconstrictora induzida pela serotonina (5-HT) em artérias coronárias.
- Investigar se o tratamento alterou a resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh) e ao doador de óxido nítrico (DEA-NO) de artérias coronárias.
- Pesquisar se a exposição durante 30 dias ao HgCl_2 modifica a participação do óxido nítrico, dos prostanóides derivados da via do AA-COX, dos canais para potássio e do estresse oxidativo na resposta vasodilatadora promovida pela acetilcolina (ACh) em artérias coronárias.
- Mensurar a produção local de óxido nítrico em artérias coronárias septais de ratos expostos à salina e a HgCl_2 , assim como a quantidade plasmática de nitritos/nitratos nos dois grupos experimentais.
- Observar se o tratamento altera a produção local de ânion superóxido de artérias coronárias septais.
- Observar se o tratamento durante 30 dias a baixa concentração de HgCl_2 modificou a expressão gênica da superóxido dismutase (isóformas SOD-1 e SOD-2) e da NADPH oxidase (subunidades NOX-1 e NOX-4).
- Avaliar, em células endoteliais de coronárias suínas, se a exposição durante 24 horas a 0,05; 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de HgCl_2 incrementa a produção de espécies reativas

de oxigênio. E também verificar os efeitos do tempol, da apocinina, da catalase, do tiron e do L-NAME sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitritos/nitratos.

- Averiguar a expressão protéica da subunidade endotelial da sintase do óxido nítrico em células endoteliais de coronárias suínas.

- Avaliar se o tratamento crônico com baixas concentrações de HgCl₂ durante 30 dias altera a modulação do óxido nítrico sobre a função de corações isolados.

- Verificar se o tratamento com HgCl₂, mesmo utilizando baixas concentrações, foi capaz de alterar a expressão protéica cardíaca da eNOS, iNOS, SERCA, PLB, PLB-Ser16, NCX e NKA (isoformas α -1 e α -2).

***MATERIAIS E
MÉTODOS***

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com três meses de idade ao final do tratamento e pesando entre 250 e 300 gramas. Os animais utilizados foram obtidos de duas fontes distintas. Para realização dos protocolos com coração isolado e de expressão protéica cardíaca os animais experimentais foram fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os demais procedimentos foram realizados utilizando ratos cedidos pelo biotério da *Facultad de Medicina da Universidad Autónoma de Madrid*. Durante o tratamento os ratos permaneciam em gaiolas com temperatura e umidade constantes, e ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Os animais tinham livre acesso a ração e água.

Para a obtenção das células endoteliais foram utilizados seis porcos que possuíam entre sete e oito meses, obtidos do Serviço de Cirurgia Experimental do Centro de Pesquisa do Hospital La Paz (Madri, Espanha).

Todos os procedimentos experimentais utilizados estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e pelas leis espanholas e europeias para experimentação animal (RD 233/88 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación e 609/86). Os protocolos experimentais realizados no Brasil foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA/EMESCAM/ no CEUA-EMESCAM 007/2007).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos denominados: Controle e HgCl₂.

Os ratos do grupo Controle recebiam, diariamente, injeções intramusculares de solução salina isotônica (NaCl 0,9% - 0,33 mL/Kg) durante um período de 30 dias.

Os ratos pertencentes ao grupo HgCl₂ recebiam, no primeiro dia do tratamento, uma injeção intramuscular contendo 4,6 µg/Kg de cloreto de mercúrio (HgCl₂). Nos 29 dias subsequentes, levando em consideração que a meia-vida do HgCl₂ é de 37 dias (AZEVEDO, 2003), os ratos recebiam doses diárias de reforço (0,07 µg/kg) contendo somente a quantidade que eles excretariam em um dia, segundo protocolo experimental desenvolvido por WIGGERS^b *et al.* (2008). As soluções contendo cloreto de mercúrio eram diluídas em solução salina isotônica. Como previamente descrito, esse tratamento produz uma concentração sanguínea de $7,97 \pm 0,59$ ng/mL de HgCl₂ (WIGGERS^b *et al.*, 2008).

3.3 REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS CORONÁRIAS

O estudo da reatividade das artérias coronárias esquerdas de ratos foi realizado de acordo com método descrito por MULVANY & HALPERN (1977). Para isso, ao final dos 30 dias de tratamento com HgCl_2 ou solução salina isotônica os ratos foram sacrificados por decapitação. O tórax foi aberto e o coração retirado e mantido em solução de Krebs Henseleit (em mmol/L: 115 NaCl, 25 NaHCO_3 , 4,7 KCl, 1,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 CaCl_2 , 1,2 KH_2PO_4 , 11,1 glicose e 0,01 Na_2EDTA) a 4°C e pH 7.4 durante o procedimento de dissecação. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi isolado com o auxílio de um microscópio de dissecação e segmentos de, aproximadamente, 2 mm de longitude foram cortados e mantidos a 4°C . Após preencher as câmaras do miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) com Krebs Henseleit, dois fios de tungstênio (40 μm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias para medida de força isométrica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de força isométrica e o outro fio conectado a um micromanipulador que permitia o estiramento das artérias. Esse miógrafo estava conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e a um computador (Macintosh ou Hewlett-Packard).

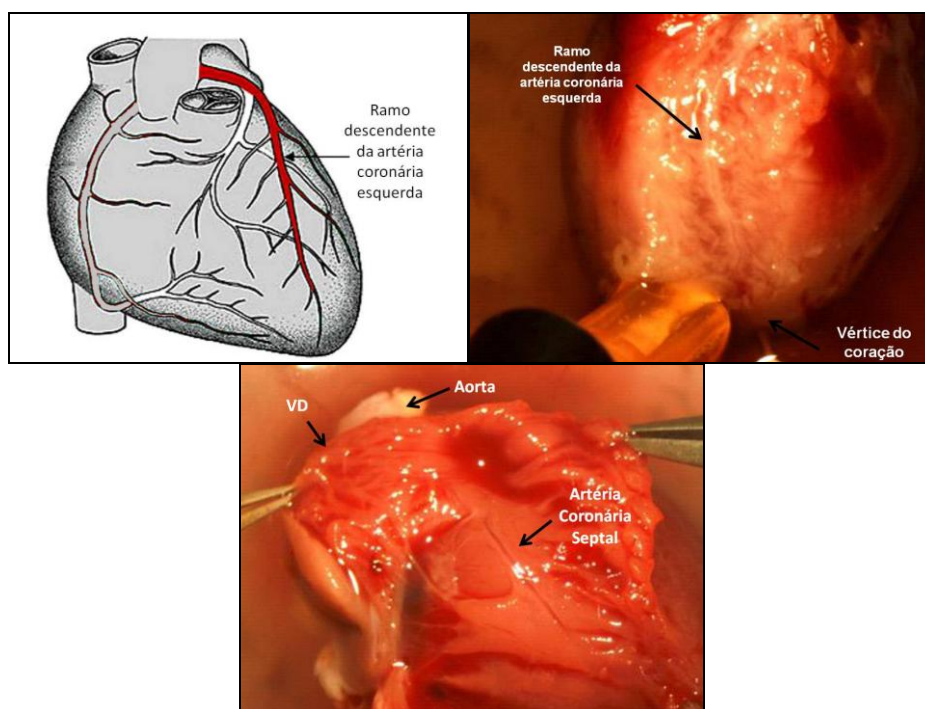


Figura 8: Desenho esquemático mostrando a localização do ramo descendente da artéria coronária esquerda (direita). Microfotografia de um coração mostrando a artéria em questão (esquerda).

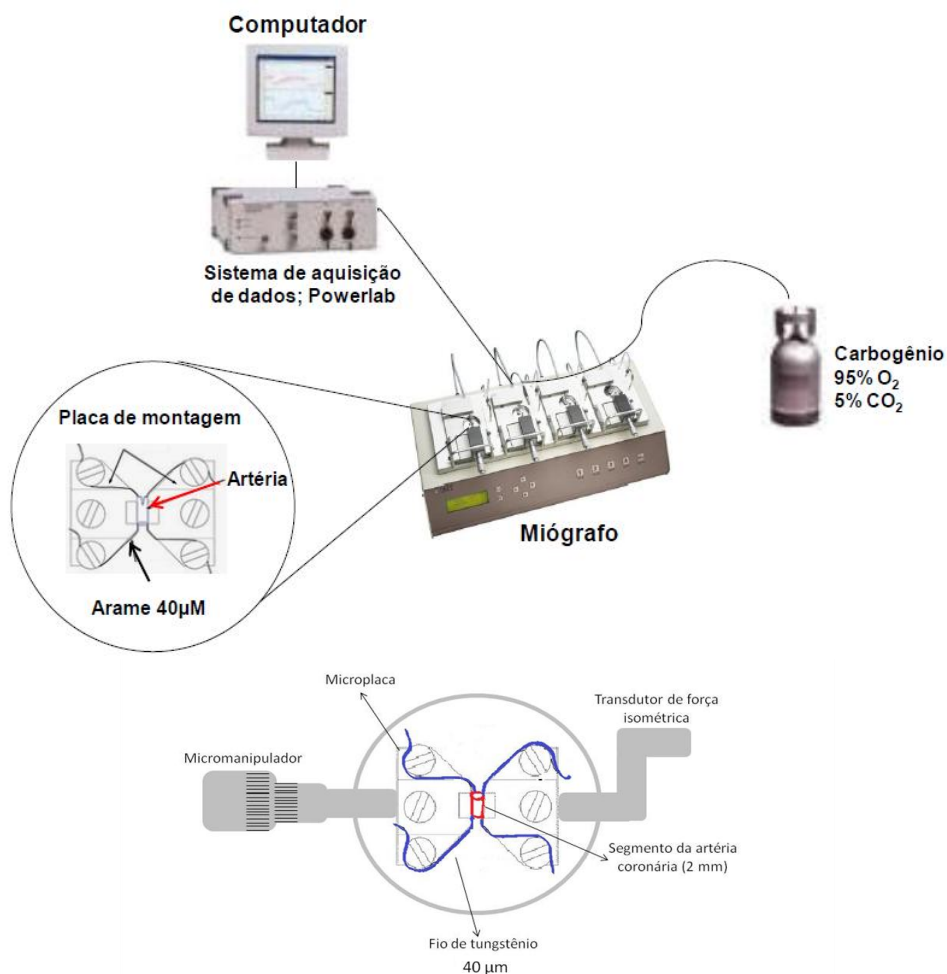


Figura 9: Desenho representativo mostrando o miógrafo de arames para pequenos vasos, gaseificado com mistura carbogênica, ligado a um sistema de aquisição de dados.

Após período de 30 minutos de estabilização em solução de Krebs Henseleit gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂, pH 7,4, 37° C), as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão: diâmetro interno foi calculada e então foi determinada a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L₁₀₀). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L₁, calculada como $L_1 = 0,90 \times L_{100}$, circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo. (MULVANY & HALPERN, 1977).

Após estabilização em sua tensão de estiramento ideal, as artérias coronárias foram expostas a uma solução com concentração alta de potássio (120 mmol/L, a composição é similar ao Krebs Henseleit, no entanto o NaCl foi substituído por KCl

em concentração equimolar) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos. As solução foi novamente trocada para solução de Krebs-Henseleit normal e após retorno à sua tensão basal, determinou-se a presença de endotélio. Para comprovar a integridade endotelial, as artérias foram pré-contraídas com uma concentração de 5-hidroxitriptamina (5-HT) suficiente para produzir 50 % da contração produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 120 mM, e então o relaxamento vascular foi obtido por exposição a 10 μ M de acetilcolina (ACh). Somente foram utilizadas nesse estudo as artérias com relaxamento superior a 50 % da contração induzida pela 5-HT.

3.3.1 Efeitos da exposição ao HgCl₂ sobre a resposta constritora à 5-Hidroxitriptamina (5-HT) e dilatadora a acetilcolina (ACh) e ao diethylamine NONOate (DEA-NO) em artérias coronárias de ratos.

Após o teste de integridade endotelial as artérias permaneceram 60 minutos para se estabilizarem e então foi realizada uma curva concentração resposta à ACh (1 nM a 10 μ M) em artérias pré-contraídas com 5-HT (concentração suficiente para produzir 50 % da contração máxima ao potássio). Após igual período de estabilização foi realizada uma curva concentração resposta a 5-HT (10 nM a 100 μ M). As curvas de relaxamento à ACh e de contração à 5-HT foram realizadas também após incubação por 30 minutos com alguns fármacos, no intuito de verificar a via pela qual o tratamento com HgCl₂ foi capaz de alterar a reatividade de artérias coronárias.

Em segmentos de artérias controles (sem fármacos) pré-contraídas com 5-HT (concentração suficiente para produzir 50 % da contração ao KCl) foi realizado também uma curva concentração resposta ao doador de NO, dietilamina NONOate (DEA-NO - 1 nM a 10 μ M).

3.3.2 Participação do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos prostanóides e dos canais para o potássio na resposta contrátil a 5-Hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

Com a finalidade de avaliar a via pela qual o tratamento com HgCl₂ modifica a reatividade vascular, alguns fármacos foram utilizados. As artérias foram incubadas por 30 minutos antes da realização da curva concentração resposta à 5-HT.

Para avaliar se o tratamento com HgCl₂ altera a participação do NO na resposta induzida pela 5-HT utilizamos o L-NAME (L-NG-nitro-arginina metil éster- 100 µM), um inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico.

A produção de espécies reativas altera a reatividade vascular, principalmente por reduzir a biodisponibilidade de NO. Para verificar se o tratamento com HgCl₂ altera a participação das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta contrátil à 5-HT, utilizamos o tiron (ácido disulfônico 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno - 1mM), um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido e a superóxido dismutase (SOD- 150 U/mL), uma enzima que converte ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio molecular (O₂).

A participação dos derivados da via do ácido araquidônico- ciclooxygenase sobre a resposta contrátil à 5-HT foi testada utilizando a Indometacina (10 µM), um inibidor inespecífico da ciclooxygenase (COX).

Ainda, para avaliar a influência dos canais para o potássio sensíveis ao cálcio sobre a resposta contrátil induzida por 5-HT as artérias coronárias foram incubadas com tetraetilamônio (TEA, 2 mM), um bloqueador não seletivo de canais para o potássio ativados por cálcio.

3.3.3 Participação do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio, dos prostanóides e dos canais para o potássio na resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

Para avaliar se o tratamento com HgCl₂ altera a participação do NO na resposta endotélio dependente induzida pela ACh utilizamos o L-NAME (100 µM), um inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico.

Para verificar se o tratamento com HgCl_2 altera a produção e participação das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta contrátil à 5-HT, utilizamos o tiron (ácido disulfônico 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno - 1mM), um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido e a apocinina (0,3 mM), inibidor da NADPHoxidase, que é uma das principais fontes geradoras de radicais livres derivados do oxigênio.

A participação dos derivados da via do ácido araquidônico- ciclooxigenase sobre a resposta contrátil à 5-HT foi testada utilizando a indometacina (10 μM), um inibidor inespecífico da COX.

Ainda, para avaliar a influência dos canais para o potássio sensíveis ao cálcio sobre a resposta contrátil induzida por 5-HT as artérias coronárias foram incubadas com tetraetilamônio (TEA, 2 mM), um bloqueador não seletivo de canais para o potássio ativados por cálcio.

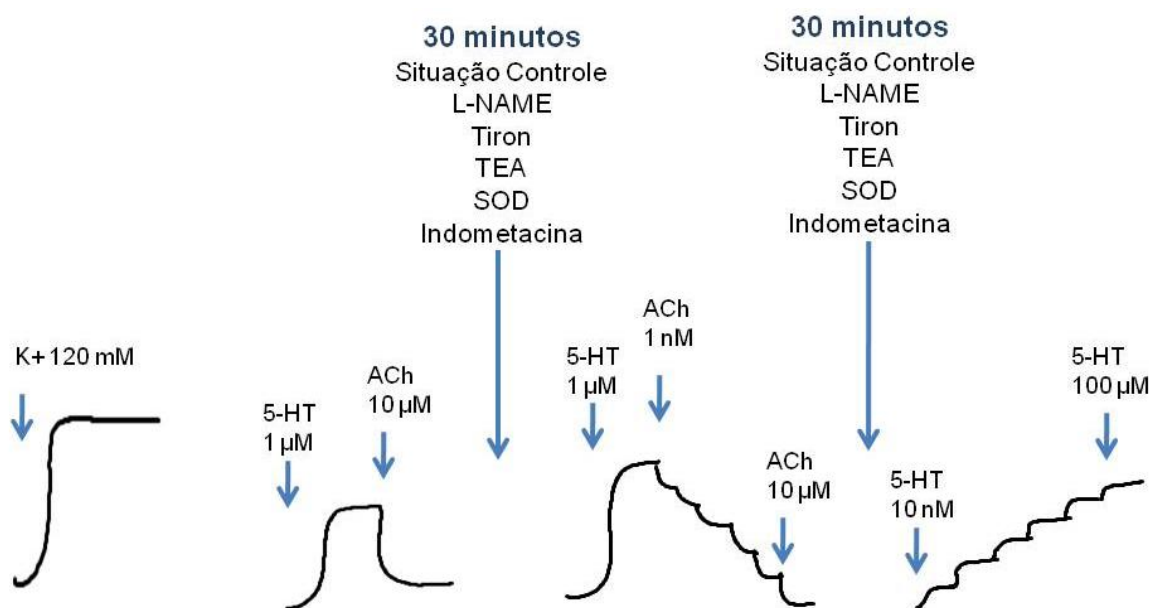


Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental realizado nos experimentos de reatividade vascular em artérias coronárias. 5-HT (serotonina), ACh (acetilcolina), L-NAME (L-NG-nitro-arginina metil éster- 100 μM), tiron (ácido disulfônico 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno- 1mM), TEA (tetraetilamônio- 2 mM), SOD (superóxido dismutase- 150 U/mL), Indometacina (10 μM).

3.4 NITRITOS E NITRATOS PLASMÁTICOS

Após decapitação, o sangue foi coletado em tubo contendo EDTA (ácido Etilenodiaminotetraacético). Foi centrifugado a 1500 g durante 10 minutos a uma temperatura de 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80° C até o momento de sua utilização.

Os nitritos são produtos finais estáveis da autodegradação do óxido nítrico em solução aquosa e sua concentração é proporcional a quantidade deste gás. No entanto, no organismo o nitrito é facilmente oxidado a nitrato. A medida de nitritos realizou-se mediante modificação do método de Griess (GREEN *et al.*, 1982) descrita por MIRANDA *et al.* (2001).

Para se realizar a medida de nitritos plasmáticos, o plasma deve estar livre de proteínas, já que a hemoglobina pode interferir na reação. Para isso as amostras de plasma são mescladas com etanol em razão 1:2. Em seguida, essa mistura é agitada durante um minuto e as amostras centrifugadas a 1000 x g durante 10 minutos a 4° C e foi coletado somente o sobrenadante. As amostras foram colocadas uma placa de 96 poços em triplicata (ou seja, três alíquotas de cada amostra). Já que os nitritos estão em menor quantidade que os nitratos, a conversão de nitratos em nitritos foi realizada com a adição de cloreto de vanádio (III) 8 mg/mL em cada poço.. Então, os reagentes de Griess: sulfanilamida (2%) e *N*-(1 *Naphthyl*)ethylenediamina dihidrocloridrato (0.1%) foram rapidamente adicionados. Esses reagentes se combinam com os nitritos presentes na amostra para formar um composto nitrogenado colorido. A intensidade da cor produzida é proporcional a quantidade de nitritos presentes na amostra. Após 30 minutos de incubação das amostras em temperatura ambiente (25° C) a absorbância a 540 nm foi mensurada usando um espectrofotômetro após 30 minutos de incubação.

3.5 LIBERAÇÃO LOCAL DE ÓXIDO NÍTRICO

A liberação de óxido nítrico (NO) foi medida de acordo com método descrito por MARTIN e colaboradores (2005). Primeiramente, o ventrículo direito foi separado do esquerdo e a artéria septal ficou exposta no septo interventricular. As artérias coronárias septais foram dissecadas, retirando o máximo de miocárdio quanto possível, e estabilizadas durante 60 minutos em tampão HEPES (em mmol/L: NaCl 119; HEPES 20; CaCl₂ 1,2; KCl 4,6; MgSO₄ 1; KH₂ PO₄ 0,4; NaHCO₃ 5; glicose 5,5; NaH₂PO₄ 0,15; pH 7,4) a 37° C, então foram incubadas com o produto fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF- 2 µmol/L), uma sonda que se liga ao NO e emite fluorescência, durante 1 h e o meio foi coletado para medida da liberação basal de NO. Para medida da liberação após estímulo, uma dose de 5-HT (1 µM) e ACh (10 µM) foi aplicada, simulando uma situação de estímulo para liberação local de NO. A fluorescência do meio foi medida em temperatura ambiente usando um espectrofluorímetro (LS50 Perkin Elmer instruments, FL WINLAB Software) com comprimento de onda de excitação a 492 nm e de emissão a 515 nm. Da mesma maneira foi medida a fluorescência, no entanto sem a artéria coronária septal para saber a emissão basal de fluorescência da DAF. A quantidade de NO liberado foi expressa como unidades arbitrárias de fluorescência/mg de tecido (MARTÍN *et al.*, 2005).

3.6 PRODUÇÃO LOCAL DE ÂNION SUPERÓXIDO

A produção local de anions superóxido foi medida em artérias coronárias septais utilizando a quimioluminescência da lucigenina, como previamente descrito por (MARTÍN *et al.*, 2005). As artérias septais de ratos dos grupos Controle e Mercúrio foram estabilizadas por 30 minutos em tampão HEPES a 37° C, e transferidas a tubos de teste contendo 1 mL de tampão HEPES (em mmol/L: NaCl 119; HEPES 20; CaCl₂ 1,2; KCl 4,6; MgSO₄ 1; KH₂ PO₄ 0,4; NaHCO₃ 5; glicose 5,5; NaH₂PO₄ 0,15; pH 7,4) a 37° C com lucigenina (250 mmol/L) e mantidas a 37° C. Medidas repetidas foram obtidas durante 5 minutos com intervalos entre cada medida de 30 s. Após as medidas de produção basal de anions superóxido, o Tiron (10 mmol/L), um varredor de anions superóxido não enzimático e permeável a membrana celular, foi adicionado para confirmar que a luminescência é dependente especificamente de anions superóxido. Também, foi medida a luminescência de amostras da mesma maneira, mas sem artérias septais, para medida de emissão basal de luminescência da lucigenina (MARTÍN *et al.*, 2005). A produção local de ânion superóxido foi expressa em unidades arbitrárias de luminescência/ mg de tecido / minuto.

3.7 EXPRESSÃO GÊNICA DAS SUBUNIDADES NOX-1 E NOX-4 DA NADPH - OXIDASE E DAS ISOFORMAS SOD-1 E SOD-2 DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.

A expressão do RNAm da NOX-1, NOX-4, SOD-1 e SOD-2 foi determinada em segmentos de artérias coronárias descendente anterior esquerda e septal de animais expostos ou não ao HgCl₂. O RNA total foi obtido usando TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Philadelphia, PA), um tampão específico de isolamento de RNAm. A quantificação do RNA total foi calculada medindo-se a absorvância a 260 nm. Na sequência, 0,5 µg do RNA total tratado com DNAase I foi transcrito a cDNA utilizando-se um kit comercial (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo foi realizado segundo as instruções comerciais em 10 µL de volume de reação.

O PCR foi realizado em duplicada para cada amostra, utilizando 1 µL de cDNA como modelo, 1x of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), e 10x de Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) para cada 20 µL de reação. Foram utilizados *primers* (Assays-on-Demand™ de TaqMan™- Applied Biosystems) para amplificar o gen da NOX-1 (Rn 00586652_m1), NOX-4 (Rn 00585380_m1), SOD-1 (Rn00566938_m1), SOD-2 (Rn00566942_g1) e 18S rRNA (4319413E), o qual foi utilizado como controle endógeno para normalizar os resultados.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um sistema de detecção de sequência ABI prism 7000 (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 minutos durante 40 ciclos e 60°C por 1 minuto. Os níveis relativos de NOX-1 e NOX-4 foram determinados usando a equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os resultados estão demonstrados como expressão relativa de RNAm no grupo HgCl₂ comparado ao grupo Controle.

3.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE VASOS CORONARIANOS

Para avaliar se o tratamento com HgCl_2 altera a morfometria de vasos coronarianos, um total de 8 animais de cada grupo experimental foram analisados. O tecido ventricular foi fixado em solução de formoldeído 4 % tamponado com sódio. As amostras foram desidratadas e inseridas em parafina. O tecido imerso em parafina foi cortado em secções de 4 μm e então coradas com tricrômio de Masson. Um total de 48 vasos intramiocárdicos (três por rato) foram analisados individualmente usando uma câmera monocromática de alta resolução CCD (Sony XC-75CE) conectada a um microscópio (Leica DMRB). A análise morfométrica foi realizada usando um sistema de análise de imagens (Leica Q500MC) com 8 bits de imagens em escala de cinza (256 escalas de cinza: o valor 0 representa o preto ou branco e mais 255 cores). Uma edição binária foi utilizada para remover artefatos que não correspondem à área do vaso coronariano avaliado. As análises foram realizadas em lentes que permitem um aumento de 40 X, para que os vasos fossem claramente distinguidos. As mesmas condições de iluminação foram usadas em todas as medidas e a calibração do sistema foi realizada usando um micrômetro (Leitz) que permite a computação da área do objeto em unidade de μm^2 . A média foi obtida subtraindo-se a área total do vaso externa à lâmina elástica da área do lúmen. Somente um investigador realizou todas as medidas de ambos os grupos experimentais.

3.9 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Foram utilizados porcos de sete a oito meses de idade obtidos do Serviço de Cirurgia Experimental do Centro de Pesquisa do Hospital La Paz (Madri, Espanha). Os porcos foram sacrificados com uma injeção letal de cloreto de potássio, depois de anestesiados com isoflurano inalatório, e os corações retirados e mantidos em solução salina estéril (NaCl 0,9 %) a 4^o C até o momento da dissecação das artérias coronárias.

As artérias coronárias esquerda e direita foram adequadamente dissecadas em *Nutrient Mixture F-12-HAM* contendo antibióticos e fungicidas para prevenir a contaminação. Após a retirada das artérias coronárias todo o tecido muscular cardíaco e adiposo foi retirado cuidadosamente utilizando pequenas tesouras em microscópio para dissecação para impedir a lesão da camada endotelial do vaso. Então, dentro de uma câmara de fluxo laminar, as artérias foram cortadas em fragmentos de 2 a 3 cm de longitude e abertas longitudinalmente. A face luminal foi colocada em contato com solução *Nutrient Mixture F-12-HAM* contendo 0,2 % de colagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) durante 5 minutos a 37^o C. Após esse curto período de digestão, as células endoteliais foram retiradas mecanicamente com o auxílio de uma pinça com pontas curvas e cultivadas em meio de cultura *Iscove modified Dulbecco's* (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com 20 % de soro bovino fetal (FBS, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) e antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL), em poços gelatinizados. As culturas celulares foram mantidas a 37^o C em uma incubadora úmida e com 5 % de CO₂ e o meio de cultura foi trocado a cada 2 a 3 dias.

Quando as células encontravam-se confluentes, ou seja, formavam uma monocamada uniforme de células elas eram incubadas com 0,1 % de tripsina e 0,1 % de EDTA e, após se desprenderem do fundo dos poços de cultivo, ressuspensas em meio de cultura mencionado anteriormente (DUFRESNE & WAROCQUIER-CLÉROUT, 2001). O objetivo desse procedimento é estimular o crescimento celular e aumentar a quantidade de células viáveis para o trabalho. Cada vez que as células eram expostas a solução de tripsina e EDTA (0,1 %) e ressuspensas considerava-se aumento de uma passagem das células. As células recém explantadas das coronárias suínas constituíam células em passagem zero (0)

e a primeira vez que eram expostas a solução de tripsina + EDTA e ressuspensas tornavam-se células em passagem um (1) e assim sucessivamente. Foram utilizadas para o trabalho células até a passagem quatro (4).

3.9.1 Caracterização

O fenótipo das células endoteliais foi confirmado pela expressão do fator de Von Willebrand (vWF- diluição do anticorpo 1:100, Dako, Glostrup, Denmark), um marcador específico para células endoteliais. Um anticorpo secundário adequado conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC) foi utilizado (diluição do anticorpo 1:200). As células foram examinadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse T300) e as imagens foram obtidas com uma câmera digital (Diagnostic Instruments, Inc.) (SERRANO *et al.*, 2009).

3.9.2 Produção de ânion superóxido

As células endoteliais, quando confluentes, foram colocadas em jejum por 24 horas em solução *Iscove modified Dulbecco's* contendo antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL) e 5% de soro bovino fetal. Então, foram expostas ao HgCl₂ (0,05; 0,5 e 5 µg/mL) e a H₂O₂ (100 µmol/L) por 24 horas. A incubação com H₂O₂ foi utilizada como controle positivo, já que sabidamente, o peróxido de hidrogênio é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (LI *et al.*, 2001). Para verificar se a produção de ânion superóxido era modificada por antioxidantes, células foram incubadas com Tempol (10 µmol/L), Apocinina (300 µmol/L), Catalase (1000 U/mL) e Tiron (1 mmol/L) 30 minutos antes de serem expostas ao HgCl₂ (5 µg/mL). A produção de ânion superóxido (O₂⁻) em células endoteliais foi avaliada pela fluorescência emitida pelo dihidroetídio (DHE) como previamente descrito (JIMÉNEZ-ALTAYÓ *et al.*, 2006). A hidroetídina, na presença de O₂⁻, é oxidada em brometo de etídio, que se une ao DNA emitindo fluorescência, o que indica a presença de ânion superóxido. O brometo de etídio é excitado a 546 nm e possui um espectro de emissão de 610 nm. As células foram examinadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse T300) e as imagens foram obtidas com uma câmera digital (Diagnostic Instruments, Inc.). As imagens foram processadas usando o programa para análise e quantificação de fluorescência (Metamorph 7.1.0.0).

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

A expressão protéica da eNOS foi medida em células primariamente isoladas de coronárias suínas (entre os passes 2 e 4) após a exposição a diferentes concentrações de HgCl₂. As células endoteliais, quando confluentes, foram colocadas em jejum por 24 horas em solução *Iscove modified Dulbecco's* contendo antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL) e 5% de soro bovino fetal. Então, foram expostas ao HgCl₂ (0,05 e 5 µg/mL) por 24 horas. As células não tratadas com foram utilizadas como controle. Após o tratamento, o sobrenadante foi coletado para medida de nitritos e as células foram lavadas com solução de PBS fria (4° C) coletadas e lisadas utilizando tampão RIPA contendo um coquetel de inibidores de proteases (Complete C, Roche, Barcelona, Espanha). A concentração de proteína foi medida no lisado de células pelo método de Bradford (1976). Para a realização da medida protéica, um total de 40 mg de proteína de cada amostra foram submetidas a uma eletroforese com 7,5 % SDS-PAGE em um sistema Mini-Protean II (BioRad) durante 2 horas e transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (Amersham International plc, Little Chalfont, UK). As membranas foram incubadas durante 60 minutos, à temperatura ambiente, com uma solução bloqueante (leite desnatado 5 %, soroalbumina bovina 5 %, Tris- 25 mM, NaCl 137 mM e Tween 20 0,2 %) para evitar a união não específica com reativos não imunológicos. Em seguida estas mesmas membranas foram incubadas sob agitação com solução bloqueante contendo o anticorpo primário monoclonal de camundongo para a eNOS (1:1000, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Após este procedimento, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 0,1 %) por 30 minutos, sob agitação. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, a mesma foi exposta ao anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a *horseadish peroxidase* (1:5000, StressGen, Ann Arbor, MI, USA), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário. A proteína correspondente a eNOS foi detectada por uma reação de quimiluminescência, utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Life Science). As membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (X-ray AX film - Konica Minolta) e posteriormente reveladas. As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica. Os blots

imunológicos foram quantificados utilizando o programa de computador National Institutes of Health Image V1.56. Este mesmo processo foi utilizado para determinar a expressão da α -actina (anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina, 1:200 000, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) que foi utilizado como fator de correção da expressão protéica investigada.

3.9.4 Produção de nitritos e nitratos em meio de cultivo de células endoteliais.

As células endoteliais cresceram em placas com 6 poços e quando confluentes foram mantidas por 24 horas em solução *Iscove- modified Dulbecco's culture medium* contendo 5% de soro bovino fetal e antibióticos. Após esse período, as células foram expostas por 24 horas ao HgCl_2 (0,05; 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$).

Com a finalidade de verificar se a presença de espécies reativas de oxigênio altera o conteúdo de nitritos e nitratos em sobrenadante de células endoteliais, as células foram incubadas, 30 minutos antes da exposição a 5 $\mu\text{g/mL}$ de HgCl_2 , com Apocinina (300 $\mu\text{mol/L}$) e tiron (1 mmol/L).

Finalmente, as células tratadas foram incubadas com bradicinina (1 $\mu\text{mol/L}$) trinta minutos antes de se coletar o sobrenadante. O sobrenadante foi coletado para a medida direta de nitritos e nitratos. Após essa coleta, as células foram lavadas e coletadas utilizando tampão RIPA (FURIERI^a *et al.*, 2011).

A produção de NO foi determinada, indiretamente, pela medida do conteúdo de nitritos. As amostras (225 μL de cada amostra) foram colocadas em uma placa de 96 poços e a conversão de nitratos em nitritos foi realizada com a adição de cloreto de vanádio (III) 8 mg/mL em cada poço. Então, 75 μL do reagente de Griess (sulfanilamida (2 %) e *N*-(1 *Naphthyl*)ethylenediamina dihidrocloridrato (0.1 %)) foram rapidamente adicionados em cada poço. A absorbância a 540 nm foi mensurada usando um espectrofotômetro após 30 minutos de incubação. A concentração de nitritos foi determinada utilizando a curva de calibração padrão de nitrito de sódio. As concentrações de nitritos foram corrigidas pela concentração de proteína em cada poço medida pelo método de Lowry e utilizando o BSA como padrão. Os dados estão expressos como $\mu\text{g/mg}$ de proteína.

3.10 CORAÇÕES ISOLADOS

Após o término do tratamento crônico, os animais foram anestesiados com uretana sódica (1,2 g / kg) e uma injeção de heparina sódica (40 U) foi realizada para evitar a formação de coágulos sanguíneos durante a manipulação dos corações. Depois de anestesiados, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, o tórax aberto e o coração exposto. As artérias derivadas do arco aórtico foram amarradas com fio de algodão. O coração foi retirado e perfundido retrogradamente através da aorta com solução *Krebs-Henseleit* (em mM): NaCl: 120, KCl: 5.4, MgCl₂:1.2, CaCl₂: 1.25, NaH₂PO₄: 2, Na₂SO₄: 1,2, NaHCO₃: 24, glicose: 11; pH 7,4 e 34° C e gaseificada com mistura carbogênica (5 % CO₂ e 95 % O₂) através do coto aórtico com fluxo constante de 10 mL/min, de acordo com a técnica de Langendorff (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2007). Um transdutor de pressão (TSD 104A- conectado a um sistema Biopac MP-100) ligado ao sistema de perfusão foi utilizado para medida e acompanhamento da pressão de perfusão coronariana (PPC). A pressão coronariana é igual ao produto da resistência coronariana pelo fluxo. Como o fluxo é mantido constante, mudanças na pressão coronariana retratam alterações na resistência da circulação coronariana.

O átrio direito (AD) foi retirado visando a remoção do nódulo sinoatrial, e a frequência de estimulação elétrica foi fixada em 200 bpm através de dois eletrodos (Ag/AgCl) colocados em contato com o meio contendo a solução nutritora previamente citada. Os pulsos elétricos eram retangulares, com intensidade de 10 V e com duração de 10 a 12 ms. Os dados de frequência cardíaca foram obtidos indireta e concomitantemente a partir dos registros de pressão sistólica isovolumétrica do VE (PSIVE).

O átrio esquerdo foi aberto e um balão de látex inflável, conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A- conectado a um sistema Biopac MP-100) foi introduzido na cavidade ventricular esquerda para controle e medida da pressão diastólica isovolumétrica (PDIVE) e mensuração da PSIVE. O transdutor era mantido conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems: Inc; CA) e esses registrados em computador pelo *software* Biopac Student Lab utilizando taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo. A pressão sistólica isovolumétrica desenvolvida do VE representa a diferença entre pressão sistólica isovolumétrica e pressão diastólica isovolumétrica desta cavidade ventricular

A pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo foi fixada em 5 mmHg, através da inflação do balão de látex contido na cavidade ventricular, e a preparação mantida por um período de estabilização de 20 minutos.

Após o período de estabilização e também após 15, 30, 45 e 60 minutos de perfusão com solução de Krebs Henseleit contendo o inibidor não seletivo da sintase do NO, L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) foram realizadas medidas da FC, PPC, PDIVE e PSIVE.

Em corações de ratos dos grupos Controle e Mercúrio foi avaliada a resposta ao aumento da pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo antes e 60 minutos depois da perfusão com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$).

3.11 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS MIÓCITOS E QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO DE CORAÇÕES DE RATOS EXPOSTOS OU NÃO AO HgCl₂.

No presente trabalho duas diferentes quantificações foram realizadas para avaliar se o tratamento alterou a estrutura cardíaca. Primeiramente, foi investigado se o tratamento modificou o tamanho ou morfologia dos miócitos cardíacos. Posteriormente, investigamos se houve alguma variação no conteúdo de colágeno.

3.11.1 Morfometria dos cardiomiócitos.

Para avaliar se o tratamento com HgCl₂ altera o tamanho dos miócitos cardíacos, um total de 8 animais de cada grupo experimental foram analisados. O tecido ventricular foi fixado em solução de formoldeído 4 % tamponado com sódio. As amostras foram desidratadas e inseridas em parafina. O tecido em parafina foi cortado em secções de 4 µm e então coradas com tricrômio de Masson. Três secções de cada animal foram observados e analisados individualmente usando uma câmera monocromática de alta resolução CCD (Sony XC-75CE) conectada a um microscópio (Leica DMRB). A análise morfométrica foi realizada usando um sistema de análise de imagens (Leica Q500MC) com 8 bits de imagens em escala de cinza (256 escalas de cinza: o 0 representa o preto ou branco e mais 255 cores). Uma edição binária foi utilizada para remover artefatos que não correspondem ao corpo celular do cardiomiócito avaliado. As análises de todos os cardiomiócitos (60 a 80 por animal) foram realizadas em lentes que permitem um aumento de 40 X, que permite a clara visualização dos núcleos celulares. As mesmas condições de iluminação foram usadas em todas as medidas e a calibração do sistema foi realizada usando um micrômetro (Leitz) que permite a computação da área do objeto em unidade de µm². Somente um investigador realizou todas as medidas de ambos os grupos experimentais.

3.11.2 Quantificação do colágeno cardíaco.

Para avaliar o conteúdo de colágeno usamos o corante *Picrius Sirius* vermelho. Essa técnica é amplamente utilizada para medida de colágeno em diferentes tecidos. O tecido ventricular foi fixado em solução de formoldeído 4 % tamponado com sódio. As amostras foram desidratadas e inseridas em parafina. O tecido em parafina foi cortado em secções de 4 µm e então coradas com 0,5 % Sirius Red F3BA (Aldrich

Chemical Company). A quantificação do colágeno no ventrículo esquerdo foi realizada usando um sistema de análise de imagens (LEICA 500YW, Cambridge, UK). Os dados estão expressos como porcentagem da área total estudada. Somente um investigador realizou todas as medidas de ambos os grupos experimentais.

3.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DO MOVIMENTO DO CÁLCIO MIOCÁRDICO

Para avaliar se o tratamento altera a expressão de proteínas envolvidas com o movimento de cálcio miocárdico avaliamos, por meio da técnica de Western Blot, a expressão as seguintes proteínas: Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a); fosfolambam (PLB); fosfolambam fosforilado na serina-16 (fosfo-Ser16-PLB); trocador sódio/cálcio (NCX); e as subunidades α -1 e α -2 da Na^+ - K^+ -ATPase (NKA). Após os experimentos em corações isolados utilizando a técnica de Langendorff, os corações foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até o momento de processamento das amostras para quantificação das proteínas.

Os corações foram homogeneizados a 4°C , utilizando tampão de homogeneização constituído de : Tris- HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO_3 (1 mM); SDS, 1 %; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM , pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM) e inibidor de protease.

Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheir- Hinz, GmbH22331, Alemanha) a 4°C a 12.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido para utilização. O total de proteína presente no sobrenadante foi quantificado utilizando o método de Bradford (1976) através de espectrofotometria (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil). As alíquotas contendo quantidade específica de proteína (50 μg para PLB, PLB- phospho-Ser16 e 100 μg for SERCA, NCX, α -1, α -2 NKA) foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 μM ; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e azul de bromofenol 0,5 %). As amostras foram centrifugadas e mantidas à 95°C por 4 minutos.

As amostras foram carregadas em gel SDS-poliacrilamida a 10 % (acrilamida 40 %; Tris HCl 1,5 M pH = 8,8; SDS 10 %; persulfato amônico –APS- 10 % e Temed). As amostras para medida de proteínas de menor peso molecular (PLB e PLBser-16) foram carregadas em gel SDS- poliacrilamida a 15 %. Os géis encontravam-se imersos em uma cuba contendo tampão de eletroforese (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 %) a 4°C . As amostras foram submetidas a uma eletroforese em um sistema Mini-Protean II (BioRad) durante 2 horas, aplicando uma corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura). Isto promoveu a separação das proteínas no gel de acordo com seu peso molecular.

Após o término da eletroforese as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK) previamente ativada com água durante 20 segundos. Para a transferência, o papel Whatman, a membrana e o gel foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20 % e SDS 0,1 %) à 4 °C por uma hora usando uma corrente de 25 V em um "Semi-dry" (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad, U.S.A.).

Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5 %, Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 à 0,1 %, pH 7,5) para evitar a união inespecífica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário durante toda noite a 4° C, sob agitação, com os seguintes anticorpos primários diluídos em uma solução a 5 % de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5):

- SERCA-2a: anticorpos monoclonais de camundongo anti-SERCA-2a ATPase, 1:500, Affinity BioReagents, CO, USA.
- PLB: anticorpo monoclonal de camundongo anti-PLB, 2 µg/mL, Affinity BioReagents, CO, USA.
- fosfo-Ser₁₆-PLB: anticorpo policlonal de coelho anti-fosfo-Ser₁₆-PLB, 1:5000, Badrilla, West Yorkshire, UK.
- NCX: anticorpos monoclonais de camundongo anti-NCX, 1:200, Abcam Cambridge, MA, USA.
- α-1 NKA: anticorpo monoclonal de camundongo anti-α-1 NKA, 1:1000, Upstate, Billerica, MA, USA.
- α-2 NKA: anticorpo policlonal de coelho anti-α-2 NKA, 1:1000, Upstate, Billerica, MA, USA.
- GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase): anticorpo monoclonal de rato anti-GAPDH, 1:5000, Abcam Cambridge MA, USA. Usado para corrigir a expressão das proteínas estudadas.

Em seguida as mesmas foram lavadas 3 vezes, durante 10 minutos cada lavagem com TBS-T e incubadas por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários

(anti-coelho ou anti- camundongo 1:5000, StressGen, Victoria, Canada) conjugados à peroxidase. Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do excesso de anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a mesma solução sem tween 20.

As proteínas correspondentes foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ECL Plus, AmershamTM, GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, AmershamTM, UK), sendo as bandas impregnadas posteriormente reveladas e escaneadas. As proteínas foram quantificadas pelo número de pixels pelo sistema ImageJ, fornecido gratuitamente pela NIH (National Institutes of Health Image V1.56, EUA) via internet. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador.

3.13 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais ou unidades experimentais utilizados em cada protocolo experimental, como ocorre nos experimentos de células endoteliais.

Nos experimentos de reatividade vascular, a tensão ativa a qual o vaso foi submetido após exposição a alta concentração de KCl foi calculada pela mudança produzida na força da parede do vaso dividido por duas vezes o comprimento do segmento arterial.

A resposta vasoconstritora induzida pela 5-HT foi normalizada em função da resposta máxima de contração induzida por 120 mM de KCl, que foi considerada como 100% da resposta contrátil do músculo. A partir deste valor, as respostas contráteis à 5-HT foram normalizadas. Os resultados das respostas de relaxamento induzido pela acetilcolina e DEA-NO estão expressos como porcentagem de relaxamento relacionada à contração previamente obtida utilizando a 5-HT. Para cada curva concentração-resposta a acetilcolina e 5-HT foram calculados os valores de pD₂ (log EC₅₀) e resposta máxima (R_{máx}). Para isso, foi realizada uma análise de regressão não linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta a esses agonistas, utilizando o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A.).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à 5-HT e à acetilcolina em artérias dos diferentes grupos estudados, alguns resultados estão expressos como diferença da área abaixo da curva (dAUC) de concentração-resposta à 5-HT ou à acetilcolina em situação controle (sem fármacos) e experimental (com inibidores). A AUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC) da curva controle correspondente (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA).

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste t, pareado e/ ou não pareado para comparação de médias, e análise de variância (ANOVA), duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizada. Em caso de significância foi adotado o post-hoc de Tukey (seguido de ANOVA 1 via) ou Bonferroni (seguido de ANOVA 2 vias) para comparação das médias individuais (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA).

A expressão protéica de eNOS foi expressa pela relação entre a densidade óptica da proteína em relação a β -actina. Em corações, a expressão das proteínas relacionadas com o ciclo de cálcio (SERCA, PLB, fosfo-Ser₁₆-PLB, NCX, isoformas α -1 e α -2 da NKA) foi expressa como a razão entre a quantidade de proteína obtida por análise densitométrica e a expressão da GAPDH.

3.14 FÁRMACOS E REAGENTES

- 2-Hidroxietilmercaptano (β -mercaptoetanol) (Sigma)
- 3', 3'', 5', 5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Azul de Bromofenol)
- 4,5-diaminofluoresceína (DAF) (Sigma)
- 5- Hidroxitriptamina, serotonina (5-HT) (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido acético glacial (Probus)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido bórico (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Ácido orto-fosforico (Merck)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Merck)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo específico para fator de Von Willebrand (vWF- diluição do anticorpo 1:100, Dako, Glostrup, Denmark),
- Anticorpo produzido em camundongo para a eNOS (BD Biosciences).
- Anticorpo produzido em camundongo para fosfolambam (Affinity BioReagents)
- Anticorpo produzido em camundongo para NCX (Abcam)
- Anticorpo produzido em camundongo para SERCA-2 (Affinity BioReagents)
- Anticorpo produzido em camundongo para α -1 NKA (Millipore)
- Anticorpo produzido em camundongo para α -2 NKA (Millipore)
- Anticorpo produzido em coelho para fosfolambam fosforilado na serina 16 (Badrilla)
- Anticorpo produzido em rato para GAPDH (Abcam)

- Anticorpo secundário conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC)
- Apocinina (APO) (Sigma)
- Azul brilhante de coomassie G (Sigma, BioRad)
- Azul brilhante de Coomassie R (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Pancreac)
- Catalase (1000 U/mL)
- Cloreto de cálcio (Pancreac)
- Cloreto de cálcio dihidratado - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Cloreto de magnésio (Merck)
- Cloreto de Mercúrio (Sigma)
- Cloreto de potássio (Merck, Pancreac)
- Cloreto de sódio (Merck, Pancreac)
- Cloreto de vanádio (III) (Sigma)
- Colagenase (Worthington Biochemical Corporation)
- Complete C (Roche)
- *Diethylamine NONOate* (DEA-NO) (Sigma)
- Dihidroetídeo (DHE) (Sigma)
- Diidrogenofosfato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) (VETEC)
- DL-Ditiotreitol (DTT) (Sigma)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)
- Estreptomina (Sigma)
- Etanol absoluto (Probus, Sigma)
- Éter sulfúrico (Pancreac)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Fosfato de potássio (Pancreac)

- Fosfato de sódio (Merck)
- Gelatina
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Heparina (Roche)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Hip-His-Leu (Sigma)
- His-Leu (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Lauril sulfato sódico (SDS) (BioRad)
- Leite desnatado (Nestlé)
- Lucigenina (Sigma)
- Meio de cultura *Iscove modified Dulbecco's* (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Meio de imersão Fluoroguard, Glycerol: antifade (Biorad)
- Metanol (Sigma, Merck)
- *N*-(1 *Naphthyl*)ethylenediamina dihidrocloridrato (Sigma)
- *N*(*W*)-nitro-*L*-arginina metil éster (*L*-NAME), dicloridrato (Sigma)
- *N*, *N*, *N'*, *N'*-tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- *N*, *N'*-Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (BioRad)
- Nitrato de magnésio $Mg(NO_3)_2$ (VETEC)
- Nutrient Mixture F-12-HAM
- *O*-phataldialdeído (OPA) (Sigma)
- Parafina
- Paraformaldeído (Merck)
- Penicilina (Sigma)
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sigma)

- Persulfato Amônico (APS) (Sigma)
- Picro Sirius F3B em solução saturada de ácido pícrico (Aldrich Chemical Company)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (BioRad)
- Primers (Assays-on-Demand™ deTaqMan™- Applied Biosystems) - NOX-1 (Rn 00586652_m1), NOX-4 (Rn 00585380_m1), SOD-1 (Rn00566938_m1), SOD-2 (Rn00566942_g1) e 18S rRNA (4319413E).
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL plus) (Amersham Life Science, Pharmacia biotech)
- Sacarose (Merck)
- Soro bovino fetal (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)
- Sulfanilamida (Sigma)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)
- Superóxido Dismutase (SOD) (Sigma)
- Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- Tempol - 4-hidroxi-2,2,6,6-terametilpiperidina-1-oxil (Sigma)
- Tetraetilamônio, cloridrato (TEA) (Sigma)
- Tranilcipromina (TCP – Sigma)
- Tripsina (Sigma)
- Tricrômio de Masson (Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (BioRad)
- Tris-HCl (Sigma)
- Tiron - ácido disulfônico 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Philadelphia, PA)
- Uréia (Sigma)
- Uretana (Sigma)

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS CORONÁRIAS

4.1.1 Efeitos da exposição crônica ao HgCl_2 sobre a resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl 120 mmol/L) em artérias coronárias de ratos.

Com a finalidade de verificar a capacidade contrátil das artérias utilizadas, todos os segmentos arteriais, após procedimento de normalização, eram expostos a solução rica em KCl (120 mmol/L). A contração máxima arterial, estimulada por alta concentração de KCl de cada artéria é um importante dado, já que todas as contrações aos fármacos são expressos como porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl.

Adicionalmente, diferenças na contração ao KCl nos grupos experimentais podem ser um indicativo de lesão/alteração do músculo liso vascular. No entanto, a exposição a baixa concentração de HgCl_2 durante 30 dias não alterou a resposta ao KCl, ou seja, o tratamento não prejudicou a capacidade contrátil do músculo liso vascular, já que a resposta máxima das artérias do grupo Controle são semelhantes à resposta máxima das artérias do grupo HgCl_2 (Figura 11). A resposta máxima é expressa como contração máxima ao KCl em mN corrigido pelo comprimento da artéria em mm. As artérias utilizadas também possuíam diâmetros semelhantes entre os grupos experimentais (Figura 11A).

Todas as artérias utilizadas no presente estudo possuíam relaxamento dependente do endotélio igual ou superior a 50 % após pré-contração com 5-HT (concentração suficiente para produzir 50 % da contração máxima ao KCl). Ainda, as concentrações de 5-HT necessárias para produzir 50% da contração máxima ao KCl não foram diferentes entre os grupos (Tabela 1).

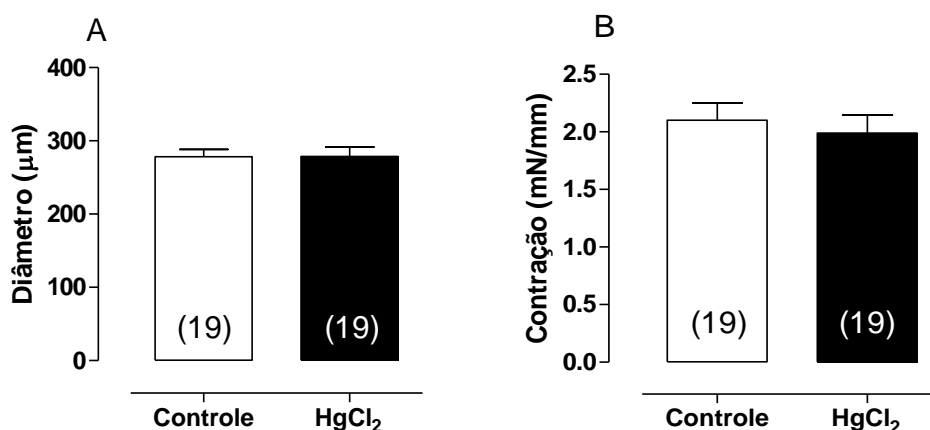


Figura 11: A- Diâmetro arterial e B- resposta máxima contrátil induzida por 120 mM de KCl em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle e HgCl₂. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como resposta contrátil induzida por 120 mmol/L de KCl corrigido pela longitude de cada segmento em mm. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 1: Concentração de 5-HT necessária para produzir aproximadamente 50% da contração máxima induzida por 120 mM de KCl em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle (n=19)	HgCl ₂ (n=19)
Concentrações de 5-HT (em µmol/L)	3,05 ± 0,59	3,31 ± 0,70 µmol/L

Valores expressos em média ± EPM.

4.1.2 Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.

A administração de 5-HT aumentou, de maneira concentração-dependente o tônus basal dos segmentos de artérias coronárias de animais expostos ou não ao HgCl₂ (Figura 12). No entanto, a resposta contrátil produzida pela 5-HT foi diferente entre os grupos. As artérias coronárias de ratos expostos ao HgCl₂ contraem mais do que aquelas retiradas de ratos Wistar expostos somente a salina. A resposta foi diferente em várias concentrações (30 µmol/L a 100 µmol/L) e também quando avaliamos a resposta máxima (Tabela 2). Porém, a sensibilidade, avaliada por meio do EC₅₀, ao fármaco não foi diferente nos grupos estudados (Tabela 2).

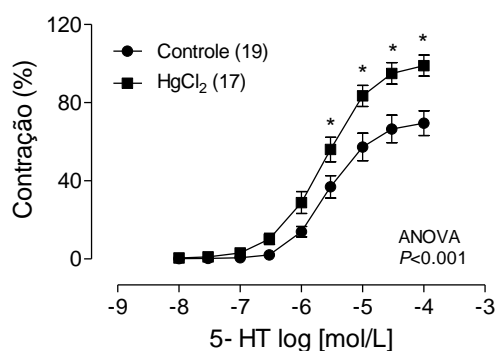


Figura 12: A- Resposta contrátil induzida pela serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle e HgCl₂. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. **p*<0,05 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 2: Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R_{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Contração à 5-HT	19	5,55 ± 0,09	69,7 ± 4,1	17	5,62 ± 0,07	101,2 ± 4,5*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação das médias. **p*< 0,05 vs Controle.

4.1.3 Participação do óxido nítrico sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.

Para entender de que maneira o tratamento durante 30 dias com HgCl₂ afetou a resposta contrátil de artérias coronárias, utilizamos o L-NAME, um inibidor não seletivo da sintase do NO. Ao avaliar a participação da via do NO sobre a resposta contrátil a 5-HT em artérias do grupo Controle e Mercúrio, observamos que o L-NAME aumentou a resposta contrátil em artérias coronárias do grupo Controle enquanto esse aumento no grupo Mercúrio foi muito menor (Figura 13A e 13B). No

grupo Controle houve diferença na resposta máxima e na sensibilidade ($R_{\text{máx}}$ e EC_{50} - Tabela 3), assim como em várias concentrações de 5-HT.

A diferença da participação da via do NO nos dois grupos estudados pode ser claramente observada na diferença de área abaixo da curva (Figura 13C).

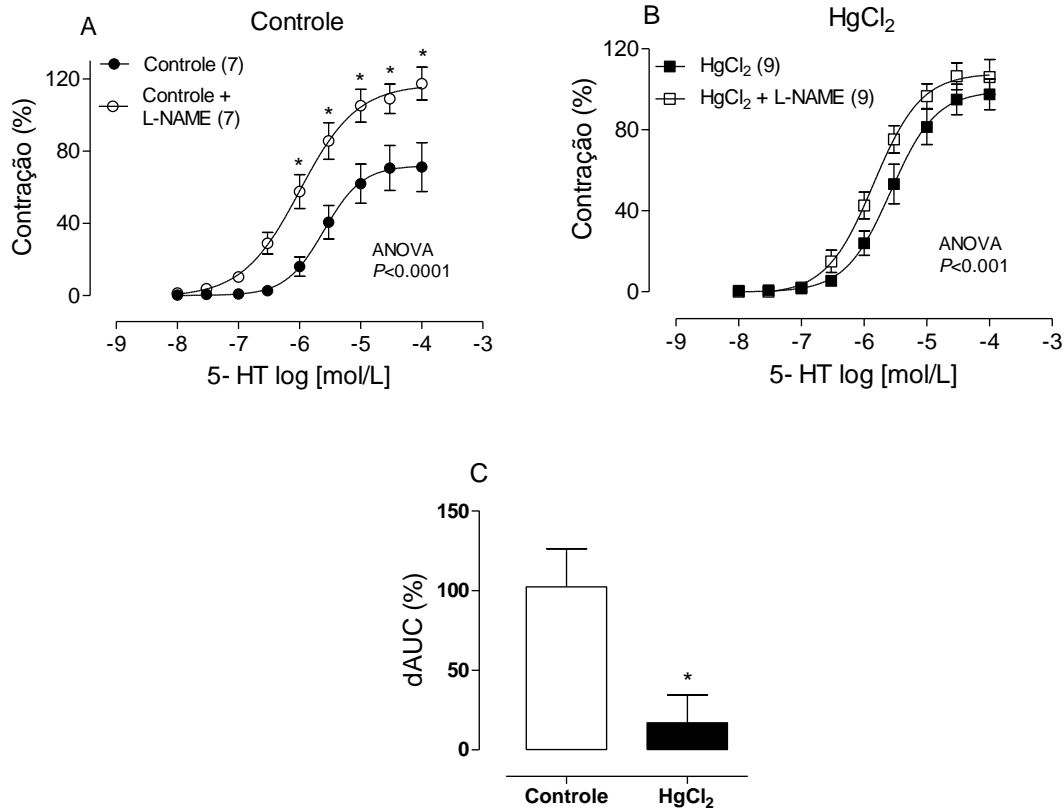


Figura 13: Efeito do L-NAME (100 μ M), inibidor inespecífico da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs situação controle (sem fármaco). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 3: Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e $R_{m\acute{a}x}$ (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de L-NAME em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao $HgCl_2$.

	Controle			$HgCl_2$		
	n	log EC 50	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	n	log EC 50	$R_{m\acute{a}x}$ (%)
Controle	7	5,60 ± 0.14	71,9 ± 6.4	9	5,57 ± 0.09	99,2 ± 5.7
L-NAME	7	5,99 ± 0,11*	117 ± 6,6*	9	5,84 ± 0,07*	108 ± 4,3

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação das médias. * $p < 0,05$ vs Controle.

4.1.4 Participação de espécies reativas de oxigênio sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.

Sabemos que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio leva à redução da biodisponibilidade do NO e, assim, aumento da contração vascular. Por isso, para elucidar a maneira pela qual o tratamento com $HgCl_2$ modifica a resposta contrátil foi necessário entender a participação das espécies reativas de oxigênio nesse modelo experimental. Ao expor, por 30 minutos, as artérias ao tiron (“varredor” não enzimático de ânion superóxido) observamos que em artérias do grupo Controle esse fármaco não alterou a contração após adição de concentrações crescentes de 5-HT. Já no grupo $HgCl_2$ a retirada do ânion superóxido, sem produção concomitante de subprodutos vasoativos, reduziu a resposta contrátil (Figura 14 e Tabela 4).

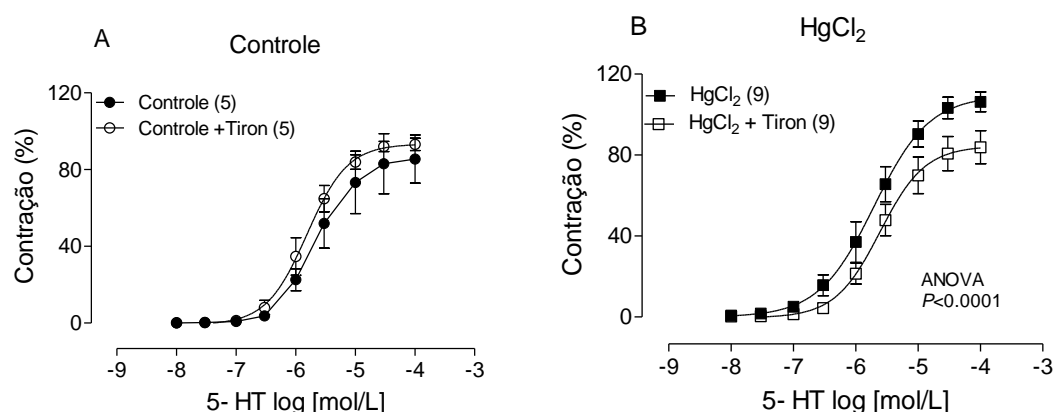


Figura 14: Efeito do tiron (1mM), varredor não enzimático de ânion superóxido, sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 4: Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R_{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de tiron em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Controle	5	5,66 ± 0,15	85,5 ± 7,9	9	5,71 ± 0,09	109,3 ± 6,1
tiron	5	5,81 ± 0,06	93,4 ± 3,4	9	5,61 ± 0,10	84,5 ± 5,4*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação das médias. **p* < 0,05 vs Controle.

A superóxido dismutase é uma enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e é o principal antioxidante endógeno vascular (MCCORD & FRIDOVICH, 1988). Assim, a utilização da SOD é uma maneira de avaliar a participação do ânion superóxido, mas com produção de H₂O₂, um produto também vasoativo. Em artérias do grupo Controle a incubação com SOD não alterou a resposta contrátil, mas em artérias coronárias do grupo Mercúrio a SOD reduziu muito a contração dessas artérias (Figura 15).

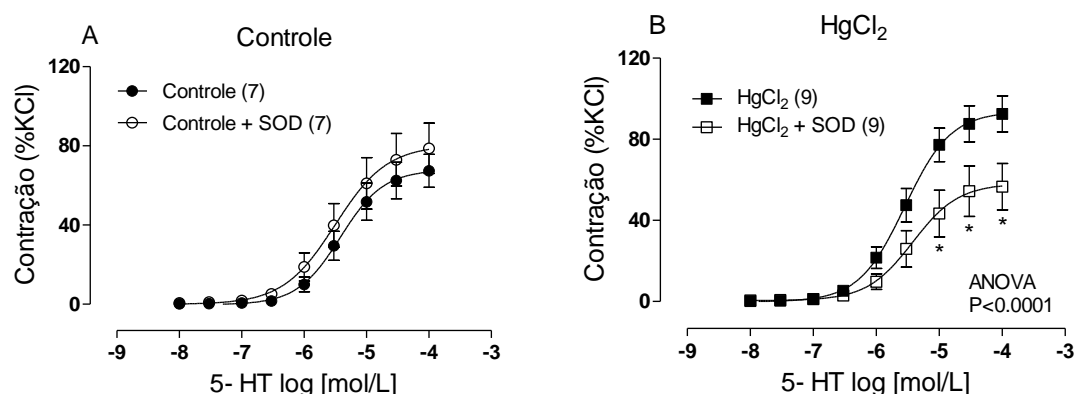


Figura 15: Efeito da superóxido dismutase - SOD (150 U/mL) sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. **p*<0,05 vs situação controle (sem fármaco). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 5: Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R_{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de SOD em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Controle	7	5,42 ± 0,13	67,9 ± 5,9	9	5,55 ± 0,09	93,6 ± 5,8
SOD	7	5,50 ± 0,19	80,4 ± 10,1	9	5,42 ± 0,20	58,1 ± 8,1*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação das médias. **p*< 0,05 vs Controle.

4.1.5 Participação de prostanóides derivados da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase (AA-COX) sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.

O tromboxano, as prostaciclina e prostaglandinas são conhecidos como prostanóides e constituem importantes produtos vasoativos produzidos pela ciclooxigenase (COX) a partir do ácido araquidônico (BOS et al., 2004). Para avaliar se os prostanóides estariam envolvidos nas alterações desencadeadas pela exposição ao HgCl₂ utilizamos a indometacina, um inibidor não seletivo da COX. Em

artérias coronárias do grupo Controle a indometacina promoveu redução da resposta contrátil a 5-HT (Figura 16-A). Em artérias no grupo Mercúrio esta redução foi ainda maior (Figura 16-B), como podemos observar pela diferença de área abaixo da curva (Figura 16-C). No grupo Mercúrio tanto a resposta máxima quanto a sensibilidade estavam menores após incubação com indometacina (Tabela 6).

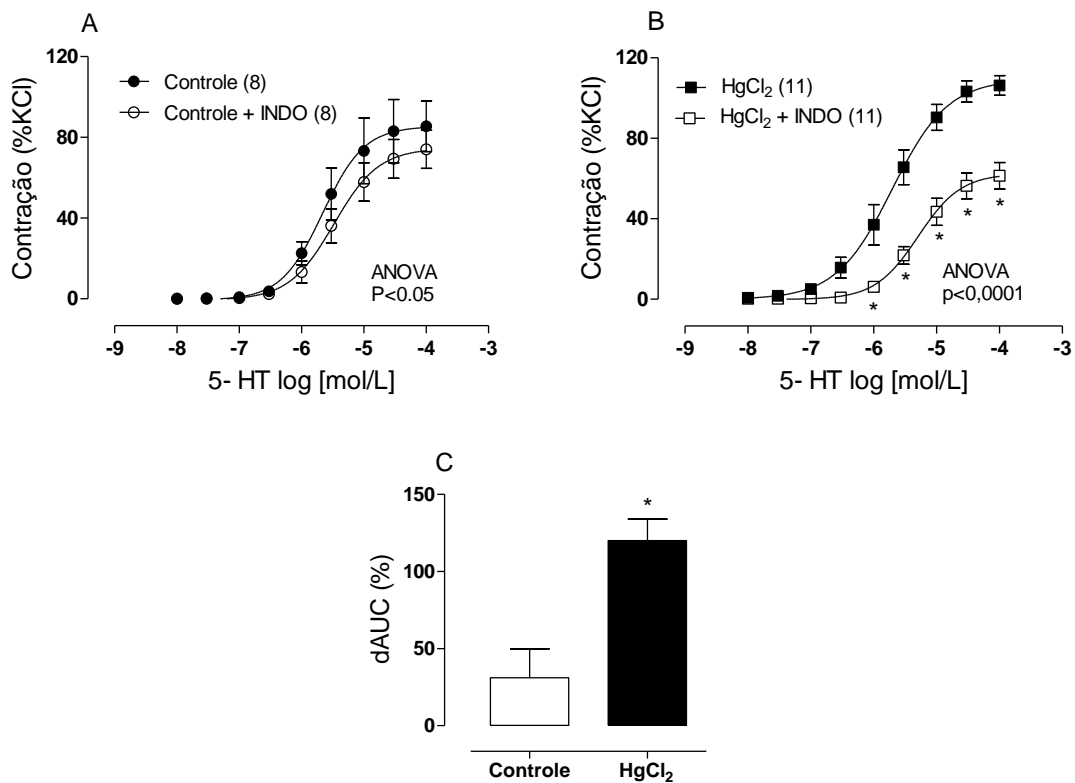


Figura 16: Efeitos da indometacina (10 μ M), inibidor inespecífico da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * p < 0,05 vs situação controle (sem fármaco). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 6: Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e $R_{m\acute{a}x}$ (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de indometacina em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao $HgCl_2$.

	Controle			$HgCl_2$		
	n	log EC 50	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	n	log EC 50	$R_{m\acute{a}x}$ (%)
Controle	8	5,66 ± 0,14	85,5 ± 7,9	11	5,71 ± 0,09	109,3 ± 6,1
INDO	8	5,48 ± 0,13	74,6 ± 6,5	11	5,29 ± 0,10*	62,5 ± 4,6*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação das médias. * $p < 0,05$ vs Controle.

4.1.6 Participação dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} sobre a resposta contrátil a 5-hidroxitriptamina (5-HT) em artérias coronárias de ratos.

Com a finalidade averiguar de qual maneira o tratamento com $HgCl_2$ está alterando o funcionamento vascular e principalmente sobre as vias endoteliais que participam da resposta à 5-HT, também avaliamos o papel modulatório do EDHF sobre a resposta contrátil mediada pela 5-HT em artérias coronárias. Para isso, curvas concentração-resposta à 5-HT foram realizadas na presença do tetraetilamônio, TEA (2 mM), um bloqueador dos canais para potássio ativados por cálcio. Como observado na Figura 17 e Tabela 7 em artérias dos animais do grupo Controle, o TEA promoveu aumento da sensibilidade e da resposta máxima a 5-HT. Entretanto, nas artérias coronárias do grupo $HgCl_2$, o TEA somente aumentou a sensibilidade, sem alterar a resposta máxima. Ao analisar, ainda, a Figura 17-C podemos inferir que a participação do EDHF é maior em artérias do grupo Controle em comparação ao grupo exposto ao $HgCl_2$.

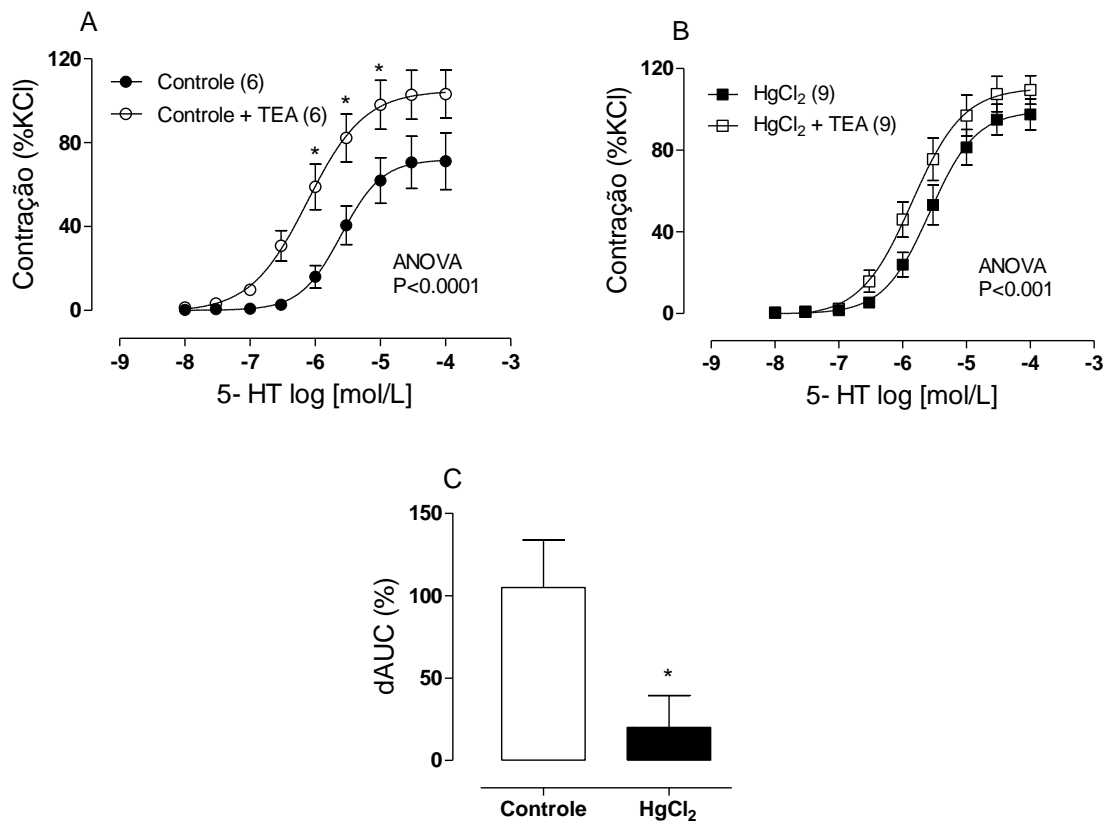


Figura 17: Efeito do tetraetilamonio (TEA- 2 mM), inibidor dos canais para potássio (K⁺) dependentes de cálcio (Ca²⁺), sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina (5-HT) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. *p<0,05 vs curva controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 7: Valores de EC 50 (5-HT log [mol/L]) e R_{máx} (% da contração a 120 mmol/L de KCl) obtidos através das curvas concentração resposta a 5-HT na presença de TEA em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Controle	6	5,60 ± 0,14	71,9 ± 6,4	9	5,57 ± 0,09	99,2 ± 5,7
TEA	6	6,12 ± 0,14*	104,8 ± 6,9*	9	5,85 ± 0,09*	110,5 ± 6

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação das médias. *p< 0,05 vs Controle.

4.1.7 Efeitos da exposição crônica ao HgCl₂ sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) e ao DEA-NO em artérias coronárias de ratos.

Para avaliar se a exposição durante 30 dias ao HgCl₂ foi capaz de alterar o relaxamento dependente ou independente do endotélio, foram realizadas, respectivamente, curvas concentração-resposta a acetilcolina (1nmol/L - 10 μmol/L) e ao DEA-NO (1 nmol/L – 10 μmol/L).

A acetilcolina promoveu relaxamento das artérias coronárias de maneira concentração dependente nos dois grupos. Porém, o tratamento com HgCl₂ levou a um prejuízo da função endotelial. A resposta máxima a acetilcolina foi menor no grupo exposto a baixa concentração de HgCl₂, porém sem alterar a sensibilidade (Figura 18-A e Tabela 8).

Ao avaliar a resposta relaxante independente do endotélio, utilizando o DEA-NO, observamos que a resposta de relaxamento do músculo liso promovida pelo fármaco foi igual entre os dois grupos estudados (Figura 18B). Desta forma, podemos sugerir que as alterações sobre o relaxamento vascular encontradas em artérias coronárias do grupo exposto ao HgCl₂ são dependentes de disfunção do endotélio vascular.

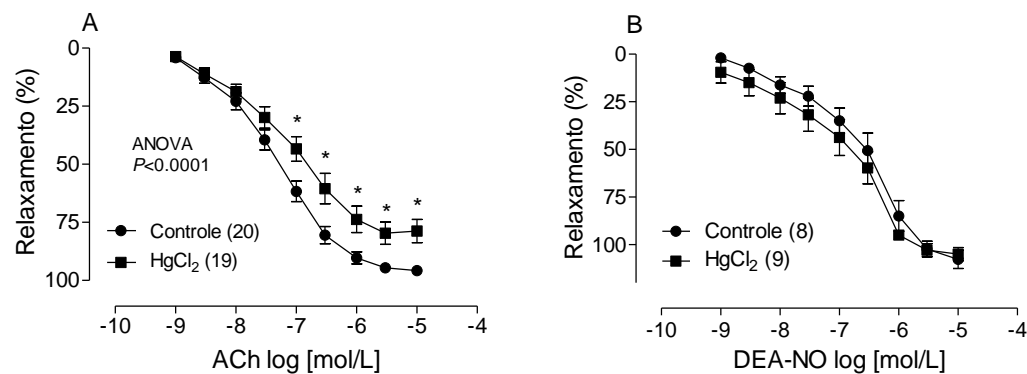


Figura 18: A- Resposta dilatadora induzida pela acetilcolina (ACh) e B- Resposta dilatadora induzida pela dietilamina (DEA)-NONOate (NO) (DEA-NO) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle e HgCl₂. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à 5-HT. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. *p<0,05 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 8: Valores de EC 50 (ACh log [mol/L] ou DEA-NO log [mol/L]) e R_{máx} (% de relaxamento após pré-contracção à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh e DEA-NO em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Relaxamento à Acetilcolina	20	7,3 ± 0,1	99 ± 2,9	19	7,1 ± 0,2	83 ± 7,1*
Relaxamento ao DEA-NO	8	6,4 ± 0,2	120 ± 11,5	9	6,6 ± 0,2	113,5 ± 10,3

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação de médias. *p<0,05 vs Controle.

4.1.8 Participação do óxido nítrico sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos.

Como observamos que a exposição ao HgCl₂ prejudicou o relaxamento dependente do endotélio, investigamos alguns mecanismos que poderiam influenciar esta resposta. Ao avaliar a participação do NO, observamos que o inibidor não-seletivo da síntese de óxido nítrico, L-NAME (100 µM), impediu a resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina em artérias coronárias do grupo Controle e reduziu de maneira importante esse relaxamento em artérias coronárias do grupo exposto ao metal (Figura 19 e Tabela 9). A diferença da participação do NO nos grupos estudados pode ser claramente visualizada na figura 19C, ou seja, no relaxamento dependente do endotélio, há maior participação do NO em artérias do grupo Controle que em artérias do grupo HgCl₂.

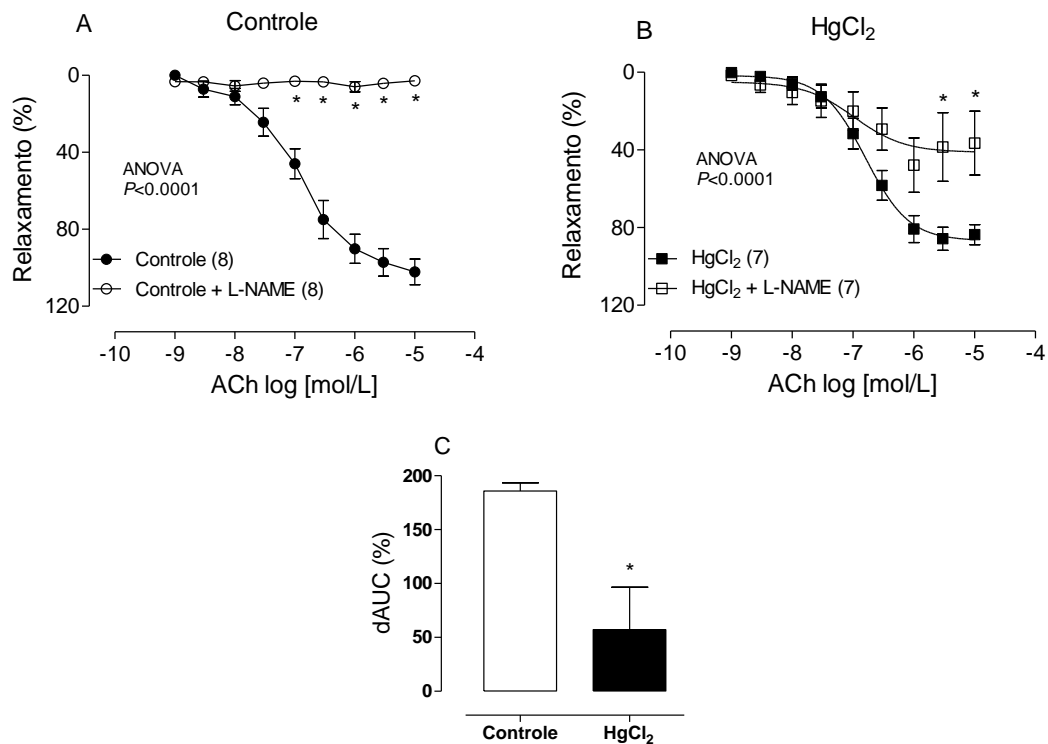


Figura 19: Efeito do L-NAME (100 μ M), inibidor inespecífico da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção induzida por serotonina (5-HT). ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs Controle na dAUC e * $p < 0,05$ vs situação controle (sem fármaco). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 9: Valores de EC 50 (ACh log [mol/L] ou DEA-NO log [mol/L]) e R_{máx} (% de relaxamento após pré-contracção à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de L-NAME em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Controle	8	6,92 \pm 0,12	103,4 \pm 6,4	7	6,79 \pm 0,09	86,9 \pm 4,4
L-NAME	8	Não foi possível calcular	Não foi possível calcular	7	6,98 \pm 0,48	41,4 \pm 9,0*

Valores expressos em média \pm EPM. Teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs Controle.

4.1.9 Participação de espécies reativas de oxigênio sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos.

Como observamos que as espécies reativas de oxigênio participam da maior resposta contrátil à 5-HT, investigamos também se o prejuízo no relaxamento dependente do endotélio estaria relacionado à maior produção de radicais livres. Para isso utilizamos o tiron (1 mmol/L), um varredor não enzimático de ânion superóxido e também a apocinina (0,3 mmol/L), inibidor da NADPHoxidase. A resposta de relaxamento vascular à acetilcolina foi avaliada na presença desses fármacos. Em coronárias do grupo Controle, nem o tiron nem a apocinina foi capaz de modificar a resposta vasodilatadora produzida pela acetilcolina, enquanto que em artérias do grupo exposto ao HgCl_2 observamos que tanto o tiron quanto a apocinina foram capazes de potencializar a resposta vasodilatadora (Figura 20 e 21). O tiron aumentou a resposta máxima de relaxamento ($R_{\text{máx}}$) e a apocinina modificou a sensibilidade à acetilcolina (EC_{50}), como demonstrado na Tabela 10. Vistos em conjunto, estes resultados indicam que há participação de espécies reativas de oxigênio no prejuízo do relaxamento observado em artérias coronárias de ratos expostos por 30 dias ao HgCl_2 e que esses radicais livres são gerados, em parte, pela NADPHoxidase.

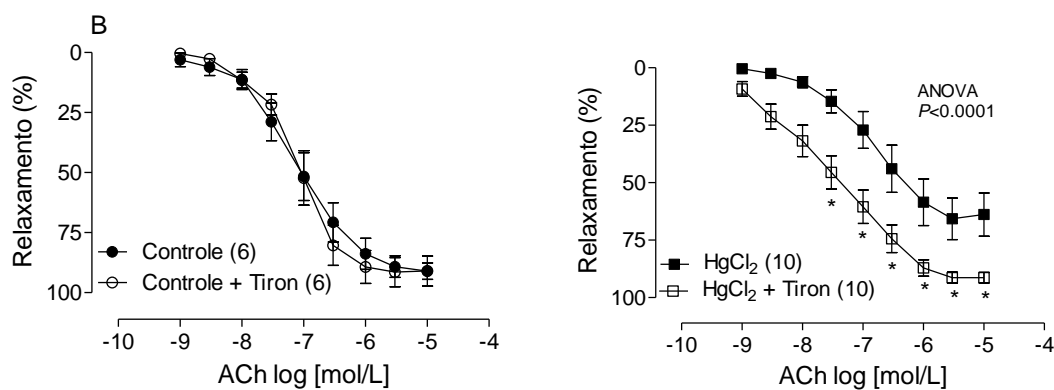


Figura 20: Efeito do tiron (1mM), varredor não enzimático de ânion superóxido, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl_2 (B). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção induzida pela serotonina (5-HT). ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ vs situação controle (sem fármaco). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 10: Valores de EC 50 (ACh log [mol/L]) e R_{máx} (% de relaxamento após pré- contração à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de tiron em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Controle	6	7,10 ± 0,12	92,2 ± 5,3	10	6,83 ± 0,21	67,5 ± 7,5
Tiron	6	7,10 ± 0,09	92,5 ± 4,1	10	7,44 ± 0,25	97,7 ± 7,9*

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação de médias. **p*<0,05 vs Controle.

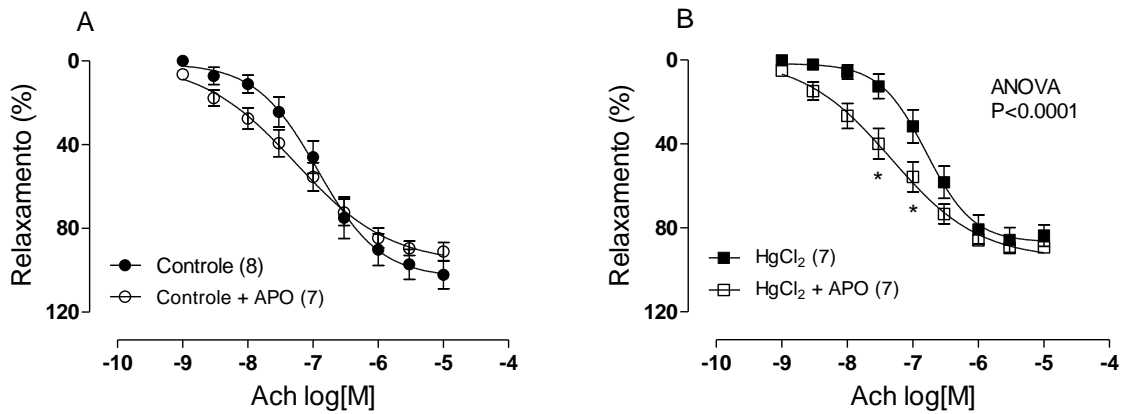


Figura 21: Efeito da apocinina (0,3 mM), inibidor da NADPHoxidase, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B). Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da pré- contração induzida pela serotonina (5-HT). ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. **p*<0,05 vs situação controle (sem fármaco). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 11: Valores de EC 50 (ACh log [mol/L]) e R_{máx} (% de relaxamento após pré-contracção à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de apocinina em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Controle	8	6,93 ± 0,12	103,4 ± 6,5	7	6,80 ± 0,09	86,9 ± 4,4
Apocinina	7	7,28 ± 0,19	96,9 ± 7,3	7	7,36 ± 0,16*	94,2 ± 5,7

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação de médias. *p<0,05 vs Controle.

4.1.10 Participação de prostanóides derivados da via do AA-COX sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos.

Já vimos anteriormente que a produção de prostanóides derivados da via do AA-COX possuem um importante papel no aumento da resposta contrátil observada em artérias coronárias de ratos expostos ao HgCl₂. Por isso, avaliamos se essa modulação ocorre também na resposta dilatadora vascular à acetilcolina. Após incubação por 30 minutos com indometacina (10 µM), as artérias coronárias não sofreram modificação da resposta dilatadora a acetilcolina (Figura 22A). Mas as artérias do grupo HgCl₂ relaxaram muito mais na presença do inibidor não seletivo da COX (Figura 22B). Tanto a sensibilidade quanto a resposta máxima estão aumentadas nessas artérias (Tabela 12).

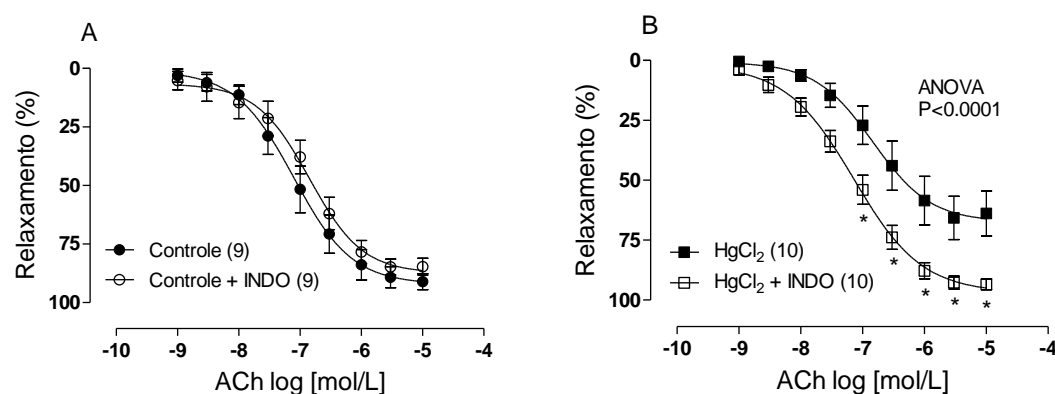


Figura 22: Efeitos da indometacina (10 μ M), inibidor inespecífico da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl_2 (B). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração induzida pela serotonina (5-HT). ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ vs situação controle (sem fármaco). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 12: Valores de EC 50 (ACh log [mol/L]) e $R_{\text{máx}}$ (% de relaxamento após pré-contração à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de indometacina em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl_2 .

	Controle			HgCl_2		
	n	log EC 50	$R_{\text{máx}}$ (%)	n	log EC 50	$R_{\text{máx}}$ (%)
Controle	9	7,10 \pm 0,13	92,2 \pm 5,3	10	6,83 \pm 0,21	67,5 \pm 7,5
Indometacina	9	6,85 \pm 0,12	87,5 \pm 5,4	10	7,14 \pm 0,09	97 \pm 4,0*

Valores expressos em média \pm EPM. Teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs Controle.

4.1.11 Participação dos canais para potássio ativados por cálcio sobre a resposta dilatadora a acetilcolina (ACh) em artérias coronárias de ratos.

Além do óxido nítrico, os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio também exercem importante função na vasodilatação, principalmente em vasos de resistência. A liberação desses fatores faz como que ocorra a ativação de canais para potássio e então a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas,

diminuindo a probabilidade de contração vascular (NELSON *et al.*, 1990). Para avaliar a participação desses canais para potássio dependente de cálcio em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl_2 , incubamos as artérias durante 30 minutos com TEA, um inibidor não seletivo de canais para potássio. Em artérias coronárias de ratos Controle o TEA reduziu o relaxamento a acetilcolina, como mostrado na figura 23A. No entanto, não observamos diferença na resposta máxima, somente na sensibilidade (Tabela 13). Porém, em coronárias de ratos HgCl_2 o TEA não teve nenhum efeito, sugerindo menor participação dos canais para potássio em artérias de ratos expostos ao metal (Figura 23B).

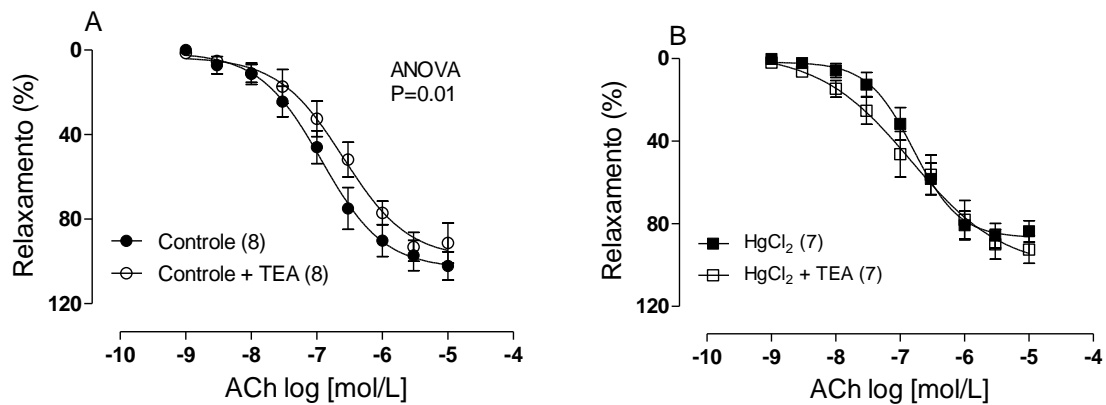


Figura 23: Efeitos do TEA (10 μM), bloqueador dos canais para potássio dependentes de cálcio, sobre a resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em segmentos de artérias coronárias de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl_2 (B). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração induzida pela serotonina (5-HT). ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 13: Valores de EC 50 (ACh log [mol/L]) e R_{máx} (% de relaxamento após pré-contracção à 5-HT) obtidos através das curvas concentração resposta a ACh na presença de TEA em artérias coronárias de ratos expostos ou não ao HgCl₂.

	Controle			HgCl ₂		
	n	log EC 50	R _{máx} (%)	n	log EC 50	R _{máx} (%)
Controle	8	6,93 ± 0,07	103,4 ± 5,85	7	6,79 ± 0,09	86,9 ± 4,44
TEA	8	6,60 ± 0,10*	98,7 ± 5,17	7	6,83 ± 0,23	102 ± 13,9

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* de Student para comparação de médias. *p<0,05 vs Controle.

4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl_2 SOBRE A QUANTIDADE PLASMÁTICA DE NITRITOS.

Em artérias coronárias observamos que o tratamento com HgCl_2 reduz a biodisponibilidade do NO, provavelmente, por aumento da produção de radicais livres derivados do oxigênio. As medidas de nitritos plasmáticos são uma maneira indireta de avaliar a produção total de NO, no entanto, pouco nos diz sobre sua produção local. Desta forma, mesmo os dados em coronária sugerindo menor biodisponibilidade de NO, quando avaliamos a quantidade de nitritos plasmáticos, não encontramos diferença entre os grupos Controle e HgCl_2 (Figura 24).

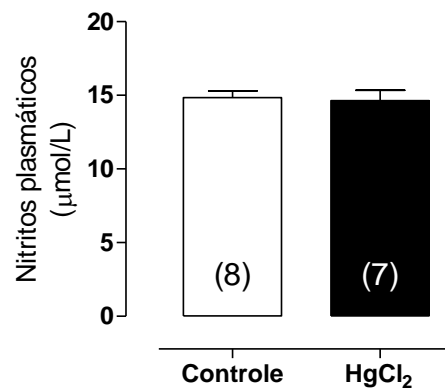


Figura 24: Medida da quantidade total de nitritos no plasma de ratos dos grupos Controle e HgCl_2 . Os resultados estão expressos como Média \pm EPM. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ SOBRE A PRODUÇÃO LOCAL DE ÓXIDO NÍTRICO EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS DE RATOS.

Com a finalidade de reforçar os resultados encontrados em reatividade vascular, que nos sugerem redução da biodisponibilidade de NO, realizamos medidas da produção local desse potente vasodilatador. Em artérias coronárias septais do grupo HgCl₂ encontramos um reduzida produção/biodisponibiliadde de NO tanto numa situação basal, como após estimulação com 5-HT e acetilcolina (situação que mimetiza o teste de integridade endotelial) (Figura 25).

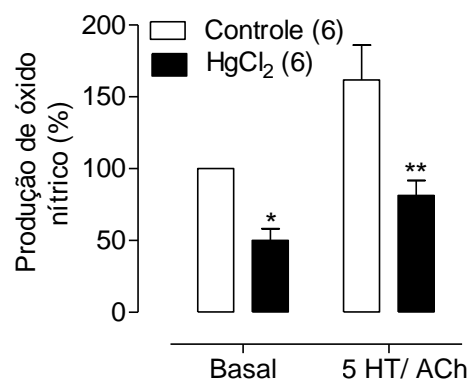


Figura 25: Produção de óxido nítrico em artérias coronárias septais de ratos dos grupos Controle e HgCl₂ em condição basal e após estimulação com serotonina (5-HT- 1 µM) e acetilcolina (ACh- 10 µM). Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da produção basal em coronárias septais de ratos do grupo Controle. Teste *t* de Student. **p*<0,05, ***p*<0,01 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl_2 SOBRE A PRODUÇÃO LOCAL DE ÂNION SUPERÓXIDO EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS DE RATOS.

A biodisponibilidade de NO está diretamente relacionada à produção de radicais livres derivados do oxigênio, principalmente o ânion superóxido, que se liga rapidamente ao NO, formando o peroxinitrito. Por isso, para elucidar a forma pela qual o tratamento com HgCl_2 reduz a produção/biodisponibilidade de NO, medimos também em artérias coronárias septais a quantidade de ânion superóxido. No grupo exposto ao metal encontramos uma produção seis vezes maior desse radical livre que a encontrada no grupo exposto somente a salina, como mostrado na figura 26.

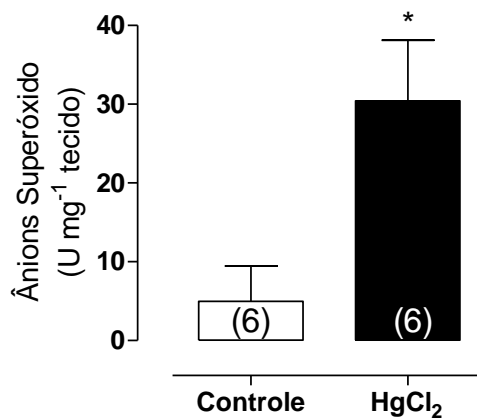


Figura 26: Produção local de ânion superóxido em artérias coronárias septais de ratos dos grupos Controle e HgCl_2 . Os resultados estão expressos como Média \pm EPM de unidades arbitrárias de luminescência por mg de tecido. Teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ SOBRE EXPRESSÃO GÊNICA DAS SUBUNIDADES NOX-1 E NOX-4 DA NADPH OXIDASE.

Vimos que a produção de EROs está aumentada e isso leva a menor biodisponibilidade de NO. Para elucidar a fonte de produção e geração dessas espécies reativas avaliamos a expressão gênica das subunidades NOX-1 e NOX-4 da NADPHoxidase que, sabidamente, é a principal fonte vascular de radicais livres. Encontramos que tanto a expressão gênica da NOX-1 como da NOX-4 estão muito aumentadas em artérias do grupo HgCl₂ (Figura 27).

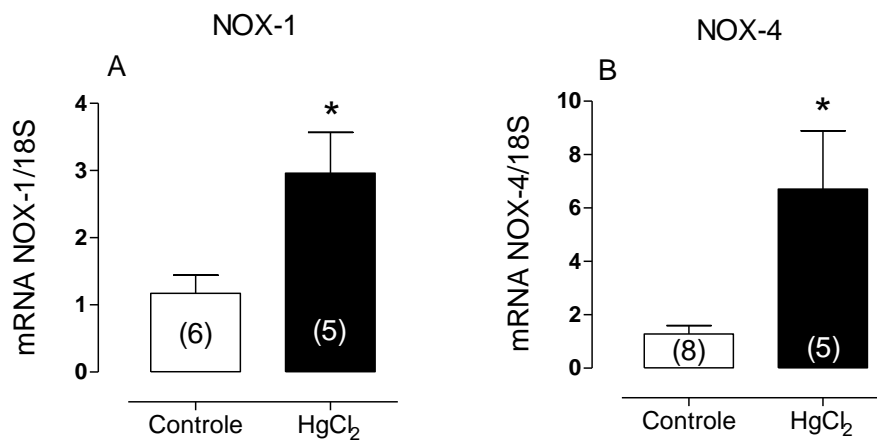


Figura 27: Medida quantitativa, realizada utilizando a técnica de RT-PCR, da expressão gênica da A- subunidade NOX-1 da NADPHoxidase (NOX-1) e da B- subunidade NOX-4 da NADPHoxidase (NOX-4) de artérias coronárias septais de ratos Controle e HgCl₂. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como expressão gênica da NOX-1 e NOX-4 em relação à expressão gênica da 18S. Teste *t* de Student não pareado. **p*<0,05 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.6 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ SOBRE EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS SOD-1 E SOD-2 DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.

Para avaliar o estado antioxidante local estudamos também a expressão gênica da SOD-1 e SOD-2, que são importantes enzimas capazes de converter o ânion superóxido e água em oxigênio molecular e H₂O₂. A expressão gênica da SOD-1 não foi alterada em artérias coronárias do grupo HgCl₂ (Figura 28A). No entanto, a expressão da isoforma 2 da SOD está cerca de seis vezes maior em artérias coronárias septais (Figura 28B).

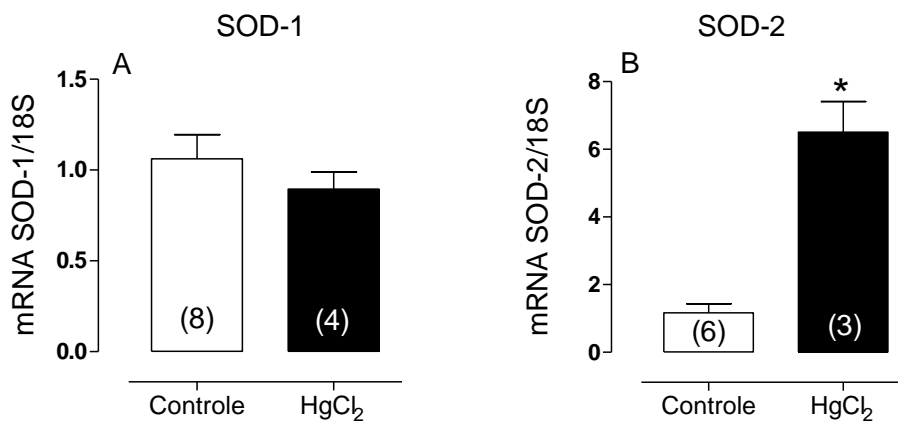


Figura 28: Medida quantitativa, realizada utilizando a técnica de RT-PCR, da expressão gênica da A- isoforma SOD-1 da superóxido dismutase (SOD-1) e da B- isoforma SOD-2 da superóxido dismutase (SOD-2) de artérias coronárias septais de ratos Controle e HgCl₂. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como expressão gênica da SOD-1 e SOD-2 em relação à expressão gênica da 18S. Teste *t* de Student não pareado. **p*<0,05 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.7 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO HgCl_2 SOBRE A MORFOLOGIA CORONARIANA

Para avaliar se o tratamento com HgCl_2 além de alterar a reatividade de artérias coronárias também foi capaz de modificar a sua estrutura, vista histologicamente. Medimos a área total do vaso, assim como a área do lúmen e da camada média. Na figura 29 podemos observar fotomicrografias representativas e os resultados da análise morfométrica. Tanto a área total dos vasos coronarianos estudados, quanto a área do lúmen estão menores em corações de ratos expostos durante 30 dias ao HgCl_2 . No entanto, não observamos diferença na área da camada média.

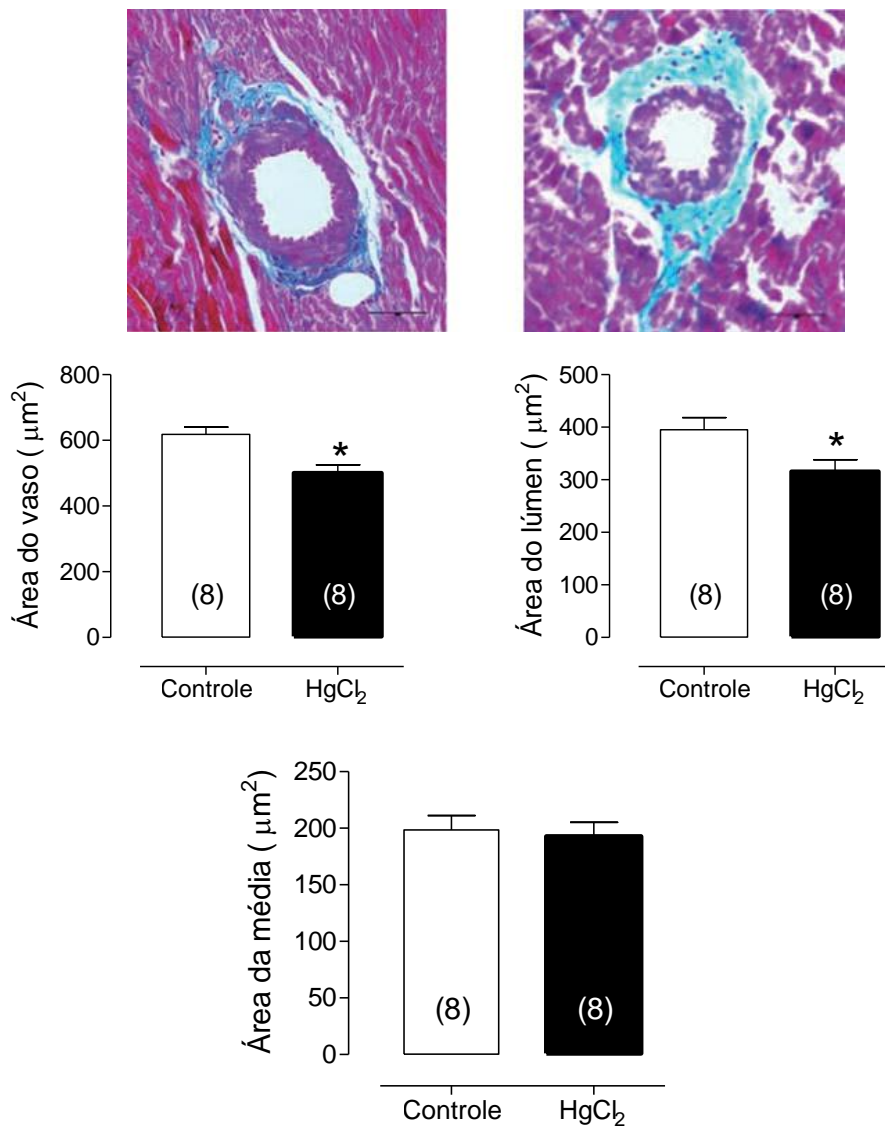


Figura 29: Análise morfométrico de vasos coronarianos de animais expostos ou não ao HgCl_2 . Área total do vaso coronariano (A), área do lúmen do vaso (B) e área da camada média do vaso (C). Dados expressos em Média \pm EPM. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.8 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl_2 EM CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORONÁRIAS SUÍNAS.

4.8.1 Caracterização de células endoteliais

Após retirada das células elas foram caracterizadas em todas as passagens utilizadas para confirmação do fenótipo de células endoteliais. Na figura 30 (esquerda) podemos observar células musculares lisas (SMC) incubadas com anticorpo primário específico para fator de Von-Willebrand e anticorpo secundário fluorescente apropriado. Observamos então que as células musculares lisas não expressam o fator que é específico para células endoteliais. Diferente do que observamos quando incubamos células endoteliais com os anticorpos primário e secundário já citados (centro). Ao microscópio de fluorescência observamos que o fator de Von-Willebrand está muito expresso em nossas células endoteliais (EC) de coronárias suínas, confirmando o fenótipo para esse tipo celular. Realizamos ainda uma incubação de células endoteliais somente com anticorpo secundário, para excluirmos a possibilidade do sinal fluorescente ser decorrente de fundo produzido por esse anticorpo. Vimos que o anticorpo secundário sozinho não foi capaz de produzir fluorescência, como demonstrado pela figura 30 (direita- CT-).

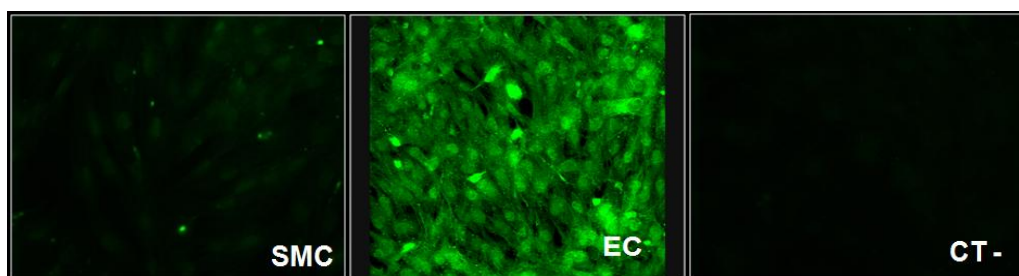


Figura 30: Painéis com microfotografias representativas de imunofluorescência emitida por células endoteliais marcadas com anticorpo primário específico para fator de Von-Willebrand e anticorpo secundário *fluorescein isotiocianate* (FITC).

4.8.2 Produção de ânion superóxido em células endoteliais

Em células endoteliais avaliamos a produção de radicais livres, principalmente ânion superóxido, utilizando o dihidroitídeo (DHE). A quantidade de espécies reativas é diretamente proporcional à intensidade de fluorescência. As células foram incubadas

com concentrações crescentes de HgCl_2 . Na figura 31 observamos os quadros com microfotografias que mostram a fluorescência emitida pelas células estudadas. Utilizando o programa para quantificação de intensidade de fluorescência (Metamorph 7.1.0.0) podemos quantificar a fluorescência. O gráfico presente na figura 31 mostra a intensidade de fluorescência nos diferentes grupos estudados. Vimos que a produção de espécies reativas é concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração de HgCl_2 que a célula foi exposta maior a intensidade de fluorescência encontrada. Em células endoteliais expostas a $5 \mu\text{g/mL}$ temos uma produção de espécies reativas três vezes maior que em células que não foram expostas ao metal. A exposição ao H_2O_2 foi utilizada para nos assegurar que o método utilizado é eficaz para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (LI *et al.*, 2001). Como mostrado nas microfotografias, a exposição ao H_2O_2 aumenta significativamente a intensidade de fluorescência após exposição ao DHE.

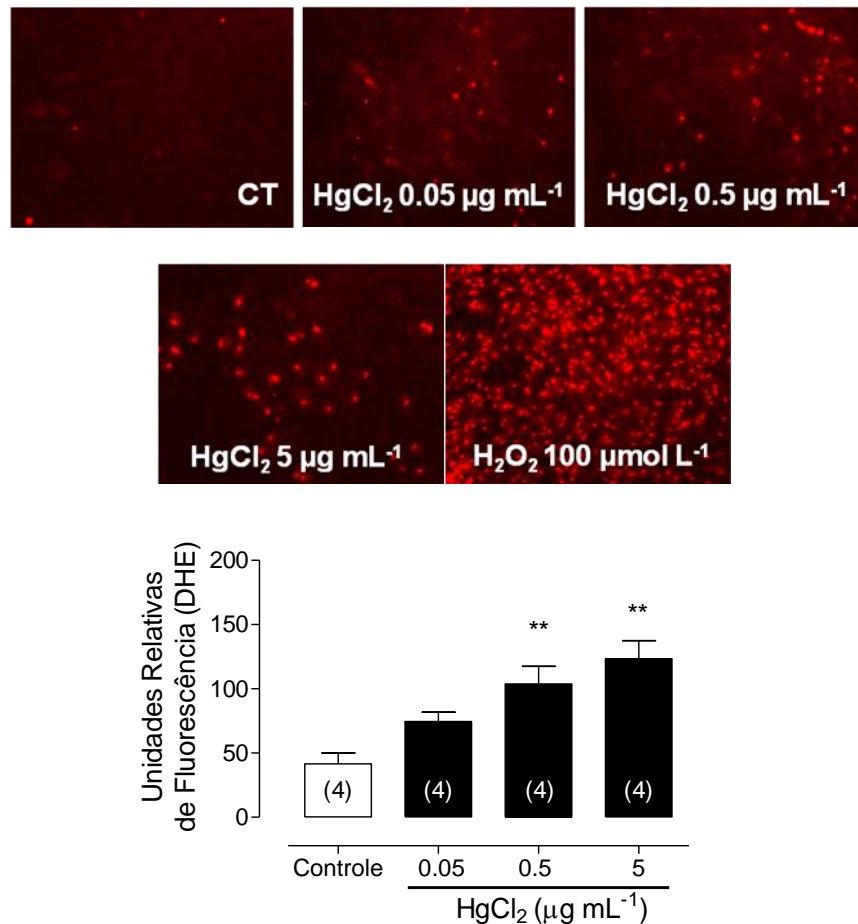


Figura 31: Painéis com microfotografias representativas da fluorescência emitida por dihidroetídeo (DHE) em células endoteliais de coronárias suínas em situação controle e expostas a 0,05; 0,5 e 5 µg/mL de HgCl₂. A exposição à H₂O₂ foi utilizada como controle positivo para produção de ânion superóxido. O gráfico representa a intensidade de fluorescência em unidade arbitrária (UA) emitida por DHE. ANOVA uma via seguida de *post hoc* de Tukey. Os resultados estão expressos em média ± EPM. $p < 0,01$ vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Para verificar se a produção de ânion superóxido era modificada por antioxidantes, células foram incubadas com tempol (10 µmol/L), apocinina (300 µmol/L), catalase (1000 U/mL) e tiron (1 mmol/L) 30 minutos antes de serem expostas ao HgCl₂ (5 µg/mL). Encontramos que a exposição aos antioxidantes estudados reduz a emissão de fluorescência, sugerindo redução da produção de espécies reativas de oxigênio. Podemos inferir que as principais vias envolvidas na produção destas espécies reativas de oxigênio são a NADPHoxidase e também a eNOS desacoplada, sendo a NADPHoxidase com maior participação, já que a incubação com apocinina reduziu

muito a produção de EROs e o L-NAME também foi capaz de reduzir a emissão de fluorescência, no entanto em menor magnitude (Figura 32).

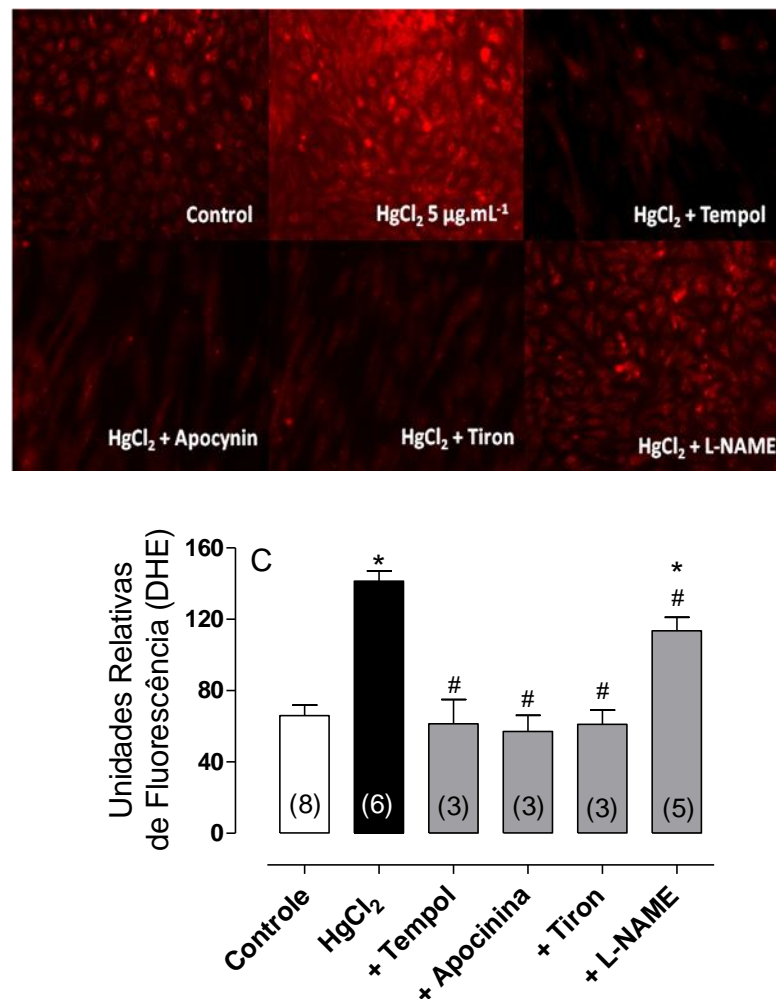


Figura 32: Painéis com microfotografias representativas da fluorescência emitida por dihidroetídeo (DHE) em células endoteliais de coronárias suínas em situação controle e expostas a HgCl₂ - 5 µg/mL e a HgCl₂ - 5 µg/mL + Tempol, Apocinina, Catalase ou Tiron. A exposição à H₂O₂ foi utilizada como controle positivo para produção de ânion superóxido. O gráfico representa a intensidade de fluorescência em unidade arbitrária (UA) emitida por DHE. ANOVA uma via seguida de *post hoc* de Tukey. Os resultados estão expressos em média ± EPM. *p<0,05 vs Controle, #p<0,05 vs HgCl₂. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.8.3 Produção de nitritos e nitratos em meio de cultivo de células endoteliais

Para avaliar de que maneira o aumento de produção de EROs estava influenciando a produção/biodisponibilidade de NO pelas células endoteliais de coronárias suínas,

também medimos a produção de nitritos e nitratos, subprodutos da degradação de NO, em meio de cultivo celular, após exposição a crescentes concentrações de HgCl₂ e concomitante ao uso dos antioxidantes estudados. Vimos que a exposição ao metal é capaz de reduzir a quantidade de nitritos no meio de cultivo celular (figura 33). A exposição aos antioxidantes 30 minutos antes da exposição ao HgCl₂ levou a um aumento da quantidade de nitritos (Figura 33). Ou seja, o aumento da produção de radicais livres derivados do oxigênio, seja via NADPHoxidase ou eNOS desacoplada, é o principal responsável pela redução da produção de nitritos em cultivos de células endoteliais.

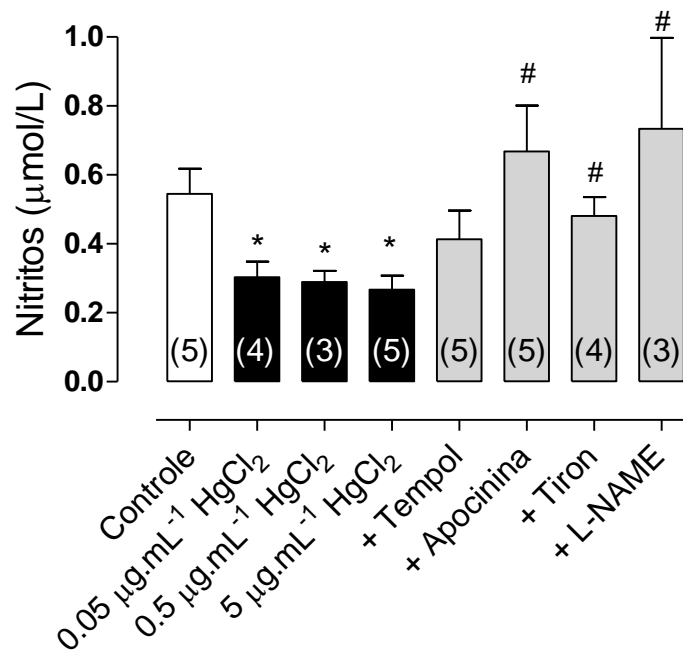


Figura 33: Efeitos do tempol (1 mmol/L), apocinina (300 µmol/L), tiron (1 mmol/L) e L-NAME (100 µmol/L) na produção de nitritos em células endoteliais expostas a 5 µg/mL de HgCl₂. A produção de nitritos também foi medida em células expostas a 0,05 e 0,5 µg/mL de HgCl₂. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como expressão da eNOS em relação a β-actina. ANOVA uma via seguida de post hoc de Tukey. *p<0,05 vs Controle; # p < 0,05 vs. 5 µg/mL HgCl₂. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.8.4 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico em células endoteliais.

A principal fonte produtora de NO em células endoteliais é a eNOS, no entanto, na falta de substrato para a produção de NO (como por exemplo o tetrahidropterina-

BH₄), a eNOS gera radicais livres. Em células endoteliais de coronárias suínas vimos que a exposição durante 24 horas a HgCl₂ aumenta 50 % da expressão protéica da eNOS (Figura 34). Esse aumento pode ser compensatório, devido à menor produção de NO, evidenciado pela redução de nitritos no meio de cultivo celular. No entanto, mesmo que compensatório, pode estar contribuindo também para maior produção de radicais livres derivados do oxigênio.

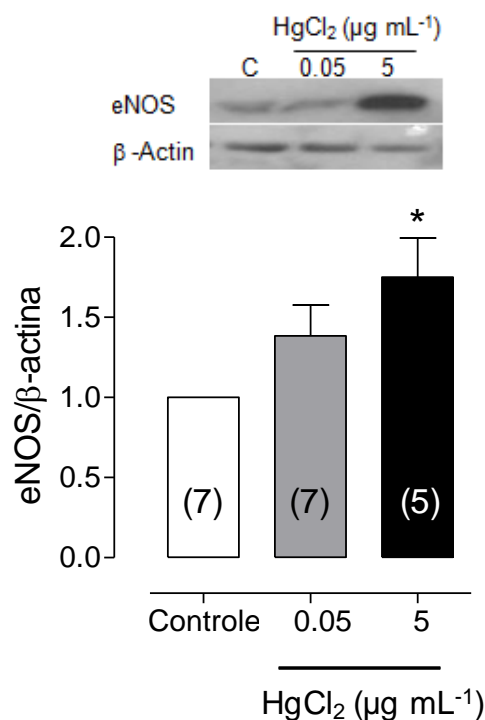


Figura 34: Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) em células endoteliais de coronárias suínas em situação Controle e expostas a 0,05 e 5 μg/mL. As fotos acima mostram as bandas representativas da expressão da eNOS e da β-actina. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como expressão da eNOS em relação a β-actina. ANOVA uma via seguida de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.9 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA FUNÇÃO DE CORAÇÕES ISOLADOS EXPOSTOS AO HgCl₂.

4.9.1 Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo

FURIERI e colaboradores 2011^a mostram que a exposição a baixa concentração de HgCl₂ durante 30 dias diminui a força contrátil de corações perfundidos pela técnica de Langendorff. Esses dados foram repetidos neste trabalho, já que quando comparamos a PSIVE no momento imediatamente anterior ao início da perfusão com L-NAME encontramos menor PSIVE gerada em corações do grupo HgCl₂. Para elucidar se o NO estaria participando dessa diminuição de força contrátil, perfundimos os corações durante 60 minutos com L-NAME. Além de ser um importante vasodilatador, o NO também é capaz de modular a gênese de força cardíaca. A perfusão de corações do grupo Controle com o inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico não modificou a PSIVE e a pressão desenvolvida (Figura 35A e 35C). Já em corações de ratos expostos ao metal observamos queda da PSIVE e também da pressão desenvolvida (Figura 35B e 35D). Para demonstração dos dados utilizamos tanto a PSIVE quanto a pressão desenvolvida, visto que alterações na pressão diastólica poderiam alterar a PSIVE. A pressão desenvolvida é uma maneira clara de demonstrar o quanto de pressão o coração gerou, pois é calculada como a diferença entre PSIVE e PDIVE.

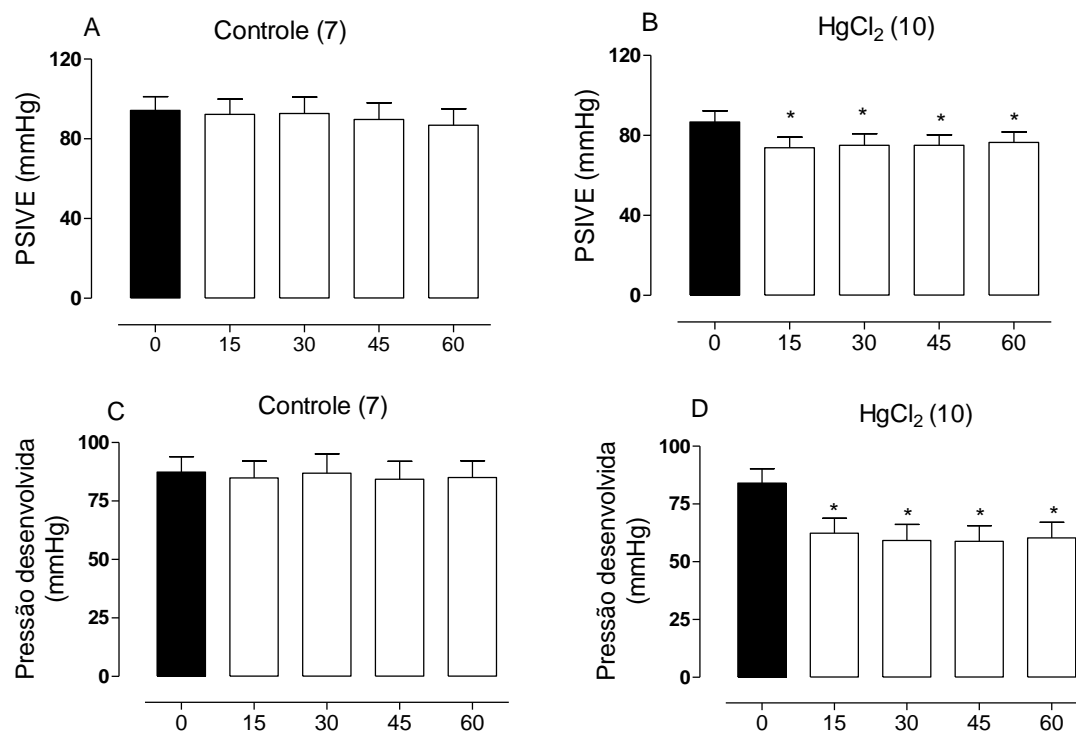


Figura 35: A e B- Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE), C e D- Pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos dos grupos Controle e HgCl₂ antes e durante 60 minutos de perfusão com L-NAME (100 μM). Dados expressos em Média ± EPM. ANOVA uma via seguido de *post hoc* de Tukey. **p*<0,05 vs 0. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.9.2 Pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo

De maneira semelhante, como mostrado na figura 36, observamos que a perfusão com L-NAME não modificou a PDIVE em corações do grupo Controle, mas aumentou muito esse parâmetro em corações do grupo HgCl₂. O aumento chega a quatro vezes após 30 minutos de exposição.

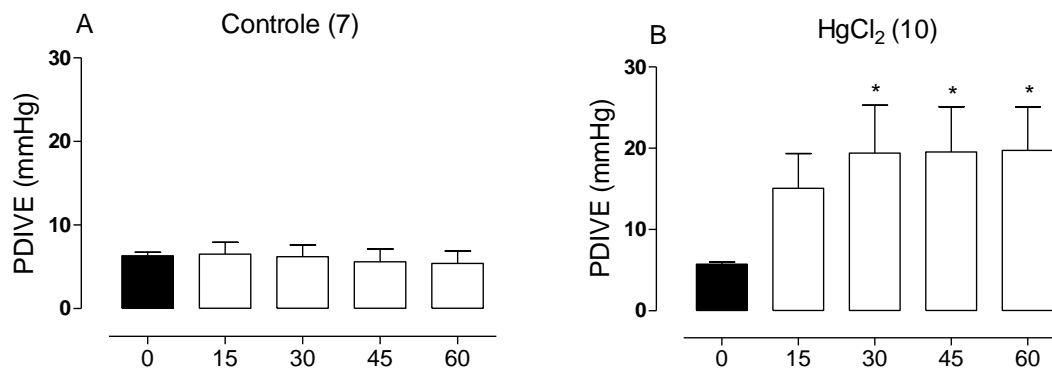


Figura 36: Pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PDIVE) de corações isolados de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B) antes e durante 60 minutos de perfusão com L-NAME (100 μM). Dados expressos em Média ± EPM. ANOVA uma via seguido de *post hoc* de Tukey. *p<0,05 vs 0. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.9.3 Pressão de perfusão coronariana

O NO é um potente vasodilatador, então a inibição de sua síntese esperadamente causaria vasoconstrição. Como em corações isolados perfundidos com a técnica de Langendorff utilizamos fluxo de solução nutritiva constante, o aumento de resistência vascular levaria a um aumento de pressão de perfusão coronariana. Nessa técnica estudada cabe salientar que a PPC também se torna dependente do tecido miocárdico subjacente, além do importante controle metabólico presente nesse leito vascular (DEUSSEN et al., 2006). Em corações de ambos os grupos estudados encontramos aumento da PPC (Figura 37A e 37B), no entanto, esse aumento está mais evidenciado no grupo HgCl₂, como demonstrado na Figura 36C, que mostra o incremento de PPC após 60 minutos de perfusão com L-NAME nos dois grupos experimentais. No grupo Controle houve um incremento de cerca de 20 % (não significativo), enquanto no grupo HgCl₂ esse incremento quase alcançou 60 %.

O aumento de pressão intraventricular durante a diástole pode estar participando também do aumento da PPC observada em corações de animais expostos ao metal. Os vasos coronarianos encontram-se inseridos em tecido miocárdico e se há maior pressão durante a diástole, mais o tecido subjacente irá comprimir esses vasos coronarianos.

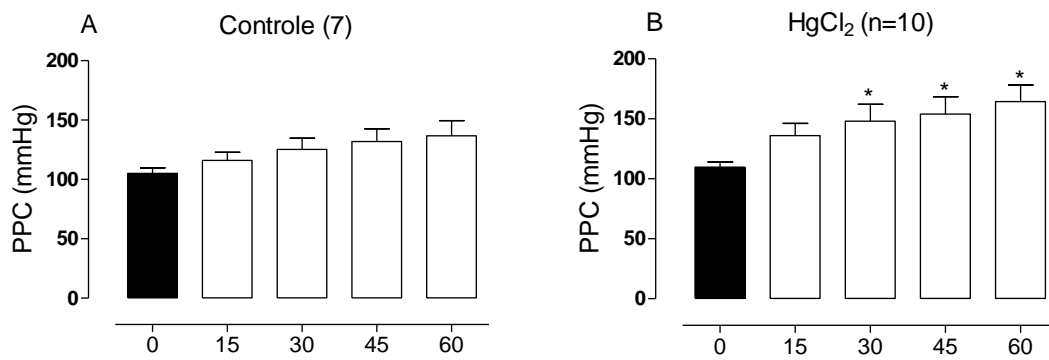


Figura 37: Pressão de perfusão coronariana (PPC) de corações isolados de ratos dos grupos Controle (A) e HgCl₂ (B) antes e durante 60 minutos de perfusão com L-NAME (100 μM) em corações isolados de ratos dos grupos Controle e HgCl₂. Dados expressos em Média ± EPM. ANOVA uma via seguido de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ vs Controle + L-NAME. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.9.4 Incidência de alterações no ritmo cardíaco

Além da redução na PSIVE e aumento da PDIVE, também observamos que após a perfusão com L-NAME os corações do grupo HgCl₂ mostram uma incidência aumentada de alterações do ritmo cardíaco, mesmo a geração de estímulo sendo extrínseca e controlada nessa técnica utilizada. As mudanças do ritmo cardíaco não foram quantificadas, no entanto, podemos observar com facilidade estas alterações na figura 38.

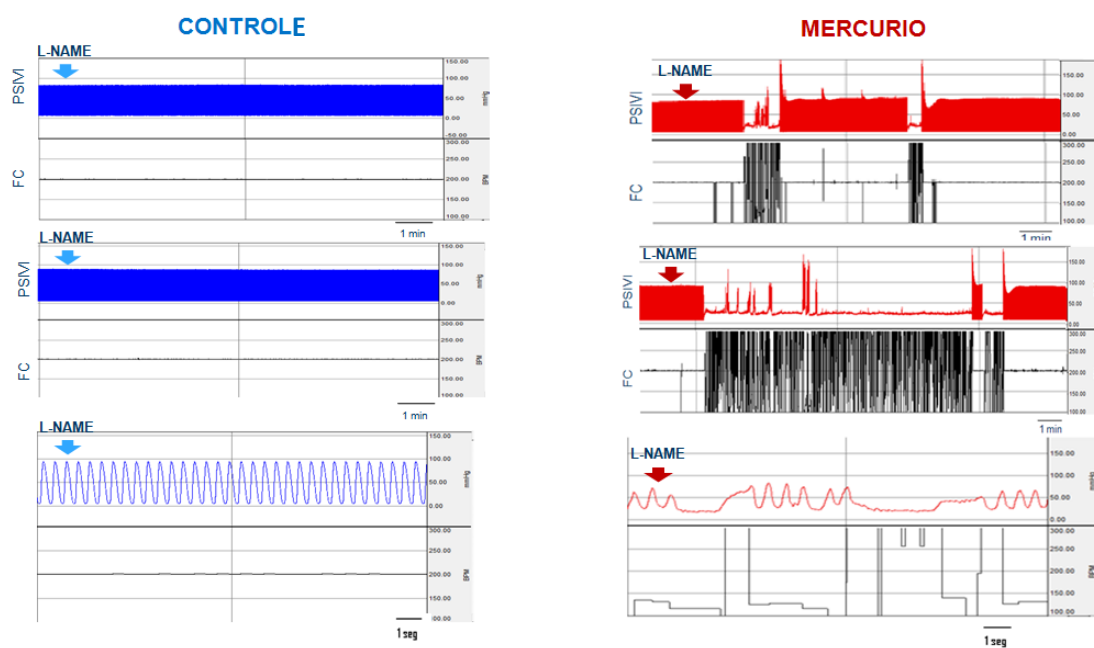


Figura 38: Registro típico mostrando a incidência de alterações no ritmo cardíaco após perfusão com L-NAME (100 μ M) em corações isolados de ratos dos grupos Controle e HgCl₂.

4.10 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ DURANTE 30 DIAS SOBRE A EXPRESSÃO PROTÉICA EM CORAÇÕES DE RATOS

4.10.1 Efeito da exposição ao HgCl₂ sobre a expressão protéica de SERCA e Fosfolambam cardíacos

Em corações do grupo HgCl₂ observamos uma expressão diminuída da SERCA (Figura 39A), enquanto há aumento da expressão protéica do fosfolambam (Figura 39B). E, ainda, o fosfolambam fosforilado na serina-16 possui expressão reduzida (Figura 39C). A razão SERCA/PLB, que indiretamente nos permitem inferir sobre a funcionalidade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático também está diminuído (Figura 39D), ou seja, sugerindo redução do funcionamento desse importante mecanismo de recaptção de cálcio do mioplasma para o retículo sarcoplasmático.

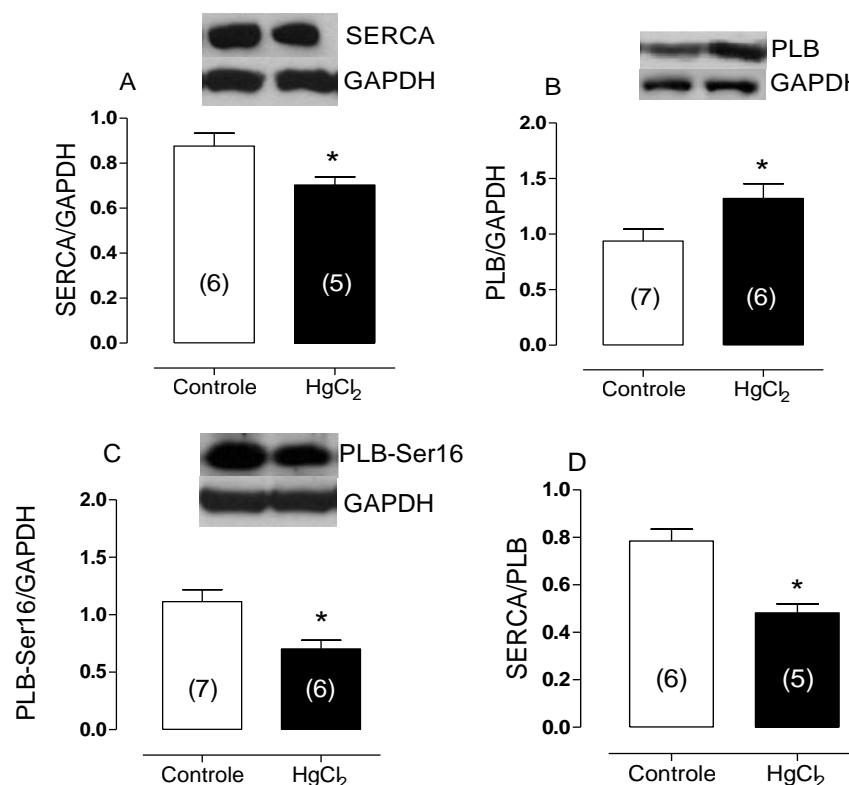


Figura 39: A- Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da SERCA, B- Fosfolambam (PLB), C- Fosfolambam fosforilado (PLB-Ser16) e D- Relação SERCA/PLB em corações de ratos Controle e HgCl₂. Os blots típicos acima mostram as bandas representativas da expressão da SERCA, PLB e PLB-Ser16 e da GAPDH em corações de ratos de ambos grupos. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como expressão da SERCA, PLB e PLB-Ser16 em relação a GAPDH. Teste *t* de Student não pareado. **p*<0,05 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.10.2 Efeito da exposição ao HgCl₂ sobre a expressão protéica da NKA e NCX

Quando avaliamos a expressão protéica do trocador Na⁺/Ca²⁺ do sarcolema observamos redução da expressão dessa proteína de membrana no grupo HgCl₂ quando comparado com o grupo Controle (Figura 40A). Para avaliar se o tratamento durante 30 dias com HgCl₂ modificou a expressão protéica da NKA, medimos, utilizando o método de Western Blot, a expressão de duas das suas isoformas, a α -1 e α -2. A expressão protéica da isoforma α -1 está reduzida no grupo experimental HgCl₂, porém, não encontramos alteração na expressão da isoforma α -2 (Figura 40B e 40C).

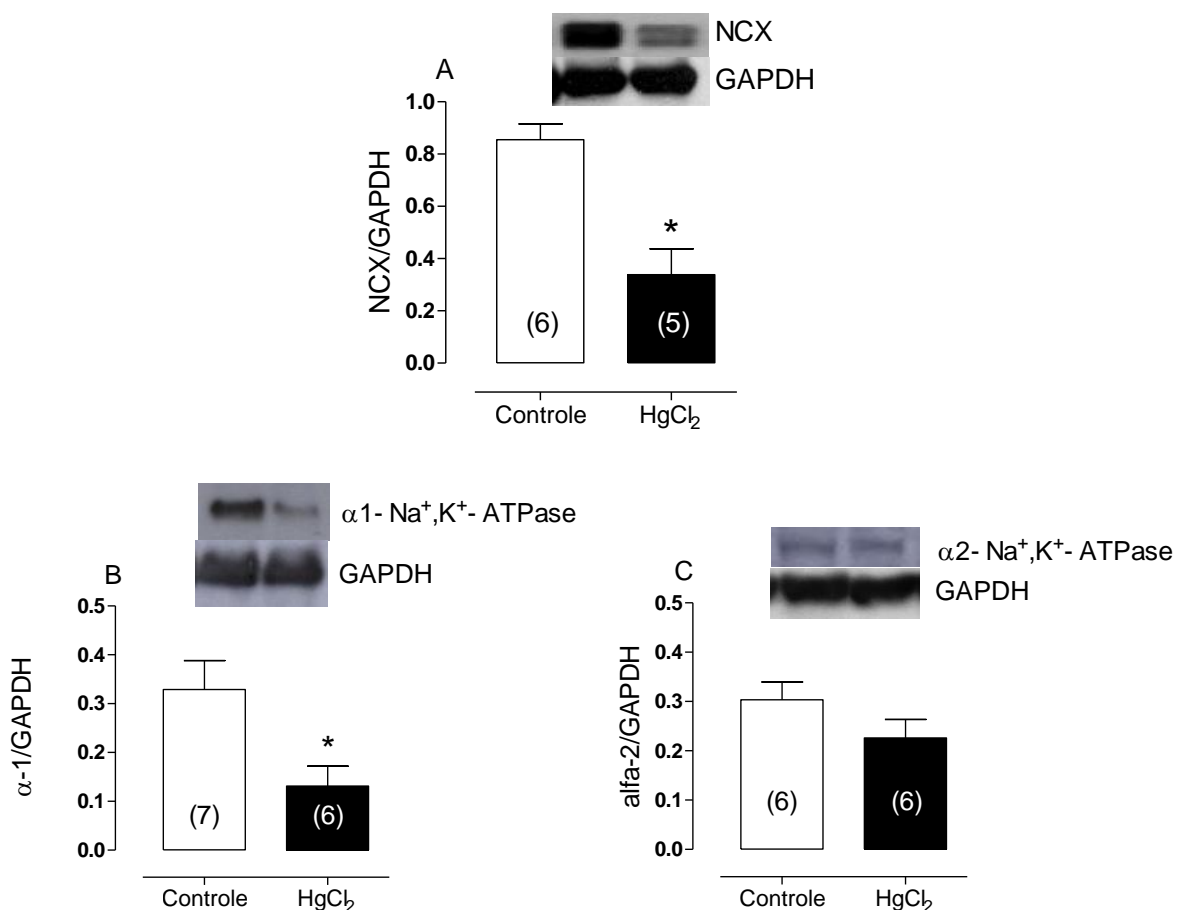


Figura 40: A- Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica do trocador Na⁺-Ca⁺⁺ (NCX), B- isoforma α 1 da Na⁺-K⁺- ATPase (NKA) e C- isoforma α 2 da Na⁺-K⁺- ATPase em corações de ratos Controle e HgCl₂. Os blots típicos acima mostram as bandas representativas da expressão do NCX e das isoformas α 1 e α 2 da NKA e da GAPDH em corações de ratos de ambos grupos. Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como expressão do NCX, das subunidades α 1 e α 2 da NKA em relação a GAPDH. Teste *t* de Student não pareado. **p*<0,05 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.10.3 Efeito da exposição ao HgCl₂ sobre a expressão protéica da eNOS e iNOS cardíaca.

Além de ser um importante vasodilatador, o NO também exerce efeitos parácrinos no músculo cardíaco, e células do miocárdio e fibroblastos podem expressar a iNOS e também células do endocárdio expressam eNOS e iNOS (SHAH & MACCARTHY, 2000). Por isso, avaliamos a expressão protéica da eNOS e iNOS. Em corações de ratos expostos ou não ao HgCl₂. Observamos que tanto a expressão da eNOS quanto da iNOS está diminuída em corações de ratos do grupo HgCl₂ (Figura 41A e 41B).

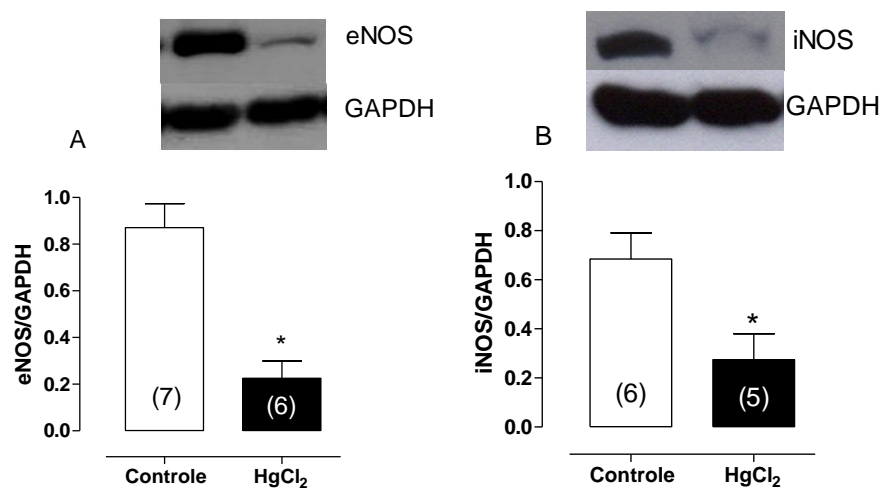


Figura 41: A- Análise densitométrica de *Western blot* para expressão protéica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) e B- isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) em corações de ratos Controle e HgCl₂. Os blots típicos acima mostram as bandas representativas da expressão da eNOS, iNOS e da GAPDH em corações de ratos de ambos grupos. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como expressão da eNOS e iNOS em relação a GAPDH. Teste *t* de Student não pareado. **p*<0,05 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.11 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl_2 SOBRE A MORFOLOGIA DE CARDIOMIÓCITOS E CONTEÚDO DE COLÁGENO EM CORAÇÕES.

Furieri e colaboradores em 2011 mostraram que a exposição durante 30 dias ao HgCl_2 não altera o peso das câmaras ventriculares em relação ao peso corporal dos animais. No entanto, nunca se havia avaliado se ocorria alteração dos parâmetros morfométricos de cardiomiócitos e também do conteúdo de colágeno após esse período de exposição ao HgCl_2 .

A figura 42 mostra que nenhum dos parâmetros morfométricos avaliados em cardiomiócitos estavam diferentes no grupo HgCl_2 . O comprimento, o largura, o perímetro e a área dos cardiomiócitos de corações do grupo HgCl_2 são semelhantes ao grupo Controle.

Ainda, nenhuma mudança foi observada no conteúdo de colágeno de ventrículo esquerdo de ratos expostos ao mercúrio quando comparado com os ratos expostos somente a salina (Controle: $5,1 \pm 0,8$ vs HgCl_2 : $4,7 \pm 0,6$ % de área tecidual- Figura 43).

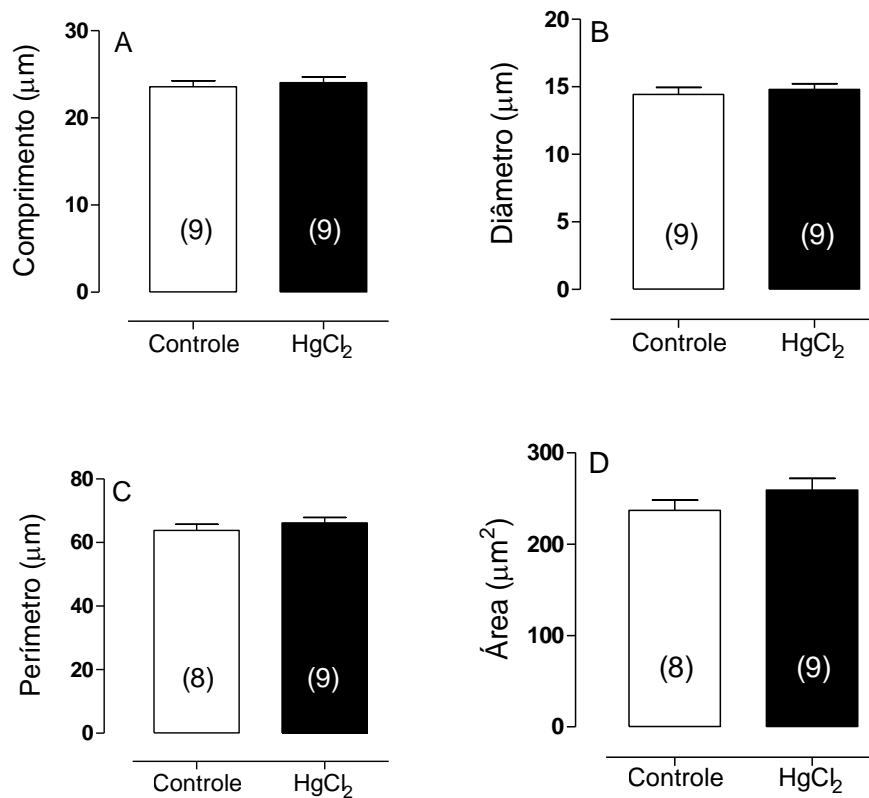


Figura 42: Análise morfométrico de cardiomiócitos de animais expostos ou não ao HgCl₂. Comprimento do cardiomiócito (A), diâmetro (B), perímetro (C) e área (D). Dados expressos em Média ± EPM. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

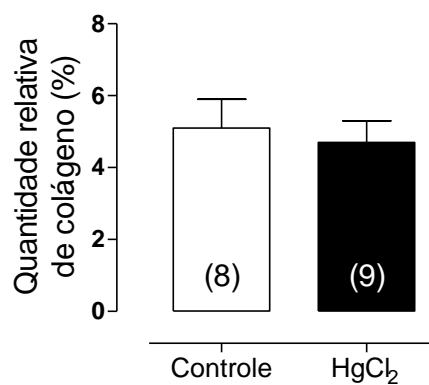


Figura 43: Quantificação do colágeno do ventrículo esquerdo de animais expostos ou não ao HgCl₂. Os dados estão (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem do tecido total. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo mostramos, pela primeira vez, os efeitos da exposição a baixa concentração de HgCl_2 durante 30 dias sobre a reatividade de artérias coronárias de ratos. Encontramos que mesmo em baixa concentração o tratamento foi capaz de alterar o funcionamento desse importante leito vascular. As artérias coronárias apresentaram maior reatividade à serotonina e também déficit de relaxamento à acetilcolina. Os dados sugerem que esses efeitos observados se devem ao aumento da produção de radicais livres derivados do oxigênio, principalmente o ânion superóxido, ocasionando redução da biodisponibilidade de NO. Ainda, por aumento da participação de prostanóides vasoconstrictores derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase. Confirmando os resultados encontrados em reatividade vascular, vimos que a produção local de NO em artérias coronárias septais está prejudicada, enquanto há um importante aumento da geração de ânion superóxido. A expressão gênica das duas principais isoformas geradoras de radicais livres da NADPHoxidase, a NOX-1 e NOX-4 está aumentada, sugerindo que essa é a principal fonte de produção de espécies reativas após exposição ao HgCl_2 . A expressão gênica da SOD-2, uma importante enzima responsável por transformar o ânion superóxido em H_2O_2 e oxigênio molecular, também está aumentada. Quando avaliamos a morfologia dos vasos coronarianos, vimos que o tratamento com HgCl_2 além de alterar o funcionamento vascular e promover disfunção endotelial, ainda foi capaz de reduzir a área total do vaso e a área do lúmen.

A fim de elucidar os mecanismos pelos quais ocorria a disfunção endotelial encontrada, mostramos os efeitos da exposição durante 24 horas ao HgCl_2 em células endoteliais explantadas de coronárias suínas. E observamos que nessas células expostas ao metal há maior produção de espécies reativas derivadas do oxigênio e que o aumento da produção é concentração dependente. Após exposição concomitante a alguns conhecidos antioxidantes, como tempol, apocinina e tiron, houve redução da produção de EROs, sugerindo que a principal fonte geradora desses radicais livres é a NADPHoxidase. Em células endoteliais, a maior produção de EROs também está relacionada com redução da produção de NO, como foi observado após medida de nitritos e nitratos, produtos da degradação de NO, em meio de cultivo celular. No entanto, a expressão protéica da principal sintase responsável pela produção de NO em células endoteliais, a eNOS, está aumentada

em células endoteliais expostas ao HgCl_2 . Esse dado visto em conjunto com a redução da produção de EROs produzido pela incubação com L-NAME, inibidor não seletivo das NOS, nos permite especular que além do aumento da expressão da eNOS ser compensatório à redução de NO, também está contribuindo para a produção de radicais livres por desacoplamento da eNOS.

Como encontramos que o tratamento com HgCl_2 promove disfunção endotelial, avaliamos se a alteração na produção/biodisponibilidade de NO seria capaz de alterar o funcionamento de corações isolados. Para isso, perfundimos corações de ratos expostos ou não ao metal durante 60 minutos com L-NAME. Em corações de ratos tratados a perfusão com L-NAME reduziu a PSIVE, aumentou a PDIVE e a incidência de arritmias. E o aumento observado na PPC foi muito maior em corações de ratos expostos ao HgCl_2 que em ratos Controle.

O tratamento utilizado neste estudo, que visa a exposição durante 30 dias ao HgCl_2 , alcança uma concentração igual a $7,97 \pm 0,59$ ng/ml (WIGGERS *et al.*, 2008). O valor de referência recomendado pela agência norte americana *Environmental Protection Agency* (EPA, 2007) de concentração sanguínea de mercúrio sem que haja efeitos adversos para a saúde é de 5,8 ng/mL ou ~ 21 nmol/L (*National Academy of Science*, 2000). A OMS estipula uma concentração menor que 6 $\mu\text{g/g}$ de mercúrio como aceitável em cabelo de humanos.

As principais fontes de exposição populacional ao mercúrio são o consumo de peixes que bioacumulam metil-mercúrio, a liberação de vapor de mercúrio por amálgamas dentários e o timerosal utilizado como conservante em vacinas (CLARKSON *et al.*, 2002).

Em populações que vivem na bacia Amazônica e que utilizam os peixes como principal fonte protéica da alimentação as concentrações de mercúrio no cabelo chegaram a até 150 $\mu\text{g/g}$, sendo que somente 2 dos 40 municípios estudados possuem a concentração de mercúrio média abaixo do valor recomendado pela OMS (BASTOS *et al.*, 2006). Em pacientes, a liberação diária de mercúrio por amálgama é de, aproximadamente, 4 a 5 $\mu\text{g}/\text{dia}$ e existe correlação positiva entre o número de amálgamas e a concentração sanguínea de mercúrio. Estima-se que cada amálgama dental libere de 3 a 17 μg de vapor de mercúrio por dia e a concentração sanguínea de mercúrio após a retirada da restauração pode alcançar

até 5 nmol/L (HALBACH, 1995; SANDBORGH-ENGLUND *et al.*, 1998; HALBACH *et al.*, 2008). Um estudo realizado na Universidade de Brasília mostrou que a concentração de mercúrio em infantes após a vacinação contra hepatite B é de 4,2 a 21,1 µg/Kg (DÓREA *et al.*, 2009). Mesmo sendo uma concentração abaixo da recomendação existem fortes evidências que a exposição ao etil-mercúrio, principal componente do timerosal, está associado ao aparecimento de desordens neurológicas e cardíacas em crianças (GEIGER & GEIGER, 2003). Estudo recente mostra que em lactantes residentes em Madri, Espanha, a concentração de mercúrio em leite materno oscila entre 0,36 a 0,74 µg/L (GARCÍA-ESQUINAS *et al.*, 2011).

Desta maneira, o nosso estudo contempla concentrações, que mesmo um pouco acima dos valores de referência, são facilmente encontradas em populações expostas. Sendo até consideradas baixas quando comparamos com concentrações sanguíneas de humanos que vivem em áreas potencialmente contaminadas ou com tradição cultural de alto consumo de peixes.

A seguir discutiremos, separadamente, os resultados encontrados em artérias coronárias, células endoteliais explantadas de coronárias suínas e em corações isolados.

5.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DURANTE 30 DIAS A BAIXA CONCENTRAÇÃO DE HgCl₂ EM ARTÉRIAS CORONÁRIAS

Sabemos que as artérias coronárias constituem um importante leito vascular, pois têm como função nutrir o coração em situação basal e também em situações onde há aumento da demanda metabólica. Qualquer aumento do trabalho cardíaco irá ocasionar aumento do fluxo coronariano para que haja manutenção de um adequado suprimento de O₂ (DEUSSEN *et al.*, 2006).

O endotélio vascular é o principal responsável por modular o fluxo coronariano, através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras. No entanto, em algumas doenças ou na presença de fatores de risco como a hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca ocorre uma alteração na capacidade do endotélio vascular em controlar adequadamente a resistência vascular e, assim, o fluxo coronariano. Essa situação é conhecida como disfunção endotelial (CAI & HARRISON, 2010).

Recentemente, estudos mostram que além dos fatores de risco citados acima a exposição a metais pesados também é um importante deflagrador de doenças cardiovasculares (EVANS & WEINGARTEN, 1990; SALONEN *et al.*, 1995; SALONEN *et al.*, 2000; VIRTANEN *et al.*, 2005; HOUSTON, 2007). Dentre os efeitos vasculares da exposição ao mercúrio podemos citar estresse oxidativo, inflamação, trombose, disfunção do músculo liso vascular, dislipidemias, disfunção imune e mitocondrial (HOUSTON, 2007). A exposição crônica aumenta a resistência vascular e induz o desenvolvimento de hipertensão arterial (TORRES *et al.*, 2000). Em células endoteliais o metil-mercúrio apresenta citotoxicidade dependente da concentração e redução da atividade da NOS (KISHIMOTO^a *et al.*, 1995).

No Brasil, Fillion e colaboradores, em 2006 mostraram que existe correlação positiva entre as concentrações de mercúrio no cabelo e pressão arterial em populações ribeirinhas da Amazônia. Na Espanha, mineiros expostos cronicamente ao mercúrio inorgânico possuem risco aumentado para mortalidade por doenças cardiocirculatórias, como hipertensão arterial e doenças cerebrovasculares (GARCÍA GÓMEZ *et al.*, 2007).

WIGGERS^b e colaboradores desenvolveram em 2008 o modelo experimental utilizado neste estudo. Esses autores avaliaram a reatividade vascular de artérias de

condutância e resistência. Os achados indicam que durante um período de somente 30 dias a exposição a baixa concentração foi capaz de alterar a reatividade vascular e função endotelial em aorta e artérias mesentéricas de resistência. Essa disfunção endotelial observada se deve a redução da biodisponibilidade de NO por aumento do estresse oxidativo (WIGGERS *et al.*, 2008, PEÇANHA *et al.*, 2010). No entanto, ainda não existem estudos que mostram como a exposição ao mercúrio afeta a função de artérias coronárias.

Utilizando o mesmo modelo de exposição de alguns autores (WIGGERS *et al.*, 2008, PEÇANHA *et al.*, 2010) observamos que em artérias coronárias há um aumento da reatividade a serotonina (5-HT). Esse aumento de reatividade já foi observado anteriormente em outros leitos vasculares. Em artérias de peixes foi observada aumento da vasoconstricção após exposição ao mercúrio (EVANS & WEINGARTEN, 1990) e a perfusão com concentrações crescentes de (0,5 a 10 $\mu\text{mol/L}$) de HgCl_2 aumenta pressão de perfusão de artérias caudais perfundidas em fluxo constante (DA CUNHA *et al.*, 2000). No entanto, em anéis de aorta e de artéria pulmonar pré contraídas com noradrenalina, doses de mercúrio promoveram importante vasodilatação (GOLPON *et al.*, 2003).

O aumento da contração a 5-HT em artérias coronárias poderia ser ocasionado por diferença na capacidade contrátil do músculo liso vascular. No entanto, as artérias de ratos dos grupos Controle e HgCl_2 não apresentaram respostas contráteis diferentes quando expostas a 120 mmol/L de KCl e também o relaxamento ao doador de NO, DEA-NONOate foi igual entre os grupos, o que indica que a resposta ao NO mantém-se preservada no músculo liso vascular. Desta forma, o que explicaria a diferença de reatividade nestas artérias é uma mudança na modulação do endotélio vascular, por diminuição da produção de fatores vasorelaxantes ou aumento de fatores contráteis.

Ainda observamos que a vasodilatação estimulada por concentrações crescentes de acetilcolina está diferente em artérias coronárias de ratos expostos ao HgCl_2 . As artérias desse grupo experimental apresentam redução do relaxamento vascular. A alteração deste relaxamento poderia ser decorrente de alteração da resposta do músculo liso vascular ao NO e não necessariamente alteração da produção/biodisponibilidade de NO. No entanto, a resposta ao doador extrínseco de

NO (DEA-NONOate) foi semelhante entre os grupos estudados. O mesmo foi encontrado em outro estudo que mostra que em segmentos de aorta expostas agudamente ao HgCl₂ não há diferença na resposta dilatadora induzida pelo trinitrato de glicerina (GOLPON *et al.*, 2003)

O principal produto derivado do endotélio é o NO que se difunde para as células musculares lisas promovendo relaxamento por aumento dos níveis intracelulares de GMPc (MARÍN & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1995; LINCOLN *et al.*, 2001). Quando avaliamos a participação deste importante dilatador sobre a resposta contrátil de artérias coronárias expostas a concentrações crescentes de 5-HT vimos que a incubação durante 30 minutos com L-NAME aumenta a vasoconstricção induzida pela serotonina em ambos os grupos estudados. No entanto, o efeito da inibição da sintase do NO é muito mais pronunciado em artérias do grupo controle, sugerindo que o tratamento com HgCl₂ durante 30 dias diminui a produção ou biodisponibilidade do óxido nítrico.

Ainda avaliamos se a incubação com L-NAME afeta também a dilatação promovida pela acetilcolina. Em artérias de ratos Controle a inibição da síntese de NO foi capaz de abolir todo o efeito relaxante induzido pela acetilcolina. Mas em artérias mercúrio ainda há um relaxamento residual, que provavelmente se deve a uma produção compensatória de outros fatores vasodilatadores. Para confirmar se a produção/biodisponibilidade de NO estava realmente diminuída em coronárias medimos a liberação local deste gás e, em artérias coronárias septais, vimos redução considerável da produção de NO tanto em situação basal quanto após estimulação com 5-HT e acetilcolina.

Os nossos achados em artérias coronárias são semelhantes aos encontrados por WIGGERS e colaboradores em 2008, que observaram aumento da reatividade a fenilefrina em aorta e artérias mesentéricas de resistência (WIGGERS^b *et al.*, 2008). Em anéis de aorta a exposição aguda a 1 µmol/L provocou lesão da monocamada endotelial e aboliu totalmente o relaxamento induzido pela acetilcolina (GOLPON *et al.*, 2003^a). Outros estudos também mostram que a exposição ao mercúrio causa diminuição da produção de NO. Em cérebro de ratos, a exposição ao mercúrio causa inibição da atividade da NOS (MITTAL *et al.*, 1995) e supressão da produção de nitritos e da expressão gênica da iNOS em células β pancreáticas (ECKHARD *et*

al., 1999). Ratos que consumiram grãos contaminados com mercúrio apresentaram diminuição da concentração sérica de NO, porém sem modificação na atividade sérica da NOS (JIE *et al.*, 2007).

No entanto, mesmo observando uma diminuição na produção local de NO e na participação desse importante vasodilatador na função de artérias coronárias, as concentrações plasmáticas de nitritos e nitratos foi igual em ratos expostos ao metal ou somente a salina. DE MARCO e colaboradores em 2009 investigaram se existia correlação entre a concentração de nitritos plasmáticos e de mercúrio no sangue total, plasma e cabelo em 238 pessoas que estavam expostas ao metil-mercúrio por consumo de peixes contaminados. Os resultados mostram uma significativa associação entre os nitritos plasmáticos e a concentração plasmática de mercúrio. Mostrando uma evidência clínica que a exposição ao metil-mercúrio contido em peixes está relacionado à diminuição endotelial de óxido nítrico (DE MARCO *et al.*, 2010). Os resultados encontrados no nosso estudo podem decorrer da baixa concentração de HgCl₂ utilizada, assim como o breve período de exposição.

A disfunção endotelial é caracterizada por diminuição da capacidade do endotélio em modular a reatividade vascular. O aumento da geração de radicais livres, principalmente aqueles derivados do oxigênio, leva a redução da biodisponibilidade de NO e é a principal causa de disfunção endotelial (CAI & HARRISON, 2010). Existem inúmeras evidências que colocam o estresse oxidativo como importante participante de desordens como hipercolesterolemia, hipertensão, arteriosclerose, diabetes e insuficiência cardíaca (LOCKETTE *et al.*, 1986; GIMBRONE, 1995; MARÍN & RODRÍGUES-MARTÍNEZ, 1995; SCHACHINGER *et al.*, 2000; BRIONES, 2005).

Como encontramos redução da produção/biodisponibilidade de NO em artérias coronárias expostas durante 30 dias ao HgCl₂, realizamos experimentos para elucidar se a maior produção de radicais livres derivados do oxigênio estariam participando das alterações vasculares encontradas. Após incubação das artérias coronárias esquerdas com tiron, um varredor não enzimático do ânion superóxido, observamos uma importante inibição da contração induzida pela 5-HT e aumento do efeito relaxante estimulado pela acetilcolina. Da mesma maneira, a utilização da SOD, enzima responsável por transformar o ânion superóxido em H₂O₂ e oxigênio

molecular, também reduziu a resposta contrátil a 5-HT. Também utilizamos a apocinina, que inicialmente tinha seus efeitos atribuídos a sua capacidade de inibir a NADPHoxidase e hoje sabemos que, na realidade, a apocinina possui efeitos também independentes da inativação da NADPHoxidase (HEUMÜLLER *et al.*, 2008; RIGANTI *et al.*, 2008). A apocinina também potencializou o relaxamento a acetilcolina em artérias coronárias de ratos expostos ao HgCl₂. A utilização do tiron, da SOD e da apocinina não alteraram a reatividade de artérias de ratos que foram expostos somente a salina.

A diminuição da resposta contrátil a serotonina após incubação com tiron e SOD em conjunto com o aumento do relaxamento após 30 minutos de incubação com tiron e apocinina, indicam que há aumento da produção de O₂^{•-}, o que leva à redução da biodisponibilidade de NO, por formação de peroxinitrito (PARAVICINI & TOUYZ, 2008). Para nos certificar que os resultados encontrados se deviam ao aumento da produção de O₂^{•-}, medimos, em artérias coronárias septais, a produção local de O₂^{•-} utilizando a lucigenina. Nessas artérias de ratos expostos ao HgCl₂ a produção de O₂^{•-} está quatro vezes maior quando comparada com as artérias de ratos do grupo Controle.

Diversos estudos mostram que a exposição ao mercúrio leva ao estresse oxidativo e aumento da geração de radicais livres (LIVARDJANI *et al.*, 1991; MAHBOOB *et al.*, 2001; HOUSTON, 2007; WOLF & BAYNES, 2007; MAZERIK *et al.*, 2007; JIE *et al.*, 2007; AUGUSTI *et al.*, 2008; WIGGERS^a *et al.*, 2008; WIGGERS^b *et al.*, 2008). Em ratos que consumiam arroz contendo mercúrio foi observado diminuição da atividade antioxidante da SOD e da glutathione peroxidase, redução da concentração plasmática de NO, assim como aumento da concentração de malondialdeído plasmática, o que sugere aumento do estresse oxidativo (JIE *et al.*, 2007). O aumento do estresse oxidativo em fígado também foi observado em ratos que receberam 3 doses de 0,1 mg/kg durante 3 dias consecutivos por via oral (REUS *et al.*, 2003). O co-tratamento com carotenóides, como potente propriedade antioxidante, foi capaz de prevenir, em rins de ratos, a peroxidação lipídica, oxidação protéica, mudanças na atividade da SOD, catalase e glutathione peroxidase após exposição com HgCl₂ (AUGUSTI *et al.*, 2008). A exposição a baixa concentração de mercúrio inorgânico levou ao aumento da produção de ânion superóxido, da

concentração plasmática de malondialdeído e do estado total antioxidante (WIGGERS^b *et al.*, 2008).

Está bem descrito que a principal fonte geradora de radicais livres em vasos é a NADPHoxidase (SHATWELL & SEGAL, 1996; BABIOR, 1999; BABIOR, 2004). Existem 7 isoformas da subunidade GP91 PHOX, que são expressas em diferentes tipos celulares. Em células endoteliais e em células do músculo liso vascular a isoforma mais abundante é a NOX-4. No entanto, tanto a NOX-1 quanto NOX-2 estão expressas em células do músculo liso vascular, mas a NOX-1 está mais presente em vasos de condutância e a NOX-2 em vasos de resistência (BEDARD & KRAUSE, 2007; CHAN *et al.*, 2009).

Por isso, medimos a expressão do RNAm das isoformas NOX-1 e NOX-4 da NADPHoxidase. Já que a NOX-4 é importante na manutenção da produção basal de $O_2^{\cdot-}$ (ELMARK *et al.*, 2005; BRANDES & SHRÖDER, 2008) e a NOX-1 mostra-se importante na produção de $O_2^{\cdot-}$ em condições patológicas como aterosclerose, diabetes e hipertensão arterial (CHOSE *et al.*, 2008).

A expressão da NOX-1 e NOX-4 está cerca de três vezes maior em artérias coronárias de ratos do grupo $HgCl_2$, sugerindo que a principal fonte geradora de $O_2^{\cdot-}$ em artérias coronárias de ratos expostos durante 30 dias a baixa concentração de $HgCl_2$ é a NADPHoxidase. No entanto, em trabalho prévio de nosso laboratório não foi encontrado alteração dos níveis de RNAm de NOX-1 em artérias mesentéricas de resistência de ratos expostos ao mesmo modelo de exposição (WIGGERS^b *et al.*, 2008).

A superóxido dismutase é uma importante enzima responsável por detoxificar os sistemas biológicos de $O_2^{\cdot-}$ e representa a maior defesa celular contra a formação de $O_2^{\cdot-}$ e peroxinitrito (STRÄLIN *et al.*, 1995). Portanto, como observamos modificação do perfil oxidativo em artérias coronárias após exposição ao mercúrio, também poderíamos encontrar alteração nos mecanismos antioxidantes locais, como a expressão da SOD. E realmente encontramos aumento da expressão gênica da isoforma SOD-2, enquanto não houve modificação dos níveis de RNAm da SOD-1. Em ratos expostos a vapor de mercúrio já foi demonstrado aumento da atividade da SOD em sangue e nos pulmões após 1 e 2 horas de exposição (LIVARDJANI *et al.*, 1991) e da expressão da SOD-3 em ratos expostos a baixa concentração de $HgCl_2$

durante 30 dias (WIGGERS^b *et al.*, 2008). Em camundongos expostos durante duas semanas a 0,8 e 8 g de HgCl₂/kg/dia houve aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica, glutatona redutase, glutatona peroxidase em diferentes órgãos e da SOD no cérebro, fígado, testículos e epidídimo (MAHBOOB *et al.*, 2001).

Em conjunto, o aumento da produção de radicais livres derivados do oxigênio, redução da produção/ biodisponibilidade de NO, aumento da expressão gênica das subunidades NOX-1 e NOX-4 da NADPHoxidase e da SOD-2 nos permite concluir que a exposição ao HgCl₂, mesmo durante curto período e em baixa concentração, foi capaz de induzir ao estresse oxidativo local em artérias coronárias, reduzindo sua capacidade de relaxamento e aumentando sua contração. E ainda que a principal fonte geradora desses radicais livres é a NADPHoxidase e que o aumento dos níveis de RNAm da SOD-2 em artérias coronárias se mostra como uma tentativa, compensatória, antioxidante local.

No entanto, além do NO, o principal vasodilatador derivado do endotélio, ainda temos os canais para potássio, que através da sua ativação por fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) levam ao relaxamento vascular (MATOBA *et al.*, 2000). A ativação dos canais de K⁺ no músculo liso vascular leva a hiperpolarização, diminui a atividade dos canais de Ca²⁺ tipo L voltagem dependentes, reduzem o cálcio intracelular [Ca²⁺]_i e promove vasodilatação (NELSON & QUAYLE, 1995). Por isso, avaliamos se a exposição durante 30 dias a baixa concentração de HgCl₂ modifica a participação dos EDHF na contração induzida pela serotonina e no relaxamento à acetilcolina. Para isso utilizamos o TEA, um bloqueador dos canais para potássio ativados por cálcio.

O TEA, bloqueador de canais para potássio dependente de cálcio (K_{Ca}) potencializou a resposta contrátil em artérias coronárias do grupo controle, no entanto, não modificou a resposta a serotonina em artérias do grupo mercúrio. Da mesma forma, o relaxamento foi reduzido pelo TEA em artérias do grupo controle, enquanto o relaxamento em artérias do grupo mercúrio permaneceu inalterado. O que sugere menor participação desses canais após tratamento com HgCl₂. A menor participação dos K_{Ca} faz com que ocorra menor hiperpolarização após estímulo, aumentando a reatividade e promovendo déficit de relaxamento. Ou seja, o tratamento com HgCl₂ diminuiu a participação de um fator que leva a ativação de K_{Ca}.

O NO também é considerado um EDHF, pois estimula a guanilato ciclase solúvel e pode ativar canais para potássio sensíveis ao ATP, de larga condutância ou voltagem dependentes (WALDRON & COLE, 1999). Por isso, os dados de diminuição da participação dos EDHF corrobora com os nossos resultados que mostram diminuição da produção/biodisponibilidade de NO em artérias coronárias. WIGGERS (2009) também mostra redução da participação dos canais para potássio em artérias mesentéricas de resistência de ratos expostos ao HgCl₂.

Nosso grupo também têm mostrado que a exposição ao HgCl₂ aumenta a liberação de prostanóides vasoconstrictores em aorta, o que também contribuiria para aumento da contração e déficit de relaxamento (PEÇANHA *et al.*, 2010). Do mesmo modo, em artérias coronárias, encontramos que a incubação com indometacina, inibidor da COX, reduz a contração a 5-HT e potencializa o relaxamento induzido pela ACh. A perfusão da artéria caudal de ratos com HgCl₂ aumentou a reatividade a fenilefrina, mas o uso de indometacina inibiu essa resposta, sugerindo, também, participação de prostanóides vasoconstrictores no aumento da resposta contrátil nesse leito vascular (DA CUNHA *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* mostram que a exposição ao mercúrio inorgânico leva a um aumento da síntese de PGE₂ em células glomerulares (SRAER *et al.*, 1982). Em adição, a exposição ao mercúrio estimula a liberação de metabólitos da via do ácido araquidônico de plaquetas humanas (HORNBERGER & PATSCHEKE, 1989), estimula a biosíntese de TXA₂ e PGI₂ no coração, PGI₂ em aortas e liberação de serotonina por plaquetas (ALLY *et al.*, 1993).

Além de todos os dados descritos e discutidos anteriormente, que nos mostram aumento da reatividade a serotonina e diminuição do relaxamento a acetilcolina, como consequência do aumento do estresse oxidativo e da liberação de prostanóides vasoconstrictores, também avaliamos se o tratamento com HgCl₂ modifica a morfologia de vasos coronarianos. Observamos que após 30 dias de exposição ao metal os vasos coronarianos intramiocárdicos apresentaram menor área total do vaso, menor área do lúmen, porém sem modificar a espessura da camada média. Sabe-se que a resistência vascular é inversamente proporcional ao raio do vaso elevado à quarta potência (MULVANY & AALKJAER, 1990), desta forma, qualquer pequena alteração do diâmetro do vaso, pode levar a importante modificação da resistência vascular. Condições como hipertensão arterial, por

exemplo, evoluem com mudanças estruturais em vasos de resistência, como diminuição do diâmetro vascular (SCHIFFRIN *et al.*, 1992; MULVANY, 2002; SCHIFFRIN & TOUYZ, 2004; MULVANY, 2008). E, além disso, a geração de EROs tem sido mostrada como peça chave no remodelamento vascular e cardíaco (XU & TOUYZ, 2006; WEI *et al.*, 2007; PARAVICINI & TOUYZ, 2008). Já que houve aumento da produção de $O_2^{\cdot -}$ depois da exposição ao $HgCl_2$ avaliamos também a morfologia de vasos coronarianos. Os dados morfológicos encontrados sugerem remodelamento eutrófico, que faz com que as artérias aumentem a resistência ao fluxo mesmo sem ativação (MULVANY, 2002).

No presente estudos não avaliamos as propriedades passivas e ativas de vasos de resistência, mas WIGGERS (2009) mostrou, utilizando a técnica de artérias pressurizadas, que o tratamento com mercúrio produziu uma redução da espessura da parede e na relação média: lúmen dos vasos, assim como, um aumento do diâmetro interno, que poderia ser consequência da diminuição da espessura da parede vascular.

5.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HgCl₂ EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPLANTADAS DE CORONÁRIAS SUÍNAS

Para avaliar de que maneira o HgCl₂ modificou a função endotelial, utilizamos células endoteliais explantadas de coronárias suínas cultivadas e expostas durante 24 horas a concentrações crescentes de mercúrio. Medimos nessas células a geração de radicais livres utilizando o diidroetídio (DHE) na presença de HgCl₂ e também após incubação concomitante com alguns antioxidantes e o inibidor da NOS; os subprodutos de degradação do NO em meio de cultivo celular; e a expressão da eNOS.

Antes da realização de todos os protocolos experimentais em células endoteliais de coronárias suínas fez-se necessário que as células fossem caracterizadas em todos os passes utilizados (passe 1, 2, 3 e 4) para verificar a manutenção do seu fenótipo. Tanto células endoteliais quanto células musculares lisas (CMLV), também explantadas das coronárias suínas foram expostas a anticorpo específico para o fator de Von-Willebrand, que está expresso somente em células endoteliais e não em células musculares, e posteriormente incubados com anticorpo secundário adequado com capacidade de emitir fluorescência (FITC). As células endoteliais também foram incubadas somente com o anticorpo secundário para excluir a possibilidade do sinal fluorescente encontrado ser decorrente de fundo produzido pelo anticorpo secundário. As células endoteliais, em todos os passes avaliados, incubadas com o anticorpo primário para fator de Von-Willebrand e anticorpo secundário FITC emitiram forte sinal fluorescente, enquanto as CMLV praticamente não emitiram fluorescência. O que indica que as células endoteliais utilizadas nesse estudo mantêm, de fato, suas características fenotípicas.

Após exposição por 24 horas ao HgCl₂ vimos que ocorre aumento da geração de EROs e que esse aumento é dependente da concentração. O uso do tiron, apocinina, tempol e L-NAME reduziram a emissão de fluorescência, sugerindo redução da geração de EROs. Assim, podemos concluir que a exposição ao mercúrio induz ao estresse oxidativo, que é reduzido pelo uso de antioxidantes e também pela inibição das NOS, que desacoplada, também pode contribuir para geração de radicais livres (FÖRSTERMANN & MÜNDEL, 2006).

Como em artérias coronárias observamos disfunção endotelial, caracterizada principalmente pela redução da biodisponibilidade de NO, medimos também, em células endoteliais, se a exposição ao HgCl₂ e a antioxidantes modificam a produção/biodisponibilidade de NO. Indiretamente, a produção de NO foi avaliada por medida de nitritos e nitratos, seus subprodutos. Após incubação com HgCl₂ observamos redução da quantidade de nitritos e nitratos em meio de cultivo em todas as concentrações de HgCl₂ estudadas (0,05; 0,5 e 5 µg/mL), não havendo diferenças entre as concentrações. Ou seja, diferente do que ocorre com as EROs, a diminuição da produção/biodisponibilidade de NO não é dependente da concentração.

O uso concomitante do tiron, tempol, apocinina e L-NAME foram capazes de restabelecer a produção de nitritos e nitratos a níveis semelhantes aos encontrados em células não expostas ao HgCl₂. Fortificando ainda mais a evidência que a diminuição do NO é ocasionada por aumento da geração de espécies reativas, principalmente o O₂⁻, que reage muito rapidamente com o NO, formando o peroxinitrito (FRISBEE *et al.*, 2002).

A principal fonte geradora de NO em células endoteliais é a eNOS (isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico). Por isso, medimos nessas células a expressão protéica dessa proteína. Mesmo com redução da quantidade de subprodutos de degradação do NO observada em células endoteliais expostas ao HgCl₂ a expressão protéica da eNOS está aumentada na maior concentração estudada (5 µg/mL). Esse aumento pode ser compensatório a redução do NO e também pode estar contribuindo para a geração de EROs, já que a incubação com L-NAME reduziu a produção de EROs nessas células e aumentou a quantidade de nitritos. A eNOS desacoplada é uma importante fonte de EROs em várias situações patológicas (FÖRSTERMANN & MÜNZEL, 2006).

Em células endoteliais de cordão umbilical expostas ao metil-mercúrio foi observado, também, diminuição da produção de NO e que esse efeito é dependente de efeito citotóxico direto do metil-mercúrio sobre a atividade da NOS (KISHIMOTO^a *et al.*, 1995). Em células endoteliais de artéria pulmonar bovina os efeitos do metil-mercúrio foram atribuídos a PLA₂, que tinha sua produção ativada por aumento de cálcio e EROs. O metil-mercúrio também ativa peroxidação lipídica e alterações na

morfologia das células (MAZERIK *et al.*, 2007). A exposição de monocamadas de células endoteliais ao mercúrio iônico em altas concentrações produz profunda citotoxicidade, lesão da monocamada de células, quase completa inibição da atividade de enzimas antioxidantes, redução da atividade da NOS e acúmulo de EROs. Enquanto que em baixas concentrações houve aumento compensatório de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (WOLF & BAYNES, 2007).

A expressão da sintase do óxido nítrico também é modulada pela exposição ao mercúrio. Estudos prévios de nosso grupo mostram aumento da expressão protéica da eNOS em aorta e artérias mesentéricas de resistência. (WIGGERS^b *et al.*, 2008). Em células β pancreáticas a exposição ao HgCl_2 (0,1 a 10 $\mu\text{mol/L}$) suprime a produção de nitrito e a expressão gênica da iNOS, assim como a taxa de transcrição do gene (ECKHARDT *et al.*, 1999). Após 20 horas de exposição a dose única de HgCl_2 (7,5 mg/kg) ratos apresentaram insuficiência renal, com diminuição da expressão da NOS cerebral no córtex renal (YANAGISAWA *et al.*, 2002).

5.3 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA FUNÇÃO DE CORAÇÕES ISOLADOS EXPOSTOS AO HgCl₂.

Estudo prévio em nosso laboratório mostra que a exposição durante 30 dias a baixa concentração de HgCl₂, como a utilizada neste estudo, foi capaz de promover prejuízo do relaxamento do ventrículo esquerdo de ratos anestesiados, efeito inotrópico negativo em corações isolados, aumento da atividade ATPásica da miosina e inibição da NKA. No entanto, não alterou a contratilidade de músculos papilares isolados (FURIERI^b *et al.*, 2011).

Vários outros estudos mostram uma associação entre exposição ao mercúrio, hipertensão arterial, infarto do miocárdio e doença arterial coronariana (SALONEN *et al.*, 2000; VIRTANEN *et al.*, 2005; FILLION *et al.*, 2006; HOUSTON, 2007).

A exposição crônica, durante 320 dias, a 5 µg/mL de HgCl₂ afeta a função cardiovascular por interferir no mecanismo barorreflexo e na reatividade a catecolaminas (CARMIGNANI *et al.*, 1983). A exposição durante período mais curto a concentrações maiores mostram aumento da pressão arterial sistêmica, diminuição do inotropismo cardíaco, porém sem alteração da frequência cardíaca (CARMIGNANI *et al.*, 1992). Mesmo com a alta afinidade do mercúrio com o SNC, CARMIGNANI e colaboradores (1992) mostraram que após exposição durante 180 dias o mercúrio se acumulou mais no coração que no cérebro.

Como havíamos encontrado disfunção endotelial nos experimentos em artérias isoladas, caracterizada por redução da biodisponibilidade de NO por aumento da geração de radicais livres pela NADPHoxidase, também avaliamos, em corações isolados se o tratamento com HgCl₂ era capaz de modificar a participação no NO na modulação parácrina da função cardíaca.

Assim como as substâncias liberadas pelo endotélio vascular possuem a capacidade de modular a contratilidade do músculo liso vascular subjacente, o NO produzido pelas células endoteliais das coronárias também se difunde para o músculo cardíaco, modulando seu funcionamento (BRUTSAERT *et al.*, 1998). O NO, um gás difusível, com meia vida curta, proveniente de células endoteliais, é capaz de modular os aspectos fisiológicos do funcionamento cardíaco, como o acoplamento excitação/contração, relaxamento miocárdico, função diastólica, mecanismo de

Frank-Starling, frequência cardíaca, resposta inotrópica β -adrenérgica e também o metabolismo energético (SHAH & MACCARTHY, 2000).

No entanto, os efeitos desse potente vasodilatador são vários e contraditórios. As diferenças de efeito são decorrentes do estado oxidante e antioxidante, do fluxo coronariano, da concentração, da fonte de NO, das vias de sinalização, dentre outros fatores (SHAH & MACCARTHY, 2000).

Além disso, ao analisar os dados de FURIERI e colaboradores (2011) podemos notar que o efeito do tratamento crônico com HgCl_2 encontrado em corações isolados não está presente quando foram avaliados músculos papilares isolados. Uma importante diferença entre as duas preparações estudadas é a presença, em corações isolados, da circulação coronariana, que pode estar modulando a função cardíaca.

A presença de disfunção endotelial em artérias coronárias e os achados anteriores de nosso laboratório nos estimularam a investigar se a participação do NO também estaria diferentes em corações isolados após exposição durante 30 dias ao HgCl_2 . Para isso, perfundimos corações de ratos expostos ou não a baixa concentração de HgCl_2 com solução contendo L-NAME, um inibidor não seletivo da sintase do NO (NOS), durante 60 minutos.

Semelhante ao encontrado anteriormente, observamos que o tratamento com HgCl_2 promove efeito inotrópico negativo em corações isolados em condição basal após estabilização (FURIERI^b *et al.*, 2011). Ainda, observamos que a perfusão com L-NAME em corações de ratos tratados reduziu ainda mais a pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) já nos primeiros 15 minutos de perfusão. Esse mesmo efeito não foi visto em corações de ratos Controle.

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, estudos realizados em nosso laboratório mostraram diminuição da PSIVE imediatamente após exposição a 0,5; 1; 2; 10 μM e após 30 minutos de exposição a 20 nM (MASSARONI *et al.*, 1995; ASSIS *et al.* 2003). E FURIERI^b e colaboradores (2011) especulam que o efeito inotrópico encontrado pode ser decorrente da inibição da NKA, vista em corações de ratos expostos ao mercúrio, levando a sobrecarga de cálcio.

Como o NO também controla a função diastólica de corações e estudos mostram déficit de relaxamento do VE em ratos anestesiados (FURIERI^b *et al.*, 2011), também

avaliamos se a pressão diastólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PDIVE) era alterada por inibição da síntese de NO. Em corações de ratos Controle a PDIVE manteve-se inalterada na pressão pré-fixada pelo enchimento do balão de látex no interior da cavidade ventricular (5 mmHg). No entanto, em corações de ratos expostos ao metal a PDIVE sofreu um aumento muito grande, chegando, em alguns casos a até 50 mmHg. Ao realizar os experimentos, pudemos observar claramente a contratatura do músculo cardíaco durante os 60 minutos de perfusão com L-NAME.

Corroborando com a alteração na PDIVE encontrada em estudo prévio (FURIERI^b *et al.*, 2011) e o aumento da PDIVE observado após perfusão com L-NAME em corações isolados, trabalhos na literatura mostraram aumento da PDIVE após administração endovenosa de 5 mg/kg de HgCl₂ em ratos. Essa única dose *in bolus* origina uma concentração sanguínea aguda cerca de 1000 vezes maior que a encontrada em nosso modelo experimental (ROSSONI *et al.*, 1999).

Como a PDIVE sofreu um aumento em corações de ratos expostos ao HgCl₂ após incubação com L-NAME, tornou-se necessário avaliar a gênese de força pelo VE que não somente através da PSIVE, já que o aumento da PDIVE poderia mascarar um efeito real no total de força realizado pelo ventrículo esquerdo. Por isso, posteriormente, analisamos a força desenvolvida pelo VE, que foi obtida pela diferença entre PSIVE e PDIVE. Desta maneira, encontramos que o efeito da perfusão com L-NAME foi ainda maior sobre a capacidade do miocárdio em gerar pressão.

Em preparações de corações isolados a nutrição do músculo cardíaco é realizada através da perfusão a um fluxo de solução constante (10 mL/min), ou seja, qualquer alteração na pressão de perfusão coronariana (PPC) será decorrente de mudanças na resistência vascular. Em situação estabilizada, ou seja, antes de iniciarmos a perfusão com L-NAME, não observamos diferenças entre os grupos estudados. Após a perfusão com o L-NAME vimos aumento da pressão de perfusão coronariana nos corações de ratos expostos ao HgCl₂. Ou seja, as artérias de ratos do grupo HgCl₂ contraíam mais após perfusão com L-NAME.

Ao comparar os dados de PPC com os resultados de reatividade coronariana, nos parece um pouco contraditório, já que em artérias isoladas e estudadas em miógrafos de tensão mostramos que o tratamento com HgCl₂ diminuía a participação

do NO na reatividade coronariana. Porém, se avaliarmos as curvas concentração resposta a 5-HT em artérias coronárias de ambos os grupos na presença ou não de L-NAME, notamos que a resposta máxima em artérias incubadas com L-NAME não foi diferente entre os grupos estudados (Ct+ L-NAME: $117 \pm 6,6$ mmHg e HgCl₂ +L-NAME: $108 \pm 4,3$ mmHg).

Além disso, não podemos comparar em igualdade as duas preparações, já que *in situ* as artérias coronárias também sofrem influência direta de outros fatores miocárdicos, como, por exemplo, a regulação metabólica pelo tecido cardíaco. As alterações na gênese de força cardíaca também podem influenciar na circulação coronariana por alterar a quantidade e qualidade dos subprodutos do metabolismo (DEUSSEN *et al.*, 2006). As artérias usadas nas preparações para avaliar a reatividade coronariana possuem entre 200 e 400 μ m de diâmetro enquanto que em corações isolados a perfusão é feita através de toda a árvore vascular, com grande participação de artérias de resistência.

Anatomicamente, as artérias coronárias estão, em sua grande maioria, rodeadas por todos os lados de tecido miocárdio. Assim, o grande aumento da PDIVE também nos ajudaria a explicar o aumento da PPC maior em artérias do grupo HgCl₂. A diminuição do relaxamento durante a diástole nos corações do grupo tratado após perfusão com L-NAME também contribui para o aumento da resistência vascular, por compressão dos vasos intramiocárdicos.

Ainda, observamos, no entanto não quantificamos, que a perfusão com L-NAME também aumentou a incidência de alterações do ritmo cardíaco desses corações isolados. Na preparação de corações isolados o átrio direito é retirado e o coração é estimulado eletricamente a uma frequência pré-fixada através de dois eletrodos colocados em sua superfície. Mesmo a frequência sendo estabelecida pelo experimentador observamos uma alteração no ritmo muito grande em corações isolados, como demonstramos na figura 38 na seção de resultados. Os corações de ratos Controle mantiveram a frequência estável mesmo após perfusão com L-NAME.

Ao sumarizar os resultados encontrados em corações isolados perfundidos com L-NAME podemos pontuar que houve: 1) redução as PSIVE em situação basal e a perfusão com L-NAME reduziu ainda mais a PSIVE e a pressão desenvolvida pelo VE em corações de ratos tratados; 2) aumento da PDIVE em corações do grupo

HgCl₂ após inibição da NOS; 3) aumento da PPC após inibição da síntese de NO pelas coronárias em ambos os grupos estudados, mas que esse aumento foi maior em corações de ratos HgCl₂; 4) aumento da incidência de alterações do ritmo cardíaco em corações de ratos expostos ao metal.

Desta maneira, podemos especular que mesmo com a redução da produção de NO em artérias coronárias isoladas, observamos que a reduzida quantidade de NO em artérias *in situ* se torna importante para a preservação do fluxo coronariano e manutenção da perfusão miocárdica em corações de ratos expostos ao HgCl₂. Além disso, quando inibimos a síntese desse importante vasodilatador ainda observamos sinais claros de uma sobrecarga de cálcio, como havia sido proposto por trabalhos prévios de nosso laboratório (FURIERI^b *et al.*, 2011).

O NO ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) aumentando os níveis intracelulares de GMPc, que ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG fosforila vários sítios protéicos, sendo responsável por diminuir a corrente de cálcio pelos canais para cálcio do tipo L, diminuir a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, aumentar a recaptação de cálcio pelo RS e por diminuir o consumo de O₂ (SHAH & MACCARTHY, 2000). Por todos os efeitos do NO nos cardiomiócitos vemos que o NO é capaz de reduzir a sobrecarga de cálcio que já foi proposta pelo nosso grupo (FURIERI^b *et al.*, 2011). E a inibição do NO torna os efeitos da sobrecarga de cálcio evidentes.

Para avaliar como estava o ciclo de cálcio nos cardiomiócitos de ratos expostos ao metal, já que nossos resultados sugerem sobrecarga de cálcio, medimos a expressão protéica de várias proteínas envolvidas no ciclo de cálcio intracelular: as isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), o trocador Na⁺/Ca²⁺ (NCX), a bomba de cálcio do RS (SERCA), o fosfolambam (PLB) e o PLB fosforilado na serina 16. Ainda medimos a expressão protéica de eNOS e iNOS em macerado de tecido miocárdico.

O tratamento durante 30 dias com baixa concentração de HgCl₂ reduz a expressão protéica da isoforma $\alpha 1$ da NKA, sem alterar a expressão de sua isoforma $\alpha 2$. Também há redução da expressão do NCX. A SERCA e o PLB fosforilado também estão reduzidos, enquanto que a expressão do PLB está aumentada. Desta maneira, a razão SERCA/PLB está diminuída.

Estudos prévios mostram que o mesmo modelo experimental utilizado em nosso estudo promove redução da atividade da NKA (FURIERI^b *et al.*, 2011), o que provoca aumento intracelular de sódio, reduzindo a atividade do NCX, produzindo uma condição de sobrecarga de cálcio. Situação similar ocorre quando a NKA é inibida por 1 μ M de ouabaína, levando à disfunção mecânica do miocárdio e a alterações mitocondriais em corações isolados de cobaias (KHATTER *et al.*, 1989). A ouabaína produziu um aumento transiente na força contrátil e posteriormente levou a um declínio na função mecânica do VE. Mitocôndrias isoladas desses corações perfundidos com ouabaína mostraram maior recaptção de cálcio, redução da fosforilação oxidativa e da taxa de geração de ATP. Esses achados foram revertidos pelo uso de bloqueadores de canais de cálcio, sugerindo que são dependentes da sobrecarga de cálcio induzida pela inibição da NKA pela ouabaína (KHATTER *et al.*, 1989). Além da reduzida atividade, observamos em nosso trabalho uma redução da expressão da isoforma α 1 da NKA e do NCX, contribuindo ainda mais para a sobrecarga de cálcio.

Além do mais, a redução da expressão da SERCA e PLB fosforilado, concomitante ao aumento da expressão PLB e redução da razão SERCA/PLB, nos permite especular que além dos mecanismos sarcolemais, o retículo sarcoplasmático também está envolvido na sobrecarga de cálcio observada. A SERCA é a bomba de cálcio do RS que permanece inibida pelo PLB. No entanto, quando o PLB é fosforilado, ele deixa de inibir a SERCA, permitindo a recaptção de cálcio pelo RS. Assim, a diminuição da expressão da SERCA, aumento do PLB e redução do PLB fosforilado levando a redução da recaptção de cálcio pelo RS (BERS & DESPA, 2006). Ou seja, há tanto um déficit de extrusão de cálcio pelo sarcolema como também de recaptção de cálcio pelo RS, contribuindo ainda mais para a situação de sobrecarga de cálcio.

A sobrecarga de cálcio explicaria a redução da PSIVE encontrada em nosso trabalho quanto em estudos prévios de nosso grupo, que também observaram aumento da PDfVE em ratos anestesiados (FURIERI^b *et al.*, 2011). O aumento da PDfVE pode ser ocasionada por essa incapacidade de retirar o cálcio do meio intracelular durante a diástole.

O NO, mesmo que em reduzida quantidade em coronárias de ratos do grupo HgCl₂ contribui para diminuir a situação de sobrecarga de cálcio e consegue manter a perfusão adequada do miocárdio.

Vimos que a exposição ao mercúrio inorgânico é responsável por promover alterações na função miocárdica e também na expressão de importantes proteínas envolvida no ciclo de cálcio no cardiomiócito. Portanto, resolvemos avaliar se o tratamento também era capaz de modificar a morfologia de células miocárdicas e o conteúdo de colágeno cardíaco. Observamos que nem o comprimento, o perímetro, a largura e a área total dos cardiomiócitos foram modificados pelo modelo experimental utilizado. De igual maneira, o conteúdo de colágeno não foi diferente entre os grupos estudados.

Em estudo prévio, não foi encontrado diferença no peso dos ventrículos (VE e VD) de ratos expostos durante 30 dias a baixa concentração de HgCl₂ e também não foi detectada diferença quando o peso dos ventrículos era corrigido pelo peso corporal dos ratos (VE/PC e VD/PC) (FURIERI^b *et al.*, 2011). E também, trabalhos na literatura mostram que tanto o mercúrio orgânico como o inorgânico são capazes de alterar o peso do coração, entretanto, em todos os estudos, as concentrações às quais os animais foram expostos são maiores (1 a 5mg/Kg de metilmercúrio e 0,5 a 2,5 mg/Kg de HgCl₂) (BARTOLOME *et al.*, 1982; BARTOLOME *et al.*, 1984) que a utilizada em nosso trabalho (4,34 µg/Kg). Ratos que recebiam doses diárias de metilmercúrio por 21 dias (1; 2,5 e 5 mg/Kg), iniciando-se o tratamento no primeiro dia após o nascimento, tiveram rápido crescimento e desenvolvimento tecidual dos corações, acompanhado por hipertrofia cardíaca quando adultos (BARTOLOME *et al.*, 1982). Já o HgCl₂ (0,5; 1 e 2,5 mg/Kg) provocou aumento inicial do peso do coração com subsequente diminuição a valores menores que de ratos controle (BARTOLOME *et al.*, 1984).

***SUMÁRIO DE
RESULTADOS***

6 SUMÁRIO DE RESULTADOS

Avaliamos os efeitos da exposição durante 30 dias, em ratos, a baixa concentração de HgCl_2 sobre a reatividade de artérias coronárias, produção local de NO e $\text{O}_2^{\cdot-}$, expressão gênica das isoformas NOX-1 e NOX-4 da NAPHoxidase e isoforma SOD-3, morfologia dos vasos coronarianos, produção de nitritos plasmáticos. Para confirmar que os achados em artérias coronárias eram ocasionadas por efeitos sobre o endotélio vascular, analisamos, em células coronárias, a produção de EROs, NO e a expressão protéica da eNOS. Avaliamos também a participação do NO sobre a modulação de força de corações de ratos expostos ou não ao HgCl_2 , a expressão protéica de importantes proteínas envolvidas no ciclo de cálcio e a morfologia dos cardiomiócitos.

Em artérias coronárias observamos que o tratamento com HgCl_2 aumentou a resposta contrátil a serotonina e reduziu o relaxamento induzido pela acetilcolina, no entanto, não modificou a resposta contrátil ao KCl (120 mmol/L) e o relaxamento a concentrações crescentes do doador de óxido nítrico, DEA-NO. O tratamento reduziu a participação do NO sobre a resposta vasoconstrictora e vasodilatadora, assim como a produção local de NO em artérias coronárias septais. Também observamos que a incubação com tiron e SOD reduziram a resposta contrátil a 5-HT e o uso de tiron e apocinina aumentaram o relaxamento a acetilcolina, o que indica aumento de geração de EROs, o que corrobora com o aumento de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em contado em artérias coronárias septais.

Também encontramos que o uso da indometacina reduz a resposta contrátil a serotonina e aumenta o relaxamento a ACh, sugerindo aumento da participação de prostanóides vasoconstrictores em artérias coronárias após exposição a baixa concentração durante curto período de tempo. Ao incubar as artérias com o TEA, inibidor de canais para potássio ativados por cálcio, vimos que há redução da participação dos EDHF em artérias do grupo tratado, já que houve redução da participação desses canais tanto na resposta vasoconstrictora quanto vasodilatadora.

Observamos ainda, que além das alterações funcionais, o tratamento com HgCl_2 foi capaz de modificar a morfologia de artérias coronárias. As artérias intramiocárdicas de ratos do grupo HgCl_2 possuem menor área total e menor área do lúmen, porém, sem modificação da camada média do vaso.

Em células endoteliais explantadas de coronárias suínas encontramos aumento da produção de $O_2^{\cdot -}$ após exposição a concentrações crescentes de $HgCl_2$ e que esse aumento é dependente da concentração. Também vimos redução dos subprodutos de degradação do NO, nitritos e nitratos, em todas as concentrações estudadas, no entanto, sem diferenças entre elas. O uso concomitante de antioxidantes e do inibidor da sintase do NO, L-NAME, levou a redução da geração de radicais livres e aumento da concentração de nitritos e nitratos em meio de cultivo celular. O que sugere que as EROs são proveniente da NADPHoxidase e a eNOS desacoplada também tem participação na geração desses radicais livres. A expressão da eNOS nas células endoteliais expostas a maior concentração de $HgCl_2$ (5 $\mu g/mL$) está aumentada, constituindo um mecanismo compensatório a redução do total de NO e, indiretamente, contribuindo para a geração de mais EROs.

Em corações isolados perfundidos pela técnica de Langendorff encontramos redução da PSIVE e alterações da expressão de importantes proteínas cardíacas envolvidos no ciclo de cálcio do cardiomiócito. Houve aumento da expressão do PLB, redução da expressão da SERCA, do PLB fosforilado na serina-16, da subunidade $\alpha 1$ da NKA, do NCX do PLB e também da razão SERCA/PLB. A expressão de eNOS e iNOS também estava diminuída. Além disso, a perfusão com L-NAME foi capaz de reduzir ainda mais a PSIVE, aumentar a PDIVE, aumentar a PPC e a incidência de arritmias em corações de ratos que foram expostos ao $HgCl_2$. No entanto, o tratamento não modificou a morfologia dos cardiomiócitos.

Os efeitos observados e descritos acima estão esquematizados nas figuras 44 e 45.



Figura 44: Esquema representando os efeitos da exposição durante 30 dias a baixa concentração de HgCl₂ sobre artérias coronárias e corações isolados.

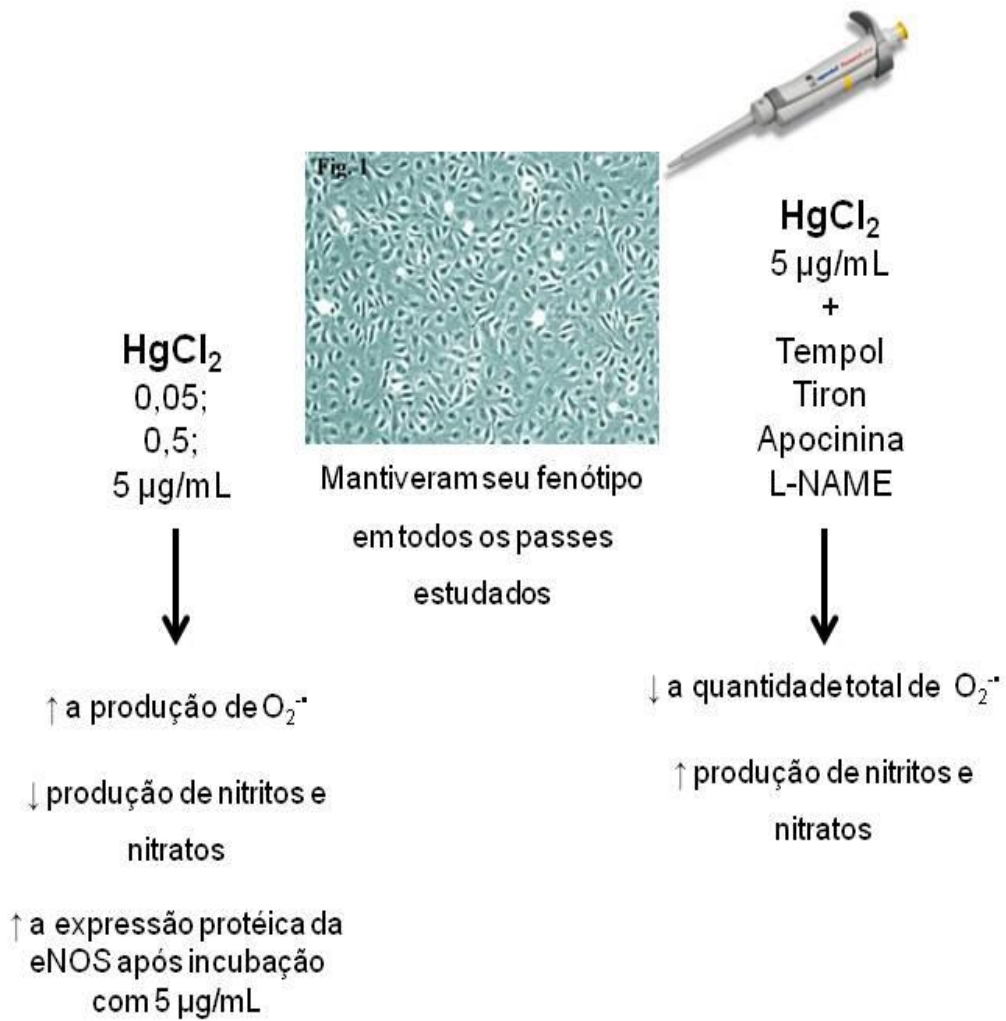


Figura 45: Esquema representando os efeitos da exposição durante 24 horas a 0,05; 0,5 e 5 µg/mL de de HgCl₂ em células endoteliais de coronárias suínas.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O nosso trabalho mostra, pela primeira vez, que a exposição a baixa concentração de HgCl_2 , próxima às encontradas em indivíduos que removeram amálgamas dentários, que foram expostos a vapor de mercúrio, ou que consomem rotineiramente peixes contaminados, foi capaz de causar disfunção endotelial em artérias coronárias por aumento da geração de espécies reativas de oxigênio levando a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, e ainda por redução da participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio e aumento da participação de prostanóides vasoconstrictores. E os dados encontrados em artérias são confirmados por experimentos em células endoteliais explantadas de coronárias suínas, indicando que a geração de espécies reativas de oxigênio se dá pela ativação da NADPHoxidase e pelo desacoplamento de eNOS.

Ainda podemos concluir que além dos efeitos sobre a reatividade coronariana, o tratamento com HgCl_2 também foi capaz de reduzir a função de corações isolados. E que o NO, mesmo em quantidade reduzida, era capaz de manter o suprimento sanguíneo adequado e minimizar os efeitos decorrentes da sobrecarga de cálcio presente em corações de ratos expostos ao metal.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

AGO, T.; NUNOI, H.; ITO, T.; SUMIMOTO, H. Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the sh3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. **The Journal of biological chemistry**. v. 274, p. 33644-33653, 1999.

ALLY, A.; BUIST, R.; MILLS, P.; REUHL, K. Effects of methylmercury and trimethyltin on cardiac, platelet, and aorta eicosanoid biosynthesis and platelet serotonin release. **Pharmacology, biochemistry and behavior**. v. 44(3), p. 555-563, 1993.

ANGUS, J. A.; COCKS, T. M. Endothelium-derived relaxing factor. **Pharmacological and Therapeutics**. v. 41,p. 303-351, 1989.

ANNER, B.M.; MOOSMAYER, M. Mercury inhibits Na-K-ATPase primarily at the cytoplasmic side. **American Journal of Physiology**. v. 262, p. 843-848, 1992.

ANNER, B.M.; MOOSMAYER, M.; IMESCH, E. Chelation of mercury by ouabain-sensitive and ouabain-resistant renal Na,K-ATPase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 167, p. 1115-1121, 1990.

ANNER, B.M.; MOOSMAYER, M.; IMESCH, E. Mercury blocks Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. **American Journal of Physiology**.v. 262, p. 830-836, 1992.

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. **Pathology international**. v. 50(3), p.169-174, 2000.

ASSIS, G.P.S.; SILVA, C.E.C.; STEFANON, I.; VASSALLO, D.V. Effects of small concentrations of mercury on the contractile activity of the rat ventricular myocardium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 134, p. 375-383, 2003.

AUGUSTI, P.R.; CONTERATO, G.M.; SOMACAL, S.; SOBIESKI, R.; SPOHR, P.R.; TORRES, J.V.; CHARÃO, M.F.; MORO, A.M.; ROCHA, M.P.; GARCIA, S.C.; EMANUELLI, T. Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. **Food and chemical toxicology**. v. 46(1), p. 212-219, 2008.

AZEVEDO, F.A. Toxicologia do Mercúrio. São Carlos: RiMa; 2003. São Paulo: InterTox; 2003.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. *Current Opinion in immunology*. v. 16(1), p. 42-47, 2004.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**. v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BAKIR, F.; DAMLUJI, S.F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N.Y.; TIKRITI, S.; DAHAHIR, H.I.; CLARKSON, T.W.; SMITH, J.C.; DOHERTY, R.A. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**. v. 181(96), p. 230-241, 1973.

BARTOLOME, J.; CHAIT, E.A.; TREPANIER, P.; WHITMORE, W.L.; WEIGEL, S.; SLOTKIN, T.A. Organ specificity of neonatal methyl mercury hydroxide poisoning in the rat: effects of ornithine decarboxylase activity in developing tissues. **Toxicology Letters**. v. 13, p. 267-276, 1982.

BARTOLOME, J.; WHITMORE, W.L.; SLOTKIN, T.A. Effects of neonatal mercuric chloride administration on growth and biochemical development of neuronal and non-neuronal tissues in the rat: comparison with methylmercury. **Toxicology Letters**. v. 22, p. 101-111, 1984.

BASTOS, W.R.; GOMES, J.P.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E.L.; BERNARDI, J.V.; DE LACERDA; L.D.; DA SILVEIRA, E.G.; PFEIFFER, W.C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **The science of the total environment**. v. 368(1), p. 344-351, 2006.

BASU, N.; SCHEUHAMMER, A.M.; EVANS, R.D.; O'BRIEN, M.; CHAN, H.M. Cholinesterase and monoamine oxidase activity in relation to mercury levels in the

cerebral cortex of wild river otters. **Human & experimental toxicology**. v. 26(3), p. 213-220, 2007.

BASU, N.; SCHEUHAMMER, A.M.; EVANS, R.D.; O'BRIEN, M.; CHAN, H.M. Cholinesterase and monoamine oxidase activity in relation to mercury levels in the cerebral cortex of wild river otters. **Human & experimental toxicology**. v. 26(3), p. 213-220, 2007.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 87(4), p. 1620-1624, 1990.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**. v. 87(1), p. 245-313, 2007.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Science**. v. 65 (18-19), p. 1865-1874, 1999.

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

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**. v. 415, p. 198-205, 2002.

BERS, D.M.; GUO, T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1047, p. 86-98, 2005.

BERS, D.M.; DESPA, S. Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. *Journal of pharmacological sciences*. v. 100(5), p.315-322, 2006.

BHUNIA, A.K.; HAN, H.; SNOWDEN, A.; CHATTERJEE, S. Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. **The Journal of biological chemistry**. v. 272(25), p. 15642-15649, 1997.

- BLAUSTEIN, M.P. Sodium/calcium exchange and the control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 12, p. 56-68, 1988.
- BOISCHIO, A.A.P.; BARBOSA, A. Exposição ao Mercúrio Orgânico em Populações Ribeirinhas do Alto Madeira, Rondônia: Resultados Preliminares. **Caderno de Saúde Pública**. v. 9, p. 155-160, 1993.
- BOS, C.L.; RICHEL, D.J.; RITSEMA, T.; PEPPELENBOSCH, M.P.; VERSTEEG, H.H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **International Journal of Biochemistry**. v. 36, p. 1187-1205, 2004.
- BRANDES, R.P.; SCHRÖDER, K. Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. **Trends in cardiovascular medicine**. v. 18, p. 15-19, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde. Manual de Normas de Vacinação. Brasília. Editora do Ministério da Saúde; 2001.
- BRIONES, A.M.; MONTOYA, N.; GIRALDO, J.; VILA, E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. **Autonomic & autacoid pharmacology**. v. 25(4), p. 155-162, 2005..
- BRUNDER, D.G.; DETTBARN, C.; PALADE, P. Heavy metal-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. **The Journal of biological Chemistry**. v. 263, p. 18785-18792, 1988.
- BRUTSAERT, D.L.; FRANSEN, P.; ANDRIES, L.J.; DE KEULENAER, G.W.; SYS, S.U. Cardiac endothelium and myocardial function. **Cardiovascular research**. v. 38(2), p. 281-290, 1998.
- CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**. v. 87(10), p. 840-844, 2000.

CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P.; ARTESE, L.; DEL ROSSO, G.; PORCELLI, G.; FELACO, M.; VOLPE, A.R.; GIULIANO, G. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic Mercury in rats. **British journal of industrial medicine**. v. 49(4), p. 226-232, 1992.

CARMIGNANI, M.; FINELLI, V.N.; BOSCOLO, P. Mechanisms in cardiovascular regulation following chronic exposure of male rats to inorganic mercury. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 69(3), p. 442-450, 1983.

CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P.; PREZIOSI, P. Renal ultrastructural alterations and cardiovascular functional changes in rats exposed to mercuric chloride. **Archives of toxicology**. v. 13, p. 353-356, 1989.

CARRANZA-ROSALES, P.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; SEPÚLVEDA-SAAVEDRA, J.; CRUZ-VEGA, D.E.; GANDOLFI, A.J. 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**. v. 210, p. 111-121, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Thimerosal in vaccines: a joint statement of the American Academy of Pediatrics and the Public Health Service. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**. v. 48(26), p. 563-565, 1999.

CHAN, E.C.; PESHAVARIYA, H.M.; DUSTING, G.J. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: Potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. **Pharmacology & Therapeutics**, v.122, p.97-108, 2009.

CHENG, G.; CAO, Z.; XU, X.; VAN MEIR, E.G.; LAMBETH, J.D. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox 3, Nox4, and Nox5. **Gene**. v. 269, p. 131-140, 2001.

CHILIAN, W.M.; EASTHAM, C.L.; MARCUS, M.L. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle. **American Journal of Physiology**. v. 251(4), p. 779-788, 1986

CHOSE, O.; SANSILVESTRI-MOREL, P.; BADIER-COMMANDER, C.; BERNHARDT, F.; FABIANI, J.N.; RUPIN, A.; VERBEUREN, T.J. Distinct role of nox1, nox2, and p47phox in unstimulated versus angiotensin II-induced NADPH oxidase activity in human venous smooth muscle cells. **Journal of cardiovascular pharmacology**. v. 51, p.131-136, 2008.

CHRISTENSEN, K.L.; MULVANY, M.J. Location of resistance arteries. **Journal of vascular research**. v. 38(1), p. 1-12, 2001.

CLARKSON, T.W. The Three Modern Faces of Mercury. **Environmental Health Perspectives**. v. 110 (1), p. 11-23, 2002.

CLEARY, D.; THORNTON, I.; BROWN, N.; KARANTZIS, G.T.; DELVES, T.; WORTHINGTON, S. Mercury in Brazil. **Nature**. v. 369, p. 613-614, 1994.

COWAN, C.L.; COHEN, R.A. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. **American Journal of Physiology**. v. 261(3), p. 830-835, 1991.

DA CUNHA, F.N.; DE ASSIS, G.P.S.; SILVA, C.E.C.; STEFANON, I.; PINTO, V.D.; VASSALLO, D.V. Effects of mercury on the contractile activity of the right ventricular myocardium. **Archives of environmental Contamination and Toxicology**. v. 41, p. 374-380, 2001.

DA CUNHA, V.; SOUZA, H.P.; ROSSONI, L.V.; FRANÇA, A.S.; VASSALLO, D.V. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. **Archives of environmental contamination and toxicology**. v. 39(1), p. 124-130, 2000.

DE KEULENAER, G.W.; ALEXANDER, R.W.; USHIO-FUKAI, M.; ISHIZAKA, N.; GRIENDLING, K.K. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. **The Biochemical Journal**. v. 329(3), p. 653-657, 1998.

DE LAS HERAS, N.; ARAGONCILLO, P.; MAESO, R.; VAZQUEZ-PÉREZ, S.; NAVARRO-CID, J.; DEGASPARO, M.; MANN, J.; RUILOPE, L.M.; CACHOFEIRO, V.; LAHERA, V. AT(1) receptor antagonism reduces endothelial dysfunction and intimal thickening in atherosclerotic rabbits. **Hypertension**. v. 34(4), p. 969-975, 1999.

DE MARCO, K.C.; PASSOS, C.J.; SERTORIO, J.; TANUS-SANTOS, J.E.; BARBOSA, F. JR. Environmental exposure to methylmercury is associated with a decrease in nitric oxide production. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**. v.106(5), p. 411-415, 2010.

DE MEY, J.G.; VANHOUTTE, P.M. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. **Circulation Research**. v. 51, p. 439-447, 1982.

DEUSSEN, A.; BRAND, M.; PEXA, A.; WEICHSEL, J. Metabolic coronary flow regulation- current concepts **Basic research in cardiology**. v. 101(6), p. 453-464, 2006.

DÓREA, J.G.; MARQUESM R.C.; BRANDÃO, K.G. Neonate exposure to thimerosal mercury from hepatitis B vaccines. **American journal of perinatology**. v. 26(7), p. 523-527, 2009.

DRUMMOND, G.R.; SELEMIDIS, S.; GRIENDLING, K.K.; SOBEY, C.G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews: Drug discovery**. v. 10(6), p. 453-471, 2011.

DUFRESNE, M.; WAROCQUIER-CLÉROUT, R. Explants of porcine coronary artery in culture: a paradigm for studying the influence of heparin on vascular wall cell proliferation. **Cytotechnology**. v. 37, p. 13-22, 2001.

DUNCKER, D.J.; BACHE, R.J. Regulation of coronary blood flow during exercise. **Physiological Reviews**. v.88, p.1009-1086, 2008.

ECKHARDT, W.; BELLMANN, K.; KOLB, H. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in beta cells by environmental factors: heavy metals. **The Biochemical journal**. v. 338 (3), p. 695-700, 1999.

ELLMARK, S.H.; DUSTING, G.J.; FUI, M.N.; GUZZO-PERNELL, N.; DRUMMOND, G.R. The contribution of NOX4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. **Cardiovascular research**. v. 65, p. 495-504, 2005.

EPA. Mercury Study Report to Congress. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2007

ESPAÑOL CANO, S. Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Apresentado na jornada internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal en Iberoamérica, 2001.

ETO, K. Minamata disease. **Neuropathology**. v. 20, p. 14-19, 2000.

ETO, K. Minamata disease: a neuropathological viewpoint. **Seishin Shinkeigaku Zasshi**. v. 108(1), p.10-23, 2006.

ETO, K.; YASUTAKE, A.; MIYAMOTO, K.; TOKUNAGA, H.; OTSUKA, Y. Chronic effects of methylmercury in rats. II. Pathological aspects. **The Tohoku journal of experimental medicine**. v. 182(3), p. 197-205, 1997.

EVANS, D.H.; WEINGARTEN, K. The effect of cadmium and other metals on vascular smooth muscle of the dogfish shark, *Squalus acanthias*. **Toxicology**. v. 61, p. 275-281, 1990.

FALCOCHIO, D.; DE ASSIS, G.P.S.; STEFANON, I.; VASSALLO, D.V. Small concentrations of Mercury enhances positive inotropic effects in the rat ventricular myocardium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 20, p. 22-25, 2005.

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

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **British journal of pharmacology**. v. 156(4), p. 545-562, 2009.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P.M. Vasoconstrictor prostanóides. **Pflugers Archiv**. v. 459(6), p. 941-950, 2010.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. EDHF: new therapeutic targets? **Pharmacological research**. v. 49(6) p. 565-580, 2004.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Clinical & experimental pharmacology and physiology**. v. 23(12), p. 1082-1090, 1996.

FELICIANO, L.; HENNING, R.J. Coronary artery blood flow: physiologic and pathophysiologic regulation. **Clinical Cardiology**. v. 22(12), p. 775-786, 1999.

FILLION, M.; MERGLER, D.; SOUSA PASSOS, C.J.; LARRIBE, F.; LEMIRE, M.; GUIMARÃES, J.R. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environmental Health*. p. 5:29, 2006.

FLOREA, A.M.; BÜSSELBERG, D.J. Metals and breast cancer: risk factors or healing agents? *Toxicology*. v. 159619. 2011 [Epub 2011 Jul 24].

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.L.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**. v.23(6), p.1121-1131, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**. v. 113(13), p. 1708-1714, 2006.

FRISBEE, J.C.; MAIER, K.G.; STEPP, D.W. Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. **American journal of physiology**. v. 283(6), p. 2160-2168. 2002.

FURCHGOTT, R.F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. **Annual review of pharmacology and toxicology**. v. 24, p. 175-197, 1984.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v. 288, p. 373-6, 1980.

FURIERI^a, L.B.; GALÁN, M.; AVENDAÑO, M.S.; GARCÍA-REDONDO, A.B.; AGUADO, A.; MARTÍNEZ, S.; CACHOFEIRO, V.; BARTOLOMÉ, M.V.; ALONSO, M.J.; VASSALLO, D.V.; SALAICES, M. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. **British journal of pharmacology**. v. 162(8), p. 1819-31, 2011.

FURIERI^b, L.B.; FIORESI, M.; JUNIOR, R.F.; BARTOLOMÉ, M.V.; FERNANDES, A.A.; CACHOFEIRO, V.; LAHERA, V.; SALAICES, M.; STEFANON, I.; VASSALLO, D.V. Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 255(2), p. 193-199, 2011.

GALLO, M. P.; GHIGO, D.; BOSIA, A.; ALLOATTI, G.; COSTMAGNA, C.; PENNA, C.; LEVI, R. C. Modulation of guinea-pig cardiac L-type calcium current by nitric oxide synthase inhibitors. **Journal of physiology**. v. 506, p. 639-651, 1998.

GARCÍA GÓMEZ, M.; BOFFETTA, P.; CABALLERO KLINK, J.D.; ESPAÑOL, S.; GÓMEZ QUINTANA, J. Cardiovascular mortality in mercury miners. **Medicina Clínica**. v. 128, p. 766–771, 2007.

GARCÍA-ESQUINAS, E.; PÉREZ-GÓMEZ, B.; FERNÁNDEZ, M.A.; PÉREZ-MEIXEIRA, A.M.; GIL, E.; PAZ, C.D.; IRISO, A.; SANZ, J.C.; ASTRAY, J.; CISNEROS, M.; SANTOS, A.D.; ASENSIO, A.; GARCÍA-SAGREDO, J.M.; GARCÍA, J.F.; VIOQUE, J.; POLLÁN, M.; LÓPEZ-ABENTE, G.; GONZÁLEZ, M.J.; MARTÍNEZ, M.; BOHIGAS, P.A.; PASTOR, R.; ARAGONÉS, N. Mercury, lead and cadmium in human milk in relation to diet, lifestyle habits and socio-demographic variables in Madrid (Spain). **Chemosphere**. 2011 [Epub ahead of print]

GARCÍA-PASCUAL, A.; LABADÍA, A.; JIMENEZ, E.; COSTA, G. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K⁺ conductance. **British journal of pharmacology**. v. 115(7), p. 1221-1230, 1995.

GARLAND, J.G.; MCPHERSON, G.A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. **British journal of pharmacology**. v. 105(2), p. 429-435, 1992.

GEIER, D.A.; GEIER, M.R. An assessment of the impact of thimerosal on childhood neurodevelopmental disorders. **Pediatric Rehabilitation**. v. 6, p. 97-102, 2003.

GIMBRONE, M.A. Jr. . Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. **The American journal of cardiology**. v. 75(6), p. 67-70, 1995.

GLEICHMANN, E.; KIMBER, I.; PURCHASE, I.F. Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. A discussion. **Archives of Toxicology**. v. 63, p. 257-273, 1989.

GOLPON^a, H.A.; PÜCHNER, A.; BARTH, P.; WELTE, T.; WICHERT, P.; FEDDERSEN, C.O. Nitric oxide – dependent vasorelaxation and endothelial cell damage caused by mercury chloride. **Toxicology**. v.192(2-3), p. 179-188, 2003.

GÓMEZ, M.G.; BOFFETTA, P.; KLINK, J.D.C.; ESPAÑOL, S.; QUINTANA, J.G.; COLIN, D. Mortalidad por cáncer en los mineros del mercurio. **Gaceta Sanitaria**.v. 21, p. 210-217, 2007.

GRAEME, K.A.; POLLACK, C.V. JR. Heavy metal toxicity, Part I: arsenic and mercury. **The Journal of Emergency Medicine**. v. 16(1), p. 45-56, 1998.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v. 126, p. 131–138, 1982.

GRIENGLING, K.K.; MINIERI, C.A., OLLERENSHAW, J.D.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**. v. 74, p.1141-1148, 1994.

GRIENGLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**. v. 86(5), p. 494-501, 2000.

GUALLAR, E.; SANZ-GALLARDO, M.I.; VAN'T VEER, P.; BODE, P.; ARO, A.; GÓMEZ-ARACENA, J.; KARK, J.D.; RIEMERSMA, R.A.; MARTÍN-MORENO, J.M.;

KOK, F.J. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**. v. 347, p. 1747-1754, 2002.

GUTIERREZ, L.L.; MAZZOTTI, N.G.; ARAÚJO, A.S.; KLIPEL, R.B.; FERNANDES, T.R.; LLESUY, S.F.; BELLÓ-KLEIN, A. Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, p. 767-772, 2006.

HACON, S.; YOKOO, E.; VALENTE, J.; CAMPOS, R.C.; DA SILVA, V.A.; DE MENEZES, A.C.; DE MORAES, L.P.; IGNOTTI, E. Exposure to mercury in pregnant women from Alta Floresta-Amazon basin, Brazil. **Environmental research**. v. 84(3), p. 204-210, 2000.

HACON, S.S.; ROCHEDO, E.R.R.; CAMPOS, R.C.; LACERDA, L.D. Mercury exposure through fish consumption in the urban área of Alta Floresta in the Amazon Basin. **Journal of geochemical exploration**. v. 58, p. 209-216, 1997.

HALBACH, S. Combined estimation of mercury species released from amalgam. **Journal of Dental Research**. v. 74, p. 1103-1109, 1995.

HALBACH, S.; SCHÖNSTEINER, G.; VIÉRLING, W. The action of organic mercury compounds on the function of isolated mammalian heart muscle. **European Journal of Pharmacology**. v.167, p. 255-264, 1989.

HALBACH, S.; VOGT, S.; KÖHLER, W.; FELGENHAUER, N.; WELZL, G.; KREMERS, L.; ZILKER, T.; MELCHART, D. Blood and urine mercury levels in adult amalgam patients of a randomized controlled trial: Interaction of Hg species in erythrocytes. **Environmental Research**. v. 107, p. 69-78, 2008.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Reviews**. v. 55(1), p. 44-49, 1997.

HARRISON, D.G. Endothelial function and oxidant stress. **Clinical Cardiology**. v. 20, p. 11-17, 1997.

- HECHTENBERG, S.; BEYERSMANN, D. Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca⁽²⁺⁾-ATPase activity by cadmium, lead and mercury. **Enzyme**. v. 45, p. 109-115, 1991.
- HEUMÜLLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT, H.H.; BUSSE, R.; SCHRÖDER, K.; BRANDES, R.P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPHoxidase but an antioxidant. **Hypertension**. v. 51(2), p. 211-217, 2008.
- HOLLAND, J.A.; MEYER, J.W.; CHANG, M.M.; O'DONNELL, R.W.; JOHNSON, D.K.; ZIEGLER, L.M. Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. **Endothelium**. v. 6, p. 113-121, 1998.
- HORNBERGER, W.; PATSCHEKE, H. Hydrogen peroxide and methyl mercury are primary stimuli of eicosanoid release in human platelets. **Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry**. V. 27(9), p. 567-755, 1989.
- HOUSTON, M.C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Alternative therapies in health medicine**. v.13(2), p. 128-133, 2007.
- HUANG, C.F.; HSU, C.J.; LIU, S.H.; LIN-SHIAU, S.Y. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase involved. **Toxicology letters**. v. 176(3), p. 188-197, 2008.
- HUANG, Y.L.; CHENG, S.L.; LIN, T.H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercuric chloride. **Biological trace element research**. v. 52(2), p. 193-206, 1996.
- ISOLDI, M.C.; CASTRUCCI, A.M.L. Sinalização Celular. In: Aires MM, Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p 59-89.
- JAFFE, E. A. Physiologic functions of normal endothelial cells. **Annals of New York Academy of Science**. v. 454, p. 279-291, 1985.
- JECFA (2006) Methylmercury. Summary and conclusions of the 67 the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. WHO Technical Report Series 940 (in press). www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary67.pdf

JIE, X.L.; JIN, G.W.; CHENG, J.P.; WANG, W.H.; LU, J.; QU, L.Y. Consumption of mercury-contaminated rice induces oxidative stress and free radical aggravation in rats. **Biomedical and environmental sciences**. v. 20(1), p. 84-89, 2007.

JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F.; BRIONES, A.M.; GIRALDO, J.; PLANAS, A.M.; SALAICES, M.; VILA, E. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. **The Journal of pharmacology and experimental therapies**. v. 316(1), p. 42-52, 2006.

JONES, C.J.; KUO, L.; DAVIS, M.J.; CHILIAN, W.M. Regulation of coronary blood flow: coordination of heterogeneous control mechanisms in vascular microdomains. **Cardiovascular Research**. v. 29(5), p. 585-596, 1995.

KERWIN, J.F. JR.; LANCASTER, J.R. JR.; FELDMAN, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **Journal of medicinal chemistry**. v. 38(22), p. 4343-62, 1995.

KHATTER, J.C.; AGBANYO, M.; NAVARATNAM, S.; NERO, B.; HOESCHEN, R.J. Digitalis cardiotoxicity: cellular calcium overload a possible mechanism. **Basic Research in Cardiology**. v. 84, p. 553-563, 1989.

KIRSTEIN, M.; RIVET-BASTIDE, M.; HATEM, S.; BÉNDARDEAU, A.; MERCADIER, J. J.; FISCHMEISTER, R. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. **Journal of clinical investigation**. v. 95, p. 794–802, 1995.

KISHIMOTO^a, T.; OGURI, T.; TADA, M. Effects of methylmercury (CH₃HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells. **Toxicology**. 103 (1), p. 1-7, 1995.

KISHIMOTO^b, T.; OGURI, T.; TADA, M. Methylmercury-injury effects on tube formation by cultured human vascular endothelial cells. **Cell biology and toxicology**. v. 11(1), p. 29-36, 1995.

KLABUNDE, R. E.; RITGER, R. C.; HELGREN, M. C. Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) formation/release in anesthetized dogs. **European journal of pharmacology**. v. 199, p. 51-59, 1991.

KOJDA, G.; KOTTENBERG, K.; NIX, P.; SCHLUTER, K. D.; PIPER, H. M.; NOACK, E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular muscle. **Circulation research**. v. 78, p. 91-101, 1996.

KREUZER, H.; GLEICHMANN, U.; NEUHAUS, L. Method for the continuous measurement of pO₂ in the human coronary sinus. **Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Medizin**. v. 75, p. 419-422, 1969.

LACERDA, L.D. Amazon mercury emissions. **Nature**. v. 374, p. 20-21, 1995.

LANGENDORFF, O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. **Pflügers Archiv**. V. 61, p. 291-332, 1898.

LAYLAND, J.; LI, J.M.; SHAH, A.M. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. **The Journal of Physiology**. v. 540, p. 457-567, 2002.

LEVY, A.S.; CHUNG, J.C.; KROETSCH, J.T.; RUSH, J.W. Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension. **Vascular Health and Risk Management**. v. 5, p. 1075-1087, 2009.

LI, W.G.; MILLER, F.J.JR.; ZHANG, H.J.; SPITZ, D.R.; OBERLEY, L.W.; WEINTRAUB, N.L. H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. **The journal of biological chemistry**. v. 276(31), p. 29251-29256, 2001.

LINCOLN, T.M.; DEY, N.; SELLAK, H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of applied physiology**. v. 91(3), p. 1421-1430, 2001.

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**. v. 66(3), p.289-295, 1991.

LOCKETTE, W.; OTSUKA, Y.; CARRETERO, O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. **Hypertension**. v. 8(6), p. 61-66, 1986.

- MACHADO, A.C.; PADILHA, A.S.; WIGGERS, G.A.; SIMAN, F.D.M.; STEFANON, I.; VASSALLO, D.V. Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 24, p. 92-97, 2007.
- MAHAFFEY, K.R. Mercury exposure: medical and public health issues. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**. v. 116, p. 127-154, 2005.
- MAHBOOB, M.; SHIREEN, K.F.; ATKINSON, A.; KHAN, A.T. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. **Journal of environmental science and health**. v. 36(5), p. 687-697. 2001.
- MALLAS, J.; BENEDITO, N. Mercury and gold mining in the Brazilian Amazon. **Ambio**. v. 15, p. 248-249, 1986.
- MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M.A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. **Journal of autonomic pharmacology**. v. 15(4), p. 279-307, 1995.
- MARÍN, J.; SANCHEZ-FERRER, C. F. Role of endothelium formed nitric oxide on vascular responses. **General pharmacology**. v. 21, p. 575-587, 1990.
- MARTÍN, M.C.; BALFAGÓN, G.; MINOVES, N.; BLANCO-RIVERO, J.; FERRER, M. Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. **Nitric Oxide**. v.12, p. 163-176, 2005.
- MARUMO, T.; SCHINI-KERTH, V.B.; FISSLTHALER, B.; BUSSE, R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. **Circulation**. v. 96, p. 2361-2367, 1997.
- MASSARONI, L.; ROSSONI, L.V.; AMARAL, S.M.C.; STEFANON, I.; OLIVEIRA, E.M.; VASSALLO, D.V. Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of Mercury in anaesthetized rats and in Langendorff perfused rat hearts. **Pharmacological Research**. v. 32, p. 27-36, 1995.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H.; NAKASHIMA, M.; HIRAKAWA, Y.; MUKAI, Y.; HIRANO, K.; KANAIDE, H.; TAKESHITA, A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarization factor in mice. **The journal of clinical investigation**. v. 106, p. 1521-1530, 2000.

MAZERIK, J.N.; HAGELE, T.; SHERWANI, S.; CIAPALA, V.; BUTLER, S.; KUPPUSAMY, M.L.; HUNTER, M.; KUPPUSAMY, P.; MARSH, C.B.; PARINANDI, N.L. Phospholipase A2 activation regulates cytotoxicity of Methylmercury in vascular endothelial cells. **International journal of toxicology**. v. 26(6), p. 553-569, 2007.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). **Free radical biology & medicine**. v.5(5-6), p. 363-369, 1988.

MILLER, D.M.; WOODS, J.S. Urinary porphyrins as biological indicators of oxidative stress in the kidney. Interaction of mercury and cephaloridine. **Biochemical pharmacology**. v. 46(12), p. 2235-2241, 1993.

MILLER, V.M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclo-oxygenase in canine veins. **American Journal of Physiology**. v. 248, p. 432-437, 1985.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**. v. 5 (1), p. 62-71, 2001.

MITTAL, C.K.; HARRELL, W.B.; MEHTA, C.S. Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase. **Molecular and cellular biochemistry**. v. 149-150, p. 263-265, 1995.

MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends in pharmacological sciences**. v. 18(7) p. 252-256, 1997.

MONCADA, S. Nitric oxide. **Journal of hypertension**. v. 12(10), p. 35-39, 1994.

MOREIRA, C.M.; OLIVEIRA, E.M.; BONAN, C.D.; SARKIS, J.J.F.; VASSALLO, D.V. Effects of Mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 135, p. 269-275, 2003.

MULLER, J.M.; DAVIS, M.J.; CHILIAN, W.M. Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microcirculation. **Cardiovascular Research**. v. 32(4), p. 668-678, 1996.

MULVANY, M.J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News in physiological sciences**. v. 17, p. 105-109, 2002.

MULVANY, M.J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**. v. 41 (1), p. 19-26, 1977.

MULVANY, M.J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Reviews**. v. 70(4), p. 921-961, 1990.

MULVANY, M.J. Small artery remodeling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. **Medical & biological engineering computing**. v. 46(5), p. 461-467, 2008.

NAGAO, T.; VANHOUTTE, P.M. Hyperpolarization contributes to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in femoral veins of rats. **American journal of physiology**. v. 261(4), p. 1034-1037, 1991.

NAGAO, T.; FUJISHIMA, M.; VANHOUTTE, P.M. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. **Japanese journal of pharmacology**. v. 58(2), 342 p., 1992.

NASCIMENTO, E.S.; CHASIN, A.A.M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**. v. 1, 176 p., 2001.

NELSON, M.T.; PATLAK, J.B.; WORLEY, J.F.; STANDEN, N.B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **American journal of physiology**. v. 259(1), p. 3-18, 1990.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American journal of physiology**. v. 268, p. 799-822, 1995.

NRIAGU, J.O.; PHEIFFER, W.C.; MALM, O.; SOUZA, C.M.M.; MIERLE, G. Mercury Pollution in Brazil. **Nature**. v. 356(6368), 389p., 1992.

OKA, M.; HORROBIN, D.F.; MANKU, M.S.; CUNNANE, S.C.; ALLY, A.I.; MORGAN, R.O. Effect of mercuric chloride on the rat mesenteric vascular bed: relevance to the mechanism of mercury toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 51(3), p. 427-438, 1979.

OLIVEIRA, E.M.; VASSALLO, D.V.; SARKIS, J.J.F.; MILL, J.G. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 128, p. 86-91, 1994.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, p. 524-526, 1987.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**. v. 31, p. 170-180, 2008.

PARK, E.J.; PARK, K. Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. **Toxicology in vitro**. v. 21(5), p. 789-794, 2007.

PAULUS, W. J.; KÄSTNER, S.; PUJADAS, P.; SHAH, A. M.; DREXLER, H.; VANDERHEYDEN, M. Left ventricular contractile effects of inducible nitric oxide synthase in the human allograft. **Circulation**. v. 96, p. 3436-3442, 1997.

PECANHA, F.M.; WIGGERS, G.A.; BRIONES, A.M.; PEREZ-GIRON, J.V.; MIGUEL, M.; GARCIA-REDONDO, A.B.; VASSALLO, D.V.; ALONSO, M.J.; SALAICES, M. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanóides on vasoconstrictor responses to phenylefrine is increased by exposure to low mercury concentration. **Journal of physiology and pharmacology**. v. 61(1), p. 29-36, 2010.

PESCE, A.J.; HANENSON, I.; SETHI, K. beta2 microglobulinuria in a patient with nephrotoxicity secondary to mercuric chloride ingestion. **Clinical toxicology**. v. 11(3), p. 309-315, 1977.

RAMOS, K. S. Vascular toxicology: a cellular and molecular perspective. In: **Cardiovascular Toxicology**. v. 2, p. 483- 516, Acosta, D., Jr. (ed.) Raven Press, New York (1992).

REUS, I.S.; 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. **Journal of biochemical and molecular toxicology**. v. 17(3), p. 161-168, 2003.

RIGANTI, C.; COSTAMAGNA, C.; DOUBLIER, S.; MIRAGLIA, E.; POLIMENI, M.; BOSIA A; GHIGO, D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 228, p. 277–285, 2008.

RISSANEN, T.; VOUTILAINEN, S.; NYSSÖNEN, K.; LAKKA, T.A.; SALONEN, J.T. Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. **Circulation**. v. 102(22), p. 2677-2679, 2000.

ROSSONI, L.V.; AMARAL, S.M.C.; VASSALLO, P.F.; FRANÇA, A.; OLIVEIRA, E.M.; VARNER, K.J.; MILL, J.G.; VASSALLO, D.V. Effects of Mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 32, p. 989-997, 1999.

ROULET, M.; LUCOTTE, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. **Water, Air and Soil Pollution**. v. 80, p. 1079-1088, 1995.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; CANUEL, R.; RHEAULT, I.; TRAN, S.; DE FREITOS GOG Y.G.; FARELLA, N.; SOUZA DO VALE, R.; SOUSA PASSOS, C.J.; DE JESUS DA SILVA, E.; MERGLER, D.; AMORIM, M. Distribution and partition of total Mercury

in Waters of the Tapajós River Basin, Brazilian Amazon. **The Science of the Total Environment**. v. 213, p. 203-211, 1998.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; GUIMARÃES, J.R.D.; RHEAULT, I. Methylmercury in water, seston and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajós River, Brazil. **The Science of the Total Environment**. v. 261, p. 43-59, 2000.

SALONEN, J.; SEPPANEN, K.; NYSSONEN, K.; KORPELA, H.; KAUKANEN, 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**. v. 91, p. 645–655, 1995.

SALONEN, J.T.; SEPPÄNEN, K.; LAKKA, T.A.; SALONEN, R.; KAPLAN, G.A. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. **Atherosclerosis**. v. 148(2), p. 265-273, 2000.

SANDBORGH-ENGLUND, G.; ELINDER, C.G.; LANGWORTH, S.; SCHÜTZ, A.; EKSTRAND, J. Mercury in biological fluids after amalgam removal. **Journal of Dental Research**. v. 77, p. 615-624, 1998.

SCHÄCHINGER, V.; BRITTEN, M.B.; ZEHER, A.M. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. **Circulation**. v. 101(16), p. 1899-1906, 2000.

SCHIFFRIN, E.L.; DENG, L.Y.; LAROCHELLE, P. Blunted effects of endothelin upon small subcutaneous resistance arteries of mild essential hypertensive patients. **Journal of hypertension**. v. 10(5), p. 437-444, 1992.

SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. **American journal of physiology**. v. 287(2), p. 435-446, 2004.

SCHWINGER, R.H.; MÜNCH, G.; BÖLCK, B.; KARCZEWSKI, P.; KRAUSE, E.G.; ERDMANN, E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human

myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. **Journal of molecular and cellular cardiology**. v. 31(3), p. 479-491, 1999.

SEARS, C.E.; CHOATE, J.K.; PATERSON, D.J. Inhibition of nitric oxide synthase slows heart rate recovery from cholinergic activation. *Journal of applied physiology*. v. 84(5), p. 1596-1603, 1998.

SEDEEK, M.; HEBERT, R.L.; KENNEDY, C.R.; BURNS, K.D.; TOUYZ, R.M. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**. v.18, p.122-127, 2009.

SEGAL, A.W.; GARCIA, R.; GOLDSTONE, A.H.; CROSS, A.R.; JONES, O.T.G. Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. **The Biochemical Journal**. v. 196, p. 363-367, 1981.

SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; COMAS, J.V.; PORTOLÉS, M.T. Nitric oxide production by endothelial cells derived from blood progenitors cultured on NaOH-treated polycaprolactone films: A biofunctionality study. **Acta Biomaterialia**. V. 5, p. 2045-2053, 2009.

SHAH, A. M.; MACCARTHY, P.A. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 86, p. 49–86, 2000.

SHAMOO, A.E.; MACLENNAN, D.H. Separate effects of mercurial compounds on the ionophoric and hydrolytic functions of the (Ca⁺⁺ -Mg⁺⁺)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. **The Journal of Membrane Biology**. v. 25, p. 65-74, 1975.

SHATWELL, K.P.; SEGAL, A.W. NADPH oxidase. **The international journal of biochemistry & cel biology**.v. 28(11), p. 1191-1195, 1996.

SKRZYPIEC-SPRING, M.; GROTHUS, B.; SZELAG, A.; SCHULZ, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. **Journal of Pharmacology and Toxicology Methods**. v. 55, p. 113-126, 2007.

SRAER, J.D.; BAUD, L.; SRAER, J.; DELARUE, F.; ARDAILLOU, R. Stimulation of PGE2 synthesis by mercuric chloride in rat glomeruli and glomerular cells in vitro. **Kidney international**. v. 11, p. 63-68, 1982.

STRÂLIN, P.; KARLSSON, K.; JOHANSSON, B.O.; MARKLAND, S.L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. **Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology**. v. 15, p. 2032–2036, 1995.

SU, J.Y.; CHEN, W. The effects of methylmercury on isolated cardiac tissues. **American Journal of Pathology**. v. 95, p. 753-764, 1979.

TAYLOR, S.G.; SOUTHERTON, J.S.; WESTON, A.H.; BAKER, J.R. Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. **British Journal of Pharmacology**. v. 94(3), p. 853-863, 1988.

THOMSON, L.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; RADI, R. Kinetics of cytochrome c^{2+} oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 319(2), p. 491-497, 1995.

TORRES, A.D.; RAI, A.N.; HARDIEK, M.L. Mercury intoxication and arterial hypertension: report of two patients and review of the literature. **Pediatrics**. v. 105(3), 34 p., 2000.

TOUYZ, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**. v. 44(3), p. 248-252, 2004.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacological Review**. v. 52(4), p. 639-672, 2000.

URAKAMI-HARASAWA, L.; SHIMOKAWA, H.; NAKASHIMA, M.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **The Journal of clinical investigation**. v. 100(11), p. 2793-2799, 1997.

URAKAMI-HARASAWA, L.; SHIMOKAWA, H.; NAKASHIMA, M.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in

human arteries. **The journal of clinical investigation.** v. 100(11), p. 2793-2799, 1997.

VANE, J. R.; ANGGSRD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **The New England Journal of Medicine.** v. 323, p. 27-36, 1990.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal.** v. 73(4), p. 595-601, 2009.

VASSALLO, D.V.; MOREIRA, C.M.; OLIVEIRA, E.M.; BERTOLLO, D.M.; VELOSO, T.C. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v. 156, p. 113-118, 1999.

VASSALLO, D.V.; OLIVEIRA, E.M.; STEFANON, I. Contratilidade Miocárdica. In: Aires MM, Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p 435-469.3ª Ed.

VILA-PETROFF, M. G.; YOUNES, A.; EGAN, J.; LAKATTA, E. G.; SOLLOTT, S. J. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. **Circulation research.** v. 84, p. 1020-1031, 1999.

VIRTANEN, J.K.; VOUTILAINEN, S.; RISSANEN, T.H.; MURSU, J.; TUOMAINEN, T.P.; KORHONEN, M.J.; VALKONEN, V.P.; SEPPÄNEN, K.; LAUKKANEN, J.A.; SALONEN, J.T. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** v. 25, p. 228-233, 2005.

WAKITA, Y. Hypertension induced by methyl mercury in rats. **Toxicology and applied pharmacology.** v. 89(1), p.144-147, 1987.

WALDRON, G.J.; COLE, W.C. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. **Clinical and experimental pharmacology & physiology.** v. 26(2), p. 180-184, 1999.

WEI, Y.; WHALEY-CONNELL, A.T.; CHEN, K.; HABIBI, J.; UPTERGROVE, G.M.; CLARK, S.E.; STUMP, C.S.; FERRARIO, C.M.; SOWERS, J.R. NADPH

oxidase contributes to vascular inflammation, insulin resistance, and remodeling in the transgenic (mRen2) rat. **Hypertension**. v. 50(2), p. 384-391, 2007.

WEINSBERG, F.; BICKMEYER, U.; WIEGAND, H. Effects of inorganic mercury (Hg²⁺) on calcium channel currents and catecholamine release from bovine chromaffin cells. **Archives of toxicology**. v. 69(3), p.191-196, 1995.

WIGGERS, G.A. Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos. TESE DE DOUTORADO, Vitória, 2009.

WIGGERS^a, G.A.; STEFANON, I.; PADILHA, A.S.; PEÇANHA, F.M.; VASSALLO, D.V.; OLIVEIRA, E.M. Low nanomolar concentration of Mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 147, p. 252-260, 2008.

WIGGERS^b, G.A.; PECANHA, F.M.; BRIONES, A.M.; PEREZ-GIRON, J.V.; MIGUEL, M.; VASSALLO, D.V.; CACHOFEIRO, V.; ALONSO, M.J.; SALAICES, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. v. 295, p. 1033-1043, 2008.

WOLF, M.B.; BAYNES, J.W. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. **Biometals**. v. 20(1), p. 73-81, 2007.

WOOLFSON, R.G.; POSTON, L. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxation of human subcutaneous resistance arteries. **Clinical Science**. v. 79(3), p. 273-278, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Air Quality Guidelines for Europe. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for Drinking-water quality 3rd edition. Geneva, World Health Organization. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDWQ2004web.pdf, 2004

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). PREVENTING DISEASE THROUGH HEALTHY ENVIRONMENTS EXPOSURE TO MERCURY: A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN, 1990.

WU, K. K.; THIAGARAHAN, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. **Annual Review of Medicine**. v. 47, p. 315-331, 1996.

XU, S.; TOUYZ, R.M. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. **The Canadian journal of cardiology**. v. 22(11), p. 947-51, 2006.

YANAGISAWA, H.; NODERA, M.; SATO, M.; MORIDAIIRA, K.; SATO, G.; WADA, O. Decreased expression of brain nitric oxide synthase in macula densa cells and glomerular epithelial cells of rats with mercury chloride-induced acute renal failure. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 184(3), p. 165-171, 2002.

YASUTAKE, A.; HIRAYAMA, K.; INOUE, M. Mechanism of urinary excretion of methylmercury in mice. **Archives of toxicology**. v. 63(6), p. 479-483, 1989.

YOSHIZAWA, K.; RIMM, E.B.; MORRIS, J.S.; SPATE, V.L.; HSIEH, C.C.; SPIEGELMAN, D.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. **The New England journal of medicine**. v. 28, p. 347(22), p. 1755-1760, 2002.

ZALUPS, R.K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacology Review**. v. 52, p. 113-143, 2000.

ZAVARIZ, C.; GLINA, D.M.R. Avaliação clínico-neuro-psicológica de trabalhadores expostos a mercúrio metálico em indústria de lâmpadas elétricas. **Revista de Saúde Pública**. v. 26, p. 356-365, 1992.

ZYGMUNT, P.M.; GRUNDEMAR, L.; HÖGESTÄTT, E.D. Endothelium-dependent relaxation resistant to N omega-nitro-L-arginine in the rat hepatic artery and aorta. **Acta physiologica Scandinavia**. v. 152(1), p. 107-114, 1994.

ANEXOS

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I



DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01203.x
www.bjpparmacol.org

RESEARCH PAPER

Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species

Lorena B Furieri^{1,2}, María Galán¹, María S Avendaño¹, Ana B García-Redondo¹, Andrea Aguado¹, Sonia Martínez¹, Victoria Cachofeiro³, M Visitación Bartolomé³, María J Alonso⁴, Dalton V Vassallo² and Mercedes Salaices¹

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain, ²Department of Physiological Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil, ³Department of Physiology, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, and ⁴Department of Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain

BACKGROUND AND PURPOSE

Exposure to mercury is known to increase cardiovascular risk but the underlying mechanisms are not well explored. We analysed whether chronic exposure to low mercury doses affects endothelial modulation of the coronary circulation.

EXPERIMENTAL APPROACH

Left coronary arteries and hearts from Wistar rats treated with either HgCl₂ (first dose 4.6 µg·kg⁻¹, subsequent doses 0.07 µg·kg⁻¹ day⁻¹, 30 days) or vehicle were used. Endothelial cells from pig coronary arteries incubated with HgCl₂ were also used.

KEY RESULTS

Mercury treatment increased 5-HT-induced vasoconstriction but reduced acetylcholine-induced vasodilatation. It also reduced nitric oxide (NO) production and the effects of NO synthase inhibition with L-NAME (100 µmol·L⁻¹) on 5-HT and acetylcholine responses. Superoxide anion production and mRNA levels of NOX-1 and NOX-4 were all increased. The superoxide anion scavenger tiron (1 mmol·L⁻¹) reduced 5-HT responses and increased acetylcholine responses only in vessels from mercury-treated rats. In isolated hearts from mercury-treated rats, coronary perfusion and diastolic pressure were unchanged, but developed isovolumetric systolic pressure was reduced. In these hearts, L-NAME increased coronary perfusion pressure and diastolic pressure while it further reduced developed systolic pressure.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Chronic exposure to low doses of mercury promotes endothelial dysfunction of coronary arteries, as shown by decreased NO bioavailability induced by increased oxidative stress. These effects on coronary function increase resistance to flow, which under overload conditions might cause ventricular contraction and relaxation impairment. These findings provide further evidence that mercury, even at low doses, could be an environmental risk factor for cardiovascular disease.

Abbreviations

CPP, coronary perfusion pressure; DEA-NO, diethylamine NONOate; DHE, dihydroethidium; FITC, fluorescein isothiocyanate; KHS, Krebs–Henseleit solution; L-NAME, N-nitro-L-arginine methyl ester; LVISP, left ventricle isovolumetric systolic pressure; NOS, nitric oxide synthase; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TEA, tetraethylammonium

Correspondence

Dr Mercedes Salaices,
Departamento de Farmacología,
Universidad Autónoma de
Madrid, Arzobispo Morcillo 4,
28029 Madrid, Spain. E-mail:
mercedes.salaices@uam.es

Keywords

mercury; oxidative stress;
coronary arteries; endothelial
dysfunction

Received

18 May 2010

Revised

11 November 2010

Accepted

3 December 2010

Introduction

Mercury is a toxic metal considered to be a hazard, and exposure to mercury might produce toxicological consequences (ATSDR, 1997; Guzzi & La Porta, 2008). Recent reports have shown that human exposure to environmental contamination, including mercury, seems to be more common than otherwise expected. Professional exposure to mercury vapour (Langworth *et al.*, 1997; Sandborgh-Englund *et al.*, 1998), mercury release from or during removal of amalgam fillings (Hahn *et al.*, 1990; Björkman *et al.*, 1997; Halbach *et al.*, 1998) and ingestion of contaminated fish (Salonen *et al.*, 1995), among several other causes, increase its concentration in blood. In the last 10 years, several reports have focused more attention on the toxic effects of mercury in the cardiovascular system and its association with hypertension, carotid atherosclerosis, myocardial infarction and coronary heart disease (Salonen *et al.*, 2000; Virtanen *et al.*, 2005; Houston, 2007).

Endothelial integrity is crucial for the maintenance of blood flow and anti-thrombotic capacity. These effects involve the release of humoral factors that control relaxation and contraction, thrombogenesis and fibrinogenesis and platelet activation and inhibition. Several studies have revealed that mercury generates oxygen radicals (Houston, 2007). Although the exact mechanisms of free radical generation are not yet completely understood, it has been hypothesized that depletion of reduced glutathione (GSH) by mercury may trigger the production of reactive oxygen species (ROS). Vascular endothelium is highly sensitive to oxidative stress and this stress is the main cause of the endothelial dysfunction observed in cardiovascular diseases such as hypertension and atherosclerosis (Paravicini and Touyz, 2008). Recently, we have demonstrated that chronic administration of low doses of mercury induced endothelial dysfunction in rat aorta and mesenteric resistance arteries as a result of decreased nitric oxide (NO) bioavailability, which in turn is caused by higher NADPH oxidase-derived O_2^- production (Wiggers *et al.*, 2008). The importance of endothelial NO in the control of both vascular tone in large epicardial coronary arteries and the coronary microcirculation is well known. Previous reports show that the regulatory function of endothelium in coronary vessels is altered by cardiovascular risk factors or disorders such as hypercholesterolaemia, chronic smoking, hypertension and chronic heart failure (Drexler and Hornig, 1999; Osto *et al.*, 2007).

The purpose of the present study was to investigate whether chronic exposure to low doses of mercury, approximating those found in the blood of exposed humans (Gupta *et al.*, 1996; Langworth *et al.*, 1997), affects endothelial modulation of the coronary circulation. We therefore studied the effect of such mercury exposure on: (i) vasoconstrictor and endothelium-dependent vasodilator responses of coronary arteries; (ii) vascular NO and ROS production and its participation in these vascular responses; (iii) coronary circulation and cardiac function of isolated perfused hearts; and (iv) the structure of coronary arteries. Our observations provide, for the first time, evidence that mercury causes endothelial dysfunction in coronary arteries mainly due to reduction of NO bioavailability and increased oxidative

stress. This reduction could have important consequences for cardiac function.

Methods

Animals

All animal care and experimental procedures complied with current Spanish and European laws (RD 233/88 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación and 609/86). Three-month-old male normotensive Wistar rats (280–300 g, $n = 38$) were obtained from colonies maintained at the Animal Quarters of the Universidad Autónoma de Madrid. During treatment, rats were housed at a constant room temperature, humidity and light cycle (12:12 h light-dark). Rats had free access to tap water and were fed with standard chow *ad libitum*. Rats were divided into two groups: control (vehicle – saline solution, i.m.) and rats treated with mercuric chloride ($HgCl_2$) for 30 days (first dose $4.6 \mu g \cdot kg^{-1}$, subsequent dose $0.07 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$, i.m. to cover daily loss). As previously reported, this treatment produces mercury concentrations of $8 \pm 0.6 \text{ ng} \cdot mL^{-1}$ in blood (Wiggers *et al.*, 2008).

Vascular reactivity measurements of coronary arteries

After 30 days of treatment with either $HgCl_2$ or vehicle, rats were killed by decapitation. Left coronary arteries were isolated, and segments, 2 mm in length, were mounted in a small vessel dual chamber myograph for measurement of isometric tension according to the method described by Mulvany and Halpern (1977). After a 30 min equilibration period in oxygenated Krebs–Henseleit solution (KHS, in $mmol \cdot L^{-1}$: 115 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 4.7 KCl, 1.2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 KH_2PO_4 , 11.1 glucose and 0.01 Na_2EDTA) at $37^\circ C$ and pH 7.4, segments were stretched to their optimal lumen diameter for active tension development. Left coronary arteries were exposed to a high K^+ solution ($120 \text{ mmol} \cdot L^{-1} K^+$ -KHS, which was identical to KHS except that NaCl was replaced by KCl on an equimolar basis) in order to check their functional integrity. Concentration–response curves to acetylcholine (ACh) were then performed in arteries previously contracted with 5-HT at a concentration that produced approximately 50% of the contraction induced by K^+ -KHS in each case. After a washout period of 60 min, concentration–response curves to 5-HT were constructed. A single concentration-dependent curve to ACh and 5-HT was performed in each segment. A parallel study was done of the effects of the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, $100 \mu mol \cdot L^{-1}$), the ROS scavengers superoxide dismutase (SOD, $150 \text{ U} \cdot mL^{-1}$) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene-disulphonic acid (tiron, $1 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$), the COX inhibitor indomethacin ($10 \mu mol \cdot L^{-1}$) and the K_{Ca} channel blocker tetraethylammonium (TEA, $1 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$) by the addition of these to the medium 30 min prior to that of ACh or 5-HT.

In another set of experiments, concentration–response curves to diethylamine NONOate (DEA-NO) were performed in segments contracted with 5-HT at a concentration that produced approximately 50% of the contraction induced by K^+ -KHS in each case.

Endothelial cell culture

Left and right coronary arteries from 7- to 8-month-old pigs were obtained from the Experimental Surgery Service of Research Center of La Paz Hospital (Madrid, Spain). They were cleaned of myocardial and adipose tissues in Nutrient Mixture F-12-HAM containing antibiotics and fungicide to prevent contamination. Coronary arteries were opened along their long axes, and fragments 2–3 cm in length were placed on six multi-well plates luminal surface down with 0.2% collagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) in Nutrient Mixture F-12-HAM for 5 min at 37°C. The cells were then scraped off and cultured in Iscove-modified Dulbecco's culture medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) plus 20% fetal bovine serum (FBS, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) and antibiotics (penicillin 100 U·mL⁻¹, streptomycin 100 µg·mL⁻¹). Cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator and the medium was changed every 2–3 days. Confluent cell monolayers were harvested by a brief incubation with 0.1% trypsin (Biological Industries) and 0.1% EDTA and cells were resuspended in Iscove-modified Dulbecco's medium (Dufresne and Warocquier-Clérout, 2001). Endothelial cell phenotype was confirmed by the expression of the specific marker von Willebrand factor (antibody dilution 1:100, Dako, Glostrup, Denmark). An appropriate secondary antibody labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) was used (antibody dilution 1:200). The cells were examined with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse T300) and images were obtained with a digital spot camera (Diagnostic Instruments, Inc.).

Isolated heart preparation

As chronic treatment with HgCl₂ affected the reactivity of isolated coronary vessels, we performed experiments to determine whether mercury might be affecting coronary circulation of isolated perfused hearts. Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg·kg⁻¹, i.p.) and heparinized (40 U). After thoracotomy, the heart was removed and the ascending aorta was perfused with gassed (95% O₂ and 5% CO₂) KHS according to the Langendorff technique, under constant flow (10 mL·min⁻¹), at 37°C. The right atrium was removed in order to take out the sinoatrial pacemaker. The heart was then stimulated with a fixed rate of 200 bpm through two platinum electrodes. The left atrium was opened to introduce a soft distensible balloon mounted at the tip of a rigid plastic tube into the left ventricular cavity through the atrioventricular valve. To avoid liquid accumulation in the ventricular cavity, the ventricle was perforated with a puncture needle. The balloon was connected to a pressure transducer (TSD 104A- Biopac Systems, Inc; Goleta, CA, USA) and to a syringe so that the diastolic pressure of the left ventricle could be adjusted to predetermined values by injecting water into the balloon. Developed left ventricle isovolumetric systolic pressure (systolic pressure minus diastolic pressure – LVISP) was measured with a pressure amplifier (MP 100 Biopac) and recorded with a data acquisition system (Biopac MP100WSW, including a software Acqknowledge III). Coronary perfusion pressure (CPP) was also measured at the aortic cannula. As a constant flow was maintained, changes in the CPP represented changes in vascular resistance. Measurements were initiated after a stabilization period of 20 min.

The basic protocol was performed at a constant initial diastolic pressure of 5 mmHg by adjusting balloon volume. A constant balloon volume maintained throughout the experiments permitted measurements of diastolic and systolic pressure changes. LVISP and CPP were recorded for 60 min under control conditions and after treatment with 100 µmol·L⁻¹ L-NAME.

Nitric oxide release

Nitric oxide release was measured as previously described (Martín *et al.*, 2005). The septal coronary artery was dissected and equilibrated for 60 min in HEPES buffer (in mmol·L⁻¹: 119 NaCl; 20 HEPES; 1.2 CaCl₂; 4.6 KCl; 1 MgSO₄; 0.4 KH₂PO₄; 5 NaHCO₃; 5.5 glucose; 0.15 NaH₂PO₄; pH 7.4) at 37°C; arteries were then incubated with the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein (2 µmol·L⁻¹) for 1 h and the medium was collected to measure basal NO release. 5-HT (1 µmol·L⁻¹) and ACh (10 µmol·L⁻¹) was applied and the medium collected to measure stimulated NO production. The fluorescence of the medium was measured at room temperature using a spectrofluorometer (LS50 Perkin Elmer instruments, FL WINLAB Software) with excitation wavelength set at 492 nm and emission wavelength at 515 nm. Blank measurement samples were similarly collected but without arteries to subtract background emission. The amount of NO released was expressed as arbitrary units·mg⁻¹ tissue.

Nitrite assay

Endothelial cells were plated into six-well plates, cultured until confluence and then incubated 24 h before HgCl₂ treatment in Iscove-modified Dulbecco's culture medium plus 5% FBS and antibiotics. Cells were then exposed to 0.05, 0.5 and 5 µg·mL⁻¹ HgCl₂ for 24 h. Apocynin (300 µmol·L⁻¹) and tiron (1 mmol·L⁻¹) were applied 30 min before exposure to 5 µg·mL⁻¹ HgCl₂. Finally, treated cells were incubated for 30 min with bradykinin (1 µmol·L⁻¹) before collecting supernatants, and cells were washed and scraped in RIPA buffer. NO production was determined by measuring nitrite contents of 225 µL of each well with 75 µL of Griess reagent. Absorbance was measured and nitrite concentration was determined by interpolation of a calibration curve of standard sodium nitrite concentrations against absorbance. Nitrite levels were corrected by protein concentration measured by Lowry assay and using BSA as a standard; data are shown as µg·mg⁻¹ protein.

ROS production

Lucigenin chemiluminescence. Superoxide anion (O₂⁻) levels were measured in septal coronary arteries using lucigenin chemiluminescence, as previously described (Martín *et al.*, 2005). Briefly, arteries were equilibrated for 30 min in HEPES buffer at 37°C, transferred to test tubes containing 1 mL HEPES buffer (pH = 7.4) with lucigenin (250 mmol·L⁻¹) and then kept at 37°C. The luminometer was set to report arbitrary units of emitted light; repeated measurements were collected during 5 min at 10 s intervals and averaged. Tiron (1 mmol·L⁻¹), a cell permeant non-enzymatic scavenger of O₂⁻, was added to quench the O₂⁻-dependent chemiluminescence. Blank samples were similarly collected from medium without arteries in order to subtract background emission.



Detection of ROS by fluorescence microscopy. The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate O_2^- production *in situ* in endothelial cells. Hydroethidine freely permeates cells and is oxidized in the presence of O_2^- to ethidium bromide, which is trapped by intercalation with DNA. Ethidium bromide is excited at 546 nm and has an emission spectrum of 610 nm. Primarily isolated endothelial cells from passages 2 to 4 were used. Cells were incubated 24 h before $HgCl_2$ treatment in Iscove-modified Dulbecco's culture medium plus 5% FBS and antibiotics; they were then exposed to 0.05, 0.5 and 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ $HgCl_2$ for 24 h. Tempol (10 $\mu mol \cdot L^{-1}$), apocynin (300 $\mu mol \cdot L^{-1}$), tiron (1 $mmol \cdot L^{-1}$) and L-NAME (10 $\mu mol \cdot L^{-1}$) were applied 30 min before exposure to 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ $HgCl_2$. Images were acquired with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse T300), captured using a digital spot camera (Diagnostic) and processed using Meta-morph 7.1.0.0.

Western blot analysis

eNOS protein expression was evaluated in primarily isolated endothelial cells from passages 2 to 4 after exposure to different concentrations of $HgCl_2$. Cells were seeded and grown for 48 h and then incubated prior to treatment with $HgCl_2$ in Iscove-modified Dulbecco's culture medium with 5% FBS and antibiotics. Cells were then exposed to 0.05 and 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of $HgCl_2$ for 24 h and non-treated cells were used as control. After treatment, cells were washed in ice-cold PBS buffer and whole-cell lysates were prepared in RIPA buffer containing a protease inhibitor cocktail (Complete C, Roche, Barcelona, Spain). 40 μg of total protein from each sample was separated in a 7.5% SDS-PAGE and transferred to polyvinyl difluoride membranes (Amersham International plc, Little Chalfont, UK) that were incubated with a mouse monoclonal antibody against eNOS (1:1000, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After washing, membranes were incubated with anti-mouse (1:5000, StressGen, Ann Arbor, MI, USA) immunoglobulin antibody conjugated to horseradish peroxidase followed by several washes. Immunocomplexes were detected using an enhanced horseradish peroxidase/luminal chemiluminescence system (ECL Plus, Amersham International plc) and after exposure to X-ray AX film (Konica Minolta). Signals on the immunoblot were quantified with a National Institutes of Health Image V1.56 computer program. The same membrane was used to determine β -actin expression using a mouse monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:200 000, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA).

RT-PCR real-time assay

NOX-1, NOX-4, SOD-1 and SOD-2 mRNA levels were determined in coronary segments from control and mercury-treated rats. Total RNA was obtained using Tri Reagent (Sigma Chemical Co). A total of 1 μg of DNase I-treated RNA was reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with random hexamers in a 10 μL reaction. PCR was performed in duplicate for each sample using 1 μL of cDNA as a template, 1 \times of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 10 \times of Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) in a 20 μL reaction. Assays-on-Demand (Applied Biosystems) of TaqMan fluorescent real-time PCR primers and

probes were used for NOX-1 (Rn 00586652_m1), NOX-4 (Rn 00585380_m1), SOD-1 (Rn00566938_m1), SOD-2 (Rn00566942_g1) and 18S rRNA (4319413E), which was used as endogenous control to normalize results. Quantitative RT-PCR was carried out in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the following conditions: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Relative NOX-1, NOX-4, SOD-1 and SOD-2 levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Results are expressed as the relative expression of mRNA in mercury-treated compared with untreated rats.

Morphometry of coronary vessels

A total of eight animals from each group were analysed. Ventricular tissue was fixed in 4% sodium-buffered formaldehyde. The samples were then dehydrated and embedded in paraffin. Serial sections (4 μm) were stained with Masson's trichrome. A total of 48 intramyocardial small vessels (three vessels per rat) were observed and individually analysed using a high-resolution monochromatic photcamera CCD (Sony XC-75CE) attached to a photomicroscope (Leica DMRB). The morphometric analyses were performed using an Image System Analysis (Leica Q500MC) with 8 bits of images in grey gradation (256 levels of grey: 0 representing black as blank and 255 colours). The binary edition was used to remove artefacts that did not correspond to stained coronary vessel area. Analyses were performed with 40 \times lenses in which the vessels were clearly distinguished. The same illumination conditions were used for all measurements. Calibration of the system was carried out using a stage micrometer (Leitz) that allowed computation of the object area in units of μm^2 . Media area was obtained by subtracting the lumen area from the area encompassed by the external elastic lamina. A single researcher unaware of the experimental groups performed the analysis.

Data analysis and statistics

Vasoconstrictor responses induced by 5-HT were expressed as percentages of tension generated by 120 $mmol \cdot L^{-1}$ KCl (control, 2.1 ± 0.15 $mN \cdot mm^{-1}$, $n = 19$; $HgCl_2$, 1.99 ± 0.16 $mN \cdot mm^{-1}$, $n = 19$; $P > 0.05$). Vasodilator responses are expressed as percentage of previous contraction. To compare the effect of drugs on response to 5-HT in coronary segments from both treatments, some results were expressed as differences of area under the concentration–response curves (dAUC) in control and experimental situations. AUCs were calculated from individual concentration–response curve plots; the differences were expressed as percentage of AUC of the control situation.

All values are expressed as mean \pm SEM of the number of animals used in each experiment, or independent experiment in the case of cell cultures. Results were analysed using either Student's *t*-test, completely randomized two-way ANOVA for comparison between groups, repeated-measure two-way ANOVA for comparing treatments within the same group or the Mann–Whitney non-parametric test. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's *post hoc* test was used to compare individual means. Differences were considered statistically significant at P -values < 0.05 .

Materials

L-NAME, ACh, apocynin, 5-HT, EDTA, FITC, HEPES, DAF, DEANO, lucigenin, SOD, Nutrient Mixture F-12-HAM, tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl), indomethacin, TEA and tiron were obtained from Sigma Chemical Co. DHE, streptomycin and penicillin were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All drugs were dissolved in distilled water except tiron and lucigenin, which were dissolved in Krebs-HEPES, and indomethacin, which was dissolved in 1.5 mmol·L⁻¹ NaHCO₃. Nomenclature of channels, receptors and ligands follows Alexander *et al.* (2009).

Results

As previously described (Wiggers *et al.*, 2008), rats exposed to 30 day HgCl₂ treatment had similar body weight [control: before 293 ± 6.2 g and after 375 ± 8.9 g (*n* = 16); Hg-treated: before 287 ± 4.8 g and after 366 ± 6.1 g (*n* = 22) *P* > 0.05]. Systolic blood pressure also remained unchanged by treatment (control: 129 ± 10.4 mmHg, *n* = 6; Hg-treated: 128 ± 9.3 mmHg, *n* = 6, *P* > 0.05).

Effect of mercury treatment on vasoconstrictor and vasodilator responses of coronary arteries

Mercury treatment increased vasoconstrictor responses of coronary arteries to 5-HT (10 nmol·L⁻¹–100 μmol·L⁻¹) and decreased endothelium-dependent responses induced by ACh (1 nmol·L⁻¹–10 μmol·L⁻¹) (Figure 1). However, the vasodilator response induced by the NO donor DEA-NO (1 nmol·L⁻¹–10 μmol·L⁻¹) was unaffected by mercury treatment (Figure 1). This result suggests that mercury treatment induces endothelial dysfunction in coronary arteries.

Effect of mercury treatment on NO and ROS production and its participation in vascular responses

In order to evaluate if mercury treatment alters NO modulation of coronary responses, the effect of the NOS inhibitor L-NAME on vasoconstrictor and vasodilator responses was investigated. Figure 2A shows that the negative modulation

by NO of 5-HT responses was reduced in segments of coronary arteries from rats treated with mercury. Thus, L-NAME (100 μmol·L⁻¹) shifted the concentration–response curve to 5-HT to the left, in segments from either group, but this effect was smaller in preparations from mercury-treated than in those from control rats, as shown by dAUC values (Figure 2A, insert). The participation of NO in relaxation induced by ACh was also reduced in coronary arteries from mercury-treated rats, as shown by the reduced inhibitory effect of L-NAME (Figure 2B). These findings suggest that NO production or bioavailability could be reduced after mercury treatment. In agreement, NO release was reduced in arteries from mercury-treated rats both in basal and after 5-HT and ACh stimulation (Figure 2C). On the other hand, endothelial cells exposed to HgCl₂ shows reduced nitrite production, which was restored by both apocynin (300 μmol·L⁻¹) and tiron (1 mmol·L⁻¹) (Figure 2D). However, eNOS expression did not change (or even increased) in endothelial cells exposed to 0.05 or 5 μg·mL⁻¹ HgCl₂ respectively (Figure 2E).

The participation of ROS in vascular responses was evaluated using the superoxide anion scavengers, tiron and SOD. Tiron (1 mmol·L⁻¹) did not modify 5-HT responses in coronary arteries from the control group but reduced the increased reactivity to 5-HT produced by mercury treatment (Figure 3A). Similarly, tiron did not affect endothelium-dependent ACh-induced relaxation in arteries from control rats but improved impaired vasodilator response observed in segments from mercury-treated rats (Figure 3B). The effect of SOD (150 U·mL⁻¹) on 5-HT contraction was similar to that found for tiron; however, SOD did not affect ACh-induced relaxation in any group (results not shown).

To evaluate if mercury treatment alters the vascular production of ROS we measured their levels in endothelial cells from coronary arteries exposed to different concentrations of HgCl₂ and in coronary arteries from control and mercury-treated rats. Cultured endothelial cells exposed for 24 h to increasing HgCl₂ concentrations (0.05, 0.5 and 5 μg·mL⁻¹) display a progressive increase of superoxide production (Figure 4A). This increased production was diminished by the SOD mimetic tempol (1 mmol·L⁻¹), the NADPH oxidase inhibitor apocynin (300 μmol·L⁻¹), tiron (1 mmol·L⁻¹) and L-NAME (100 μmol·L⁻¹) (Figure 4B). In coronary arteries from mercury-treated rats, basal O₂⁻ production was greater than

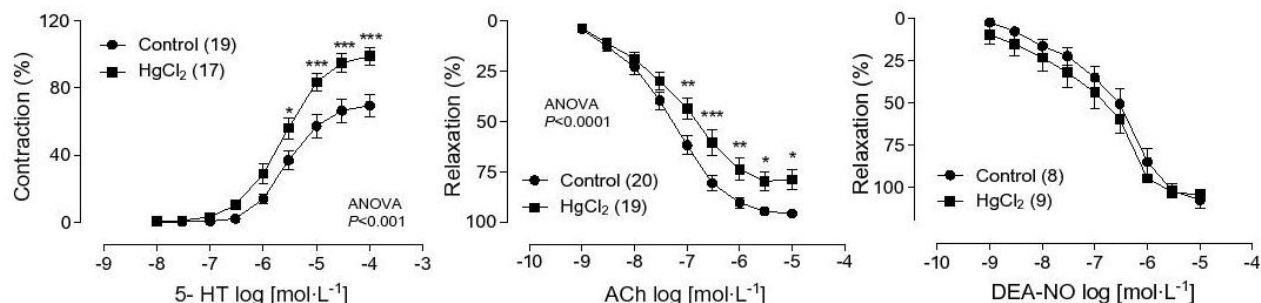
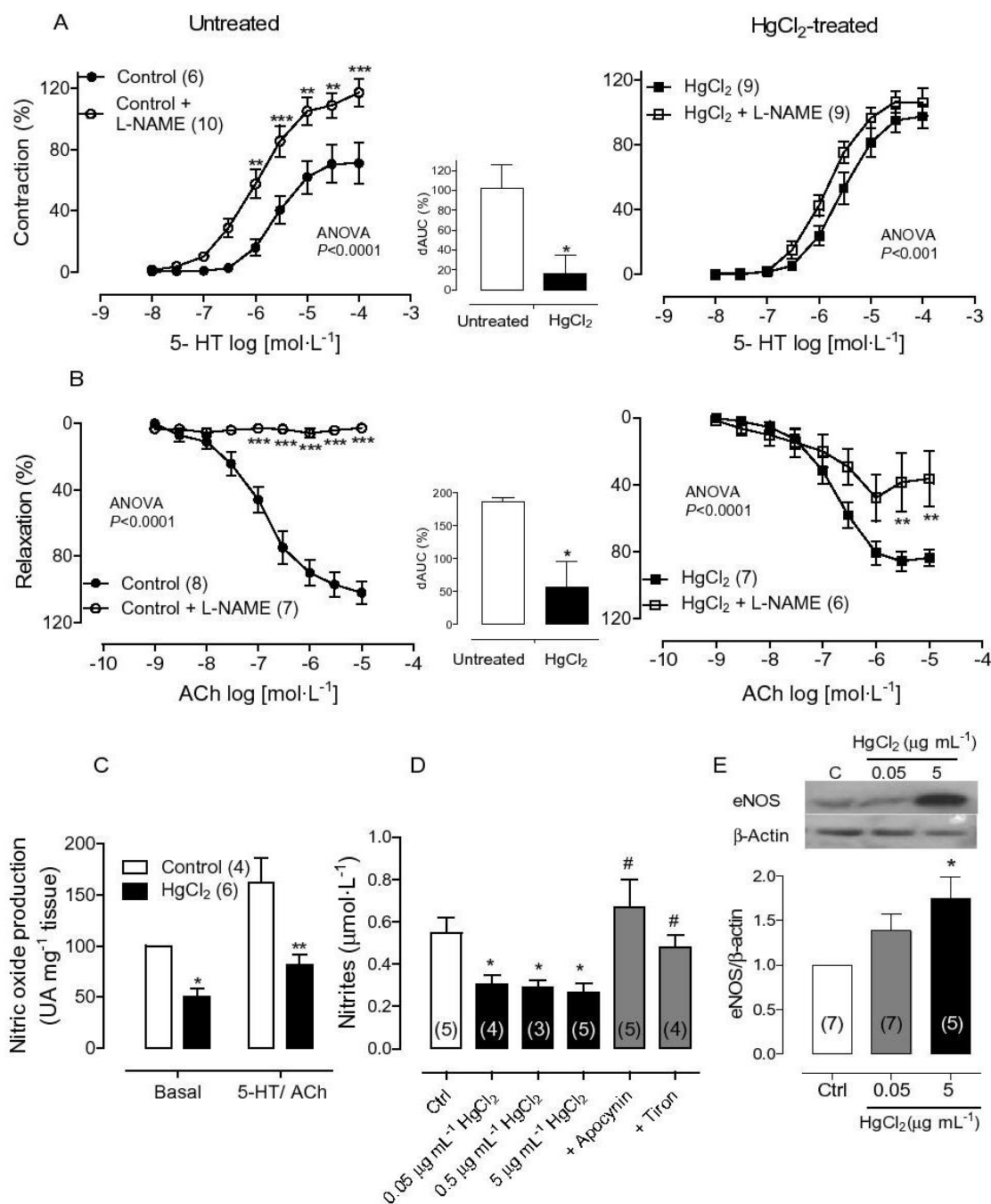


Figure 1

Concentration–response curves to 5-HT, acetylcholine (ACh) and diethylamine (DEA)-NONOate (NO) in left coronary arteries from control and HgCl₂-treated rats. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 versus control. Number of animals used is indicated in parentheses.

**Figure 2**

Effect of chronic treatment with mercury chloride (HgCl₂) on the modulation of vascular response by NO in coronary arteries. (A) Effect of L-NAME (100 μmol·L⁻¹) on the vasoconstrictor responses to 5-HT in left coronary arteries from untreated and HgCl₂-treated rats. (B) Effect of L-NAME on the vasodilator responses to ACh in untreated and HgCl₂-treated rats. The insert graphs show differences in area under the concentration–response curve (dAUC) in the presence and absence of L-NAME. (C) Vascular production of NO in septal coronary arteries from control and HgCl₂-treated rats. (D) Effect of apocynin (300 μmol·L⁻¹) and tiron (1 mmol·L⁻¹) on nitrite production in endothelial cells exposed to 5 μg·mL⁻¹ HgCl₂; the effect of 0.05 and 0.5 μg·mL⁻¹ HgCl₂ is also shown. (E) Representative blot and densitometric analysis showing eNOS protein expression normalized with β-actin expression in endothelial cells exposed to HgCl₂ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus the corresponding control situation; # $P < 0.05$ versus HgCl₂. Number of animals used is indicated in parentheses. Ctrl: control.

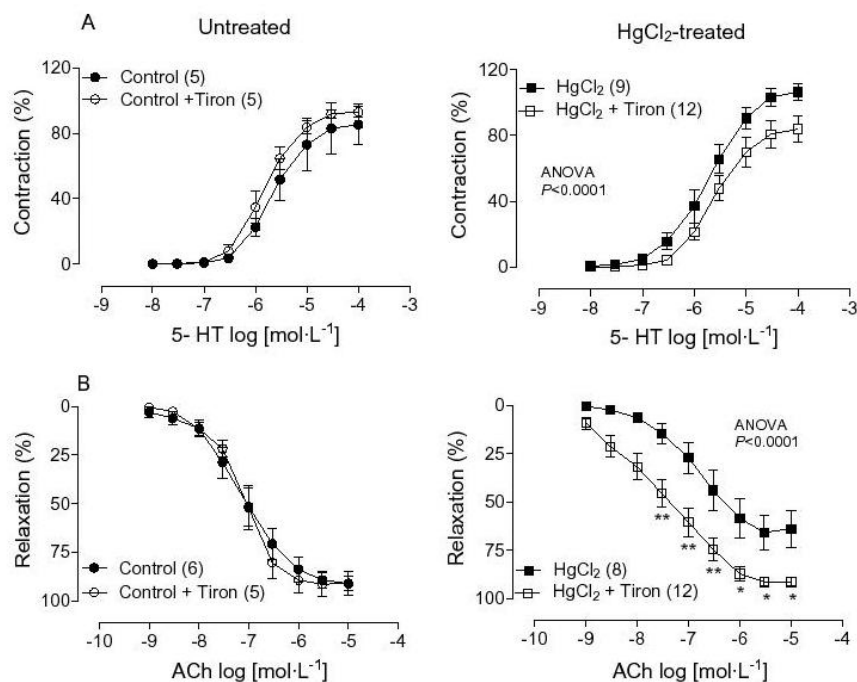


Figure 3

Effects of chronic treatment with HgCl_2 on the participation of reactive oxygen species (ROS) in vascular responses in coronary arteries. Effect of tiron ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the vasoconstrictor responses to 5-HT (A) and the vasodilator responses to ACh (B) in left coronary arteries from untreated and HgCl_2 -treated rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus the corresponding control situation. Number of animals used is indicated in parentheses.

in arteries from controls (Figure 4C). Mercury treatment also increased mRNA levels of the NADPH oxidase subunits NOX-1 and NOX-4 (Figure 4D) and of SOD-2 (Figure 4E) in these arteries; however, mRNA levels of SOD-1 were not significantly affected by mercury treatment.

Participation of prostanoids and K_{Ca} channels on vascular responses: effect of mercury treatment

To evaluate if mercury treatment alters the participation of prostanoids on coronary responses, the COX inhibitor indomethacin ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was used. This drug did not change 5-HT or ACh responses in arteries from control rats. However, in arteries from mercury-treated rats, indomethacin reduced 5-HT contraction (Figure 5A) and potentiated ACh responses (E_{max} , HgCl_2 : $64.0 \pm 9.4 \%$, $n = 11$; HgCl_2 + indomethacin: $93.5 \pm 2.3 \%$, $n = 9$; $P < 0.05$).

In order to analyse the role of K_{Ca} channels on vascular responses, the effect of TEA was analysed. TEA ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) potentiated 5-HT responses in segments from both groups but this effect was smaller in preparations from mercury-treated than in control rats (Figure 5B). However, TEA did not change ACh response in coronary arteries from either group (results not shown).

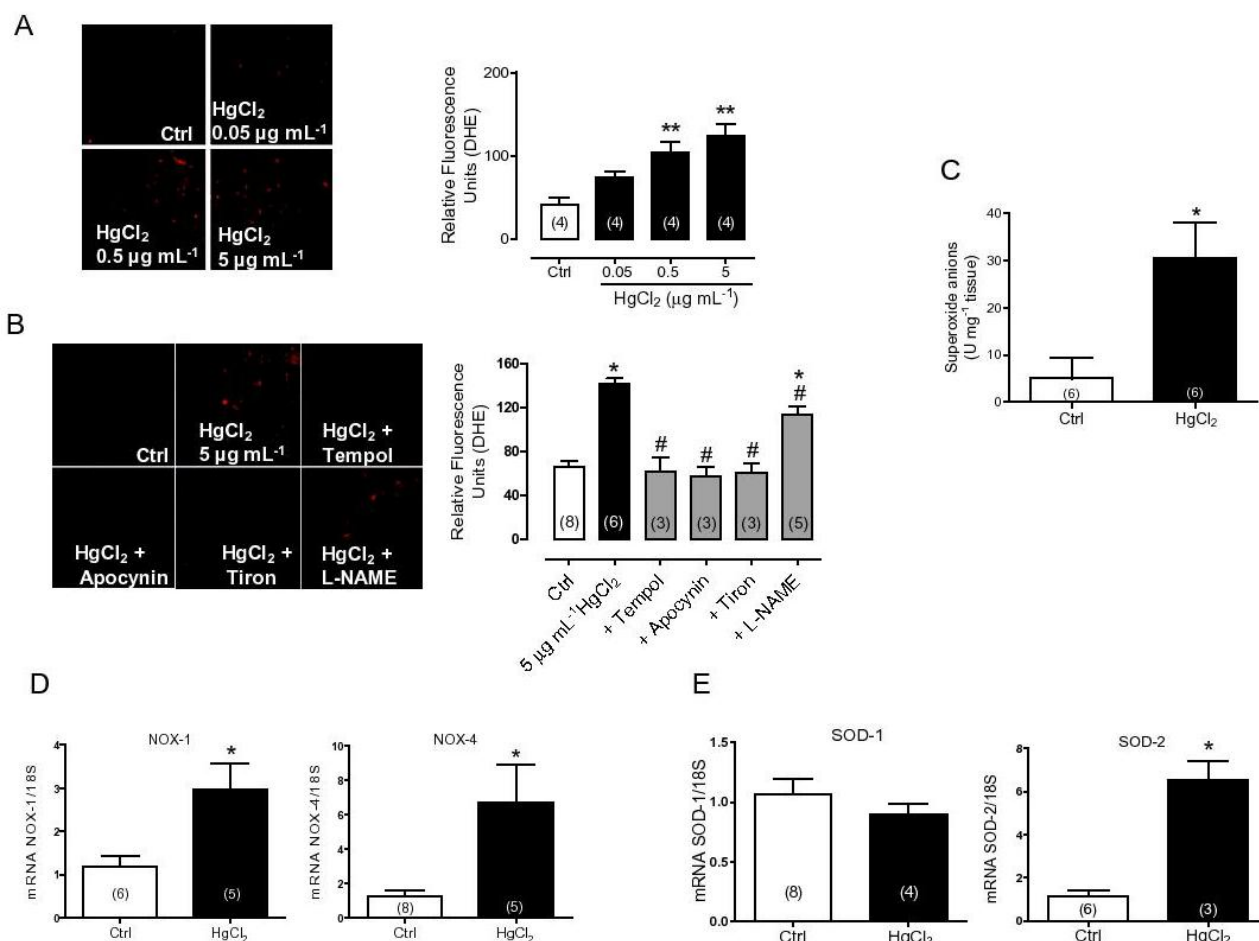
Effect of mercury treatment on coronary circulation of isolated perfused hearts

To investigate whether increased coronary reactivity could affect heart function, isolated hearts, perfused according to

the Langendorff technique, were used. Isolated hearts were used to avoid nervous or humoral mechanisms that could blunt or mask the effects of chronic Hg treatment. Figure 6A shows that at 5 mmHg of diastolic pressure, developed left ventricle isovolumetric systolic pressure (LVISP) was reduced in the Hg-treated group. When L-NAME was used, LVISP was further reduced in the Hg-treated group. CPP was also measured (Figure 6B); in hearts from Hg-treated rats, CPP was similar to controls. However, CPP increased after L-NAME treatment, and this increase was greater in the Hg-treated group. Developed left ventricle isovolumetric diastolic pressure (LVIDP) was similar in both control and HgCl_2 -treated rats (Figure 6C). When using L-NAME, LVIDP increased only in HgCl_2 -treated rats (Figure 6C). This increment is parallel to the reduction of coronary blood flow and the developed systolic pressure, which normally reduces coronary blood flow by reducing metabolic needs.

Effect of mercury treatment on coronary morphology

To analyse putative actions of mercury treatment on intramyocardial vessel morphology, morphometric measurements of total, luminal and media areas were performed. Results and representative photomicrographs are presented in Figure 7. The morphometric analysis demonstrated that although no differences in media area were observed between both groups, vessel and luminal areas were reduced in mercury-treated rats as compared with controls. This pattern was maintained even after correcting the data (data not

**Figure 4**

Effects of HgCl₂ on vascular superoxide anion production. (A) Images and quantification of superoxide anion production measured by fluorescence microscopy in untreated (Ctrl) and HgCl₂-treated endothelial cells from porcine coronary arteries. (B) Images and quantification of production of superoxide anion measured by fluorescence microscopy in endothelial cells exposed to HgCl₂ (5 µg mL⁻¹) in the absence or the presence of tempol (1 mmol L⁻¹), apocynin (0.3 mmol L⁻¹), tiron (1 mmol L⁻¹) or L-NAME (100 µmol L⁻¹). (C) Vascular production of superoxide anion, measured by lucigenin chemiluminescence, in septal coronary arteries from control and HgCl₂-treated rats. Quantitative RT-PCR assessment of (D) NOX-1 and NOX-4 and (E) SOD-1 and SOD-2 mRNA levels in coronary arteries from control and HgCl₂-treated rats; results are expressed as the relative expression of mRNA compared with control. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus Ctrl, #*P* < 0.05 versus HgCl₂. Number of animals used or independent experiment in the case of cell cultures is indicated in parentheses.

shown) with the following criteria. To determine luminal or vessel area, the cross-sectional area enclosed by internal or external elastic lamina, respectively, was corrected to a circle by applying the form factor $l^2/4\pi$ to the measurement of the lamina, where l is the length of the lamina. This method avoids miscalculations of areas caused by the eventual collapse of immersion-fixed arteries (de las Heras *et al.*, 1999).

Discussion

Results presented herein show for the first time that treatment with low doses of mercury for 30 days increased reactivity to 5-HT in isolated coronary arterial rings. Accordingly,

CPP in isolated hearts was also increased. The present study also demonstrates that chronic mercury treatment induced endothelial dysfunction in coronary arteries, probably due to a decreased NO bioavailability caused by increased endothelial superoxide production.

Cardiovascular risk factors or disorders such as hypercholesterolaemia, chronic smoking, hypertension or chronic heart failure alter the regulatory function of endothelium both in coronary and peripheral conduit and resistance vessels. In addition to these risk factors, attention has recently been given to toxic effects of mercury in the cardiovascular system (Evans and Weingarten, 1990; Salonen *et al.*, 1995; 2000; Virtanen *et al.*, 2005; Houston, 2007). Chronic exposure to mercury is reported to increase vascular resis-

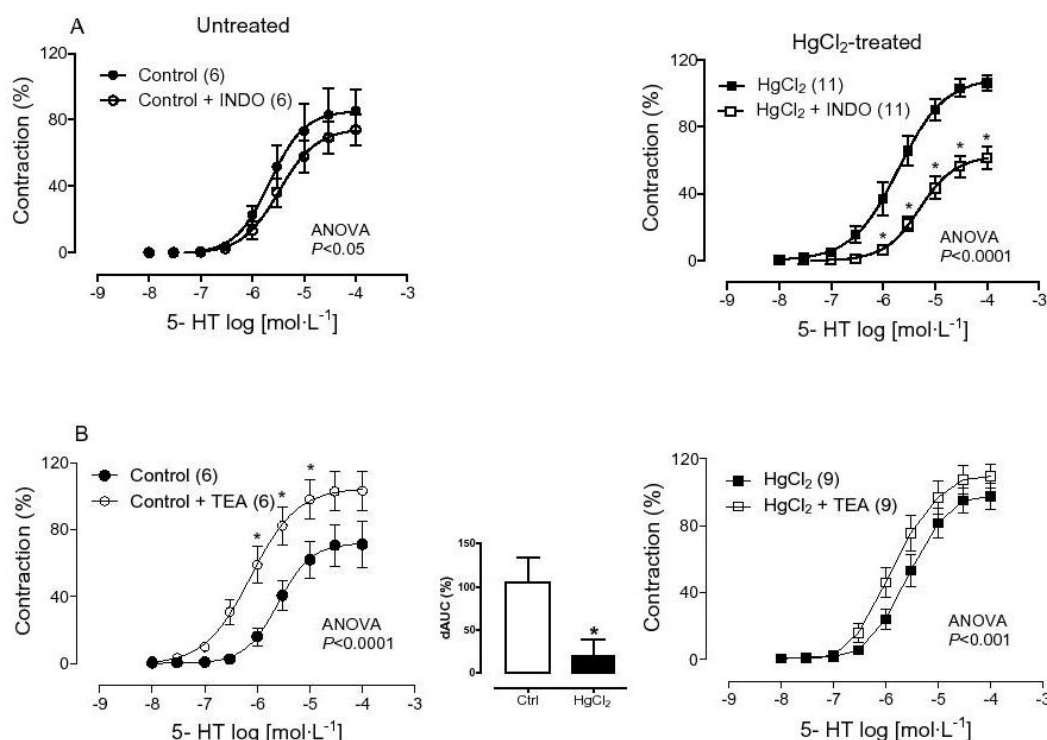


Figure 5

Effect of chronic treatment with HgCl₂ on the participation of prostanoids and K_{ca} channels in vascular responses in coronary arteries. Effect of indomethacin (10 μmol·L⁻¹) (A) and tetraethylammonium (TEA, 1 mol·L⁻¹) (B) on the vasoconstrictor responses to 5-HT in left coronary arteries from untreated and HgCl₂-treated rats. The inset graph shows differences in area under the concentration–response curve (dAUC) in the presence and absence of TEA. *P < 0.05 versus the corresponding control situation. Number of animals used is indicated in parentheses.

tance and to induce hypertension (Torres *et al.*, 2000; García Gómez *et al.*, 2007). On the other hand, a concentration-dependent cytotoxicity in endothelial cells, as well as a reduction in NOS activity, has been described after treatment with methyl mercury (Kishimoto *et al.*, 1995). Moreover, ROS accumulation induced by high concentrations of HgCl₂ also results in cytotoxicity of endothelial cell monolayers (Wolf and Baynes, 2007). Despite the number of studies showing that mercury increases vascular resistance and induces oxidative stress, as well as risk for cardiovascular diseases, the effect of *in vivo* chronic exposure to mercury on endothelial modulation of coronary vascular responses is unknown. We have recently described a model of chronic (30 day) exposure to low doses of HgCl₂ that did not induce changes in blood pressure, despite important endothelial dysfunction observed in both aorta and mesenteric resistance arteries (Wiggers *et al.*, 2008). The blood concentrations reached with this exposure, 8 ng·mL⁻¹, are similar to high blood levels frequently reported to be an environmental risk factor (Gupta *et al.*, 1996). In such conditions, coronary reactivity to 5-HT increased, whereas relaxation to acetylcholine was reduced; similar findings were reported for aorta and mesenteric resistance arteries (Wiggers *et al.*, 2008). It is well known that endothelial NO participates in the control of vascular tone in large epicardial coronary arteries and in the coronary microcirculation. In fact, changes observed in the reactivity of

coronary arteries after mercury treatment might be explained by a decreased modulation of such responses by endothelial NO, as suggested by the reduced effect of L-NAME on 5-HT and acetylcholine responses. It is established that EDHF induces hyperpolarization and vasodilatation through activation of K⁺ channels (Feletou and Vanhoutte, 1996). We found that the K_{ca} channel blocker TEA did not change ACh response; however, it potentiated 5-HT responses in segments from mercury-treated rats. These results suggest that HgCl₂ treatment reduces the involvement of one factor, which opens K_{ca} channels. Our group has recently described that mercury treatment increases the release of vasoconstrictor prostanoids and its participation in phenylephrine response in rat aorta (Peçanha *et al.*, 2010). Accordingly, indomethacin reduced 5-HT contraction and potentiated ACh responses, albeit only in segments from mercury-treated animals. Both mechanisms would also contribute to increased response to 5-HT found in coronary arteries from mercury-treated rats.

Reduction of endothelial NO-dependent modulation might be due to decreased production or increased NO metabolism. We observed that vascular NO release was diminished in coronary arteries from mercury-treated rats, as well as in endothelial cells from coronary arteries exposed to HgCl₂. A reduction in NO production and NOS activity has also been described in cultured human umbilical vascular

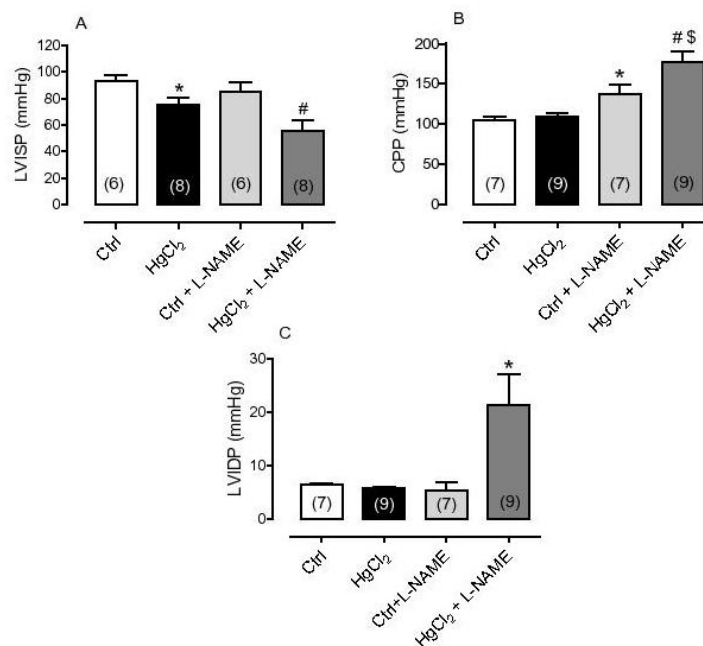


Figure 6

(A) Developed left ventricle isovolumetric systolic pressure (LVISP), (B) coronary perfusion pressure (CPP) and (C) left ventricle isovolumetric diastolic pressure (LVIDP) from control (Ctrl) and HgCl₂-treated rats before and after perfusion with L-NAME (100 μmol·L⁻¹) in isolated hearts. **P* < 0.05 versus Control, #*P* < 0.05 versus HgCl₂, \$*P* < 0.05 versus control + L-NAME. Number of animals used is indicated in parentheses.

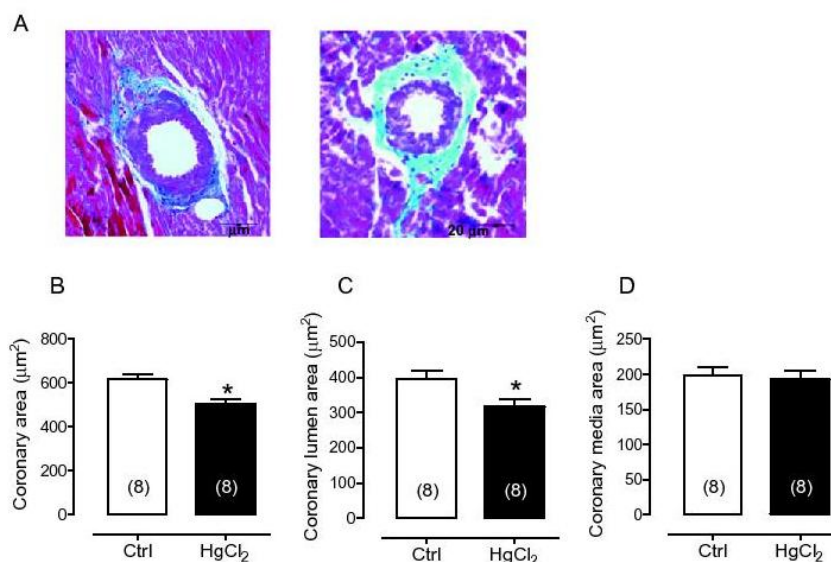


Figure 7

Morphometric analysis of coronary vessels of control and HgCl₂-treated rats. (A) Representative microphotographs (original magnification × 40) of cross sections of intramyocardial vessels from control (Ctrl; on left) and HgCl₂-treated rats (on right) stained with Masson's trichrome. (B) Total vessel area. (C) Vascular luminal area. (D) Vascular media area. **P* < 0.05. Number of animals used is indicated in parentheses.

endothelial cells exposed to methyl mercury (Kishimoto *et al.*, 1995). We have previously reported unchanged or even increased eNOS protein expression in aorta and mesenteric resistance arteries respectively (Wiggers *et al.*, 2008). In endothelial cells exposed to low concentration of mercury ($0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), no changes in eNOS expression was found; moreover, high concentrations ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) increased eNOS expression, thus excluding reduction in the expression of this enzyme as being responsible for the reduced NO production and endothelial dysfunction observed in coronary arteries after mercury treatment. However, we cannot discount a possible reduction in the activity of this isoform, or that uncoupled eNOS due to tetrahydrobiopterin (BH_4) deficiency might result in a switch from NO to O_2^- production (Förstermann and Münzel, 2006). In this sense, the inhibition of NOS slightly reduced the increased superoxide anion production observed in endothelial cells exposed to HgCl_2 . Alterations in the NO relaxation mechanism might also explain the inhibitory effect of mercury on endothelial function. As mercury treatment did not modify relaxation induced by the NO donor, DEA-NO, a direct effect of Hg on vascular smooth muscle cells is unlikely. These findings so far suggested that increased NO metabolism was the putative mechanism by which Hg treatment affected coronary reactivity.

Toxicity from mercury is associated with *in vivo* oxidative stress. Mercury exposure of animals or humans thus induces the generation of ROS with subsequent oxidative damage in several organs and systems, as well as altering the antioxidant defence system in cells (Miller and Woods, 1993; Huang *et al.*, 1996; Mahboob *et al.*, 2001; Reus *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). We have previously found that vascular O_2^- production, plasma malondialdehyde levels and total antioxidant status increased after mercury treatment in rats (Wiggers *et al.*, 2008). We likewise found an increased O_2^- production in coronary arteries from mercury-treated rats and in endothelial cells from porcine coronary arteries exposed to increasing concentrations of mercury for 24 h. This increased production was abolished by the superoxide anion scavengers, tiron and tempol, as well as by apocynin, suggesting that NADPH oxidase would be the source of increased superoxide production, although several authors have reported different actions of apocynin independently of its ability to inhibit NADPH oxidase (Heumüller *et al.*, 2008; Riganti *et al.*, 2008). In a previous study, we found that mercury treatment did not change NOX-1 mRNA levels in mesenteric resistance arteries from mercury-treated rats, although an increasing trend was found (Wiggers *et al.*, 2008). In coronary arteries, we have found that mercury treatment increased both NOX-1 and NOX-4 subunits, supporting the involvement of NADPH oxidase in the effect of mercury on oxidative stress. A decrease in antioxidant defences would also contribute to the increased superoxide production observed after mercury treatment. However, SOD-1 mRNA levels were similar in vessels from both groups, and SOD-2 mRNA levels even increased after mercury treatment. An increase in the total antioxidant status of plasma, as well as in aortic SOD-3 protein expression, after mercury exposure has been previously described (Wiggers *et al.*, 2008). It is therefore possible that antioxidant mechanisms might become activated in mercury-exposed rats, in order to protect cells against increased oxidative stress.

Free radicals are known to increase sensitivity to phenylephrine in other vessels (Hao *et al.*, 2006), and this might be due to the generation of peroxynitrite reducing NO bioavailability (Frisbee *et al.*, 2002). We found that tiron and apocynin increased nitrite levels reduced by HgCl_2 in endothelial cells, thus supporting the possibility that free radicals might promote reduction of NO bioavailability. In addition, both tiron and SOD reduced increased reactivity to 5-HT observed in coronary arteries from mercury-treated rats, with tiron also improving the impaired relaxation to ACh. These findings reinforce previous reports that show the relationship between the effects of mercury and free radical production.

Evidence in recent years has suggested that increased oxidative stress plays a pathophysiological role in cardiovascular diseases. In fact, ROS have been shown to play a critical role in remodelling in the heart and vasculature (Xu and Touyz, 2006; Wei *et al.*, 2007; Paravicini and Touyz, 2008). As an enhanced superoxide production after mercury treatment was confirmed, the possibility of changes in coronary morphology has been considered. We carried out *in vitro* morphometric analyses, which disclosed a reduction in total coronary area and luminal area. The wall area did not change after mercury treatment, suggesting eutrophic remodelling that allows small arteries to maintain high resistance to blood flow without activation (Mulvany, 2002). However, we cannot confirm whether the morphological changes described here are a consequence of functional changes.

Several reports have focused attention on the possible association between toxic effects of mercury and myocardial infarction and coronary heart disease (Salonen *et al.*, 2000; Virtanen *et al.*, 2005; Houston, 2007). Because HgCl_2 treatment affects coronary reactivity, we have performed experiments with isolated perfused hearts to determine whether the increased coronary reactivity could affect heart function. Indeed, hearts from mercury-treated rats in steady-state conditions had a lower systolic pressure development. Although mercury treatment did not change diastolic pressure and CPP, CPP increased more in the mercury-treated group when L-NAME was used. These results are in contrast to those found in isolated vessels. However, we have to consider that isolated coronary vessels could behave differently *in situ*. The isolated arteries we examined in the myograph are those arising from the aortic trunk and may behave as conductance vessels, different from those that determine coronary resistance. LVISP was further reduced in perfused heart in the HgCl_2 + L-NAME group suggesting that the residual NO activity, although diminished, was of greater importance for maintaining myocardial perfusion in mercury-exposed hearts than in normal hearts. The increased coronary vasoconstriction also induced an increase of diastolic pressure, which might be a consequence of reduced oxygen uptake, leading to calcium overload (Endoh, 2008).

In conclusion, we demonstrate for the first time that treatment with low doses of mercury altered coronary vascular reactivity, because of endothelial dysfunction. This might be attributable, at least in part, to reduction in NO bioavailability due to increased ROS production, probably as a result of increased NADPH oxidase activation. The present findings also show that chronic treatment with mercury has an important effect on coronary artery function, inducing an increased resistance to flow. Under normal load conditions, coronary



LB Furiéri et al.

resistance was just enough to allow adequate flow, even though NO production was reduced. However, coronary flow might be insufficient when the heart is under overload conditions, thereby causing myocardial contraction and relaxation impairment. Therefore, these observations also offer further evidence that chronic exposure to low concentrations of mercury is hazardous and can be considered an important risk factor for cardiovascular disease and development of cardiovascular events.

Acknowledgements

This study was supported by MCINN (SAF 2009-07201, PHB2005-0008-PC) and ISCIII (Red RECAVA, RDO6/0014/0011 and RDO6/0014/0007), Spain, and by grants from CAPES and CNPq/FAPES/FUNCITEC (39767531/07), Brazil. We thank Mariana Boechat de Abreu for her help with the endothelial cell cultures.

Conflicts of interest

None.

References

- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th edition. *Br J Pharmacol* 158 (Suppl. 1): S1–S254.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1997). National Alert. A warning about continuing patterns of metallic mercury exposure. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/alerts/970626.html>
- Björkman L, Sandborgh-Englund G, Ekstrand J (1997). Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. *Toxicol Appl Pharmacol* 144: 156–162.
- Chen C, Qu L, Li B, Xing L, Jia G, Wang T *et al.* (2005). Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin Chem* 51: 759–767.
- Drexler H, Hornig B (1999). Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 31: 51–60.
- Dufresne M, Warocquier-Clérout R (2001). Explants of porcine coronary artery in culture: a paradigm for studying the influence of heparin on vascular wall cell proliferation. *Cytotechnology* 37: 13–22.
- Endoh M (2008). Cardiac Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ sensitizers. *Circ J* 72: 1915–1925.
- Evans DH, Weingarten K (1990). The effect of cadmium and other metals on vascular smooth muscle of the dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Toxicology* 61: 275–281.
- Feletou M, Vanhoutte PM (1996). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 1082–1090.
- Förstermann U, Münzel T (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113: 1708–1714.
- Frisbee JC, Maier KG, Stepp DW (2002). Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2160–H2168.
- García Gómez M, Boffetta P, Caballero Klink JD, Español S, Gómez Quintana J (2007). Cardiovascular mortality in mercury miners. *Med Clin (Barc)* 128: 766–771.
- Gupta M, Bansal JK, Khanna CM (1996). Blood mercury in workers exposed to the preparation of mercury cadmium telluride layers on cadmium telluride base. *Ind Health* 34: 421–425.
- Guzzi G, La Porta CAM (2008). Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxicology* 244: 1–12.
- Hahn LJ, Kloiber R, Leininger RW, Vimy MJ, Lorscheider FL (1990). Whole-body imaging of the distribution of mercury released from dental fillings into monkey tissues. *FASEB J* 4: 3256–3260.
- Halbach S, Kremers L, Willruth H, Mehl A, Welz G, Wack FX *et al.* (1998). Systemic transfer of mercury from amalgam fillings before and after cessation of emission. *Environ Res* 77: 115–123.
- Hao L, Nishimura T, Wo H, Fernandez-Patron C (2006). Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 819–825.
- de las Heras N, Aragoncillo P, Maeso R, Vazquez-Pérez S, Navarro-Cid J, DeGasparo N *et al.* (1999). AT(1) receptor antagonism reduces endothelial dysfunction and intimal thickening in atherosclerotic rabbits. *Hypertension* 34: 969–975.
- Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K *et al.* (2008). Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 51: 211–217.
- Houston MC (2007). The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med* 13: S128–S133.
- Huang YL, Cheng SL, Lin TH (1996). Lipid peroxidation in rats administered with mercuric chloride. *Biol Trace Elem Res* 52: 193–206.
- Kishimoto T, Oguri T, Tada M (1995). Effect of methylmercury (CH₃HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells. *Toxicology* 103: 1–7.
- Langworth S, Sallsten G, Barregard L, Cynkier I, Lind ML, Soderman E (1997). Exposure to mercury vapor and impact on health in the dental profession in Sweden. *J Dent Res* 76: 1397–1404.
- Mahboob M, Shireen KF, Atkinson A, Khan AT (2001). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B* 36: 687–697.
- Martín MC, Balfagón G, Minoves N, Blanco-Rivero J, Ferrer M (2005). Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric Oxide* 12: 163–176.
- Miller DM, Woods JS (1993). Urinary porphyrins as biological indicators of oxidative stress in the kidney. Interaction of mercury and cephaloridine. *Biochem Pharmacol* 46: 2235–2241.
- Mulvany MJ (2002). Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* 17: 105–109.
- Mulvany MJ, Halpern W (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19–26.

- Osto E, Coppolino G, Volpe M, Cosentino F (2007). Restoring the dysfunctional endothelium. *Curr Pharm Des* 13: 1053–1068.
- Paravicini TM, Touyz RM (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31: S170–S180.
- Peçanha FM, Wiggers GA, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, García-Redondo AB *et al.* (2010). 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: 29–36.
- Reus IS, Bando I, Andrés D, Cascales M (2003). 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.
- Riganti C, Costamagna C, Doublier S, Miraglia E, Polimeni M, Bosia A *et al.* (2008). The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 228: 277–285.
- Salonen J, Seppanen K, Nyyssonen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M *et al.* (1995). 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.
- Salonen JT, Seppanen K, Lakka TA, Salonen R, Kaplan GA (2000). Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis* 148: 265–273.
- Sandborgh-Englund G, Elinder CG, Johanson G, Lind B, Skare I, Ekstrand J (1998). The absorption, blood levels, and excretion of mercury after a single dose of mercury vapor in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 150: 146–153.
- Torres AD, Rai AN, Haidiek ML (2000). Mercury intoxication and arterial hypertension: report of two patients and review of the literature. *Pediatrics* 105: E34.
- Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Tuomainen TP, Korhonen MJ *et al.* (2005). Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 228–233.
- Wei Y, Whaley-Connell AT, Chen K, Habibi J, Uptergrove GM, Clark SE *et al.* (2007). NADPH oxidase contributes to vascular inflammation, insulin resistance, and remodeling in the transgenic (mRen2) rat. *Hypertension* 50: 384–391.
- Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV *et al.* (2008). Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1033–H1043.
- Wolf MB, Baynes JW (2007). Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals* 20: 73–81.
- Xu S, Touyz RM (2006). Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. *Can J Cardiol* 22: 947–951.

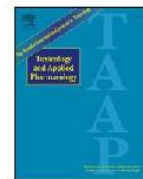
9.2 ANEXO II

Toxicology and Applied Pharmacology 255 (2011) 193–199



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap

Exposure to low mercury concentration *in vivo* impairs myocardial contractile function

Lorena Barros Furieri ^a, Mirian Fioresi ^a, Rogério Faustino Ribeiro Junior ^a, María Visitación Bartolomé ^d, Aurélio Araújo Fernandes ^a, Victoria Cachoeiro ^d, Vicente Lahera ^d, Mercedes Saldaña ^c, Ivanita Stefanon ^a, Dalton Valentim Vassallo ^{a,b,*}

^a Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^b Health Science Center of Vitória-EMESCAM, Vitória, ES, Brazil

^c Department of Pharmacology, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^d Department of Physiology, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2011

Revised 6 June 2011

Accepted 10 June 2011

Available online 24 June 2011

Keywords:

Mercury

Na⁺-K⁺ ATPase

Contractility dysfunction

SERCA/PLB ratio

ABSTRACT

Increased cardiovascular risk after mercury exposure has been described but cardiac effects resulting from controlled chronic treatment are not yet well explored. We analyzed the effects of chronic exposure to low mercury concentrations on hemodynamic and ventricular function of isolated hearts.

Wistar rats were treated with HgCl₂ (1st dose 4.6 µg/kg, subsequent dose 0.07 µg/kg/day, *im*, 30 days) or vehicle. Mercury treatment did not affect blood pressure (BP) nor produced cardiac hypertrophy or changes of myocyte morphometry and collagen content. This treatment: 1) *in vivo* increased left ventricle end diastolic pressure (LVEDP) without changing left ventricular systolic pressure (LVSP) and heart rate; 2) in isolated hearts reduced LV isovolumic systolic pressure and time derivatives, and β-adrenergic response; 3) increased myosin ATPase activity; 4) reduced Na⁺-K⁺ ATPase (NKA) activity; 5) reduced protein expression of SERCA and phosphorylated phospholamban on serine 16 while phospholamban expression increased; as a consequence SERCA/phospholamban ratio reduced; 6) reduced sodium/calcium exchanger (NCX) protein expression and α-1 isoform of NKA, whereas α-2 isoform of NKA did not change.

Chronic exposure for 30 days to low concentrations of mercury does not change BP, heart rate or LVSP but produces small but significant increase of LVEDP. However, in isolated hearts mercury treatment promoted contractility dysfunction as a result of the decreased NKA activity, reduction of NCX and SERCA and increased PLB protein expression. These findings offer further evidence that mercury chronic exposure, even at small concentrations, is an environmental risk factor affecting heart function.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Adverse effects of mercury were mainly recognized in the 1970s due to the disasters of Minamata Bay (Eto, 2000) and Iraq (Bakir et al., 1973). Increased cardiovascular risk after mercury exposure has been reported, and both acute and chronic mercury exposure produces several toxic effects on the cardiovascular system.

Acute mercury administration reduces arterial blood pressure (Rhee and Choi, 1989; Rossoni et al., 1999) and myocardial contractility (Oliveira et al., 1994). Acute HgCl₂ (5 mg/Kg) also produces cardiac systolic and diastolic failure, and pulmonary hypertension *in vivo* (Rossoni et al., 1999). In left ventricular papillary

muscles, 0.5 and 1 µM HgCl₂ increase force development (Oliveira et al., 1994; Assis et al., 2003) probably resulting from the inhibition of sarcolemmal Na⁺,K⁺-ATPase (NKA) (Anner et al., 1992). At higher concentrations, mercury produces a negative inotropism as a consequence of calcium overload by reducing sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity (Hechtenberg and Beyersmann, 1991). The metal also reduces tetanic tension development and myosin ATPase activity (Vassallo et al., 1999; Moreira et al., 2003) at these concentrations. In Langendorff-perfused hearts, perfusion with high concentrations of mercury also reduces cardiac contractility, thereby decreasing isovolumic pressure development (Rhee and Choi, 1989; Massaroni et al., 1995).

Attention has recently been focused on the cardiovascular toxic effects of chronic mercury exposure and its association with hypertension, carotid atherosclerosis, myocardial infarction and coronary heart disease (Salonen et al., 2000; Virtanen et al., 2005; Houston, 2007). Different forms of mercury, such as HgCl₂ and methyl mercury, have different actions and adverse outcomes when acutely

* Corresponding author at: Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, 29040-091 Vitória, ES, Brazil. Fax: +55 27 2122 7330.

E-mail address: daltonv2@terra.com.br (D.V. Vassallo).

or when higher doses are used. For chronic low dose exposure the proximate toxic agent is most likely inorganic mercury (Rooney, 2007). Moreover, studies reporting mercury effects resulting from chronic exposure are still scarce and the underlying mechanisms are not yet well explored.

In order to adequately control amounts of mercury absorption, we developed an experimental model for controlled chronic exposure to low concentrations of HgCl₂; such a model describes an endothelial dysfunction in aorta and mesenteric resistance arteries due to decreased NO bioavailability by increased NADPH oxidase-derived O₂ (Wiggers et al., 2008). We then investigated whether the effects of chronic exposure to low concentrations of mercury also affects cardiac contractility by evaluating effects on arterial and ventricular pressures, isolated heart, NKA and myosin ATPase activities, expression of calcium handling proteins and changes in myocyte morphometry. Findings provide further evidence that chronic exposure to low doses of mercury, even at concentrations considered to be safe, is an environmental risk factor for heart function and cardiovascular disease.

Material and methods

Animals. Three-month-old male Wistar rats were obtained from the Animal Quarters of the Federal University of Espirito Santo. Rats were housed during treatment at a constant room temperature, humidity, and light cycle (12:12-h light-dark) with free access to tap water and fed standard chow *ad libitum*. Rats were divided into two groups: control (vehicle–saline solution, *im*) and those treated with mercury chloride for 30 days (1st dose 4.6 µg/kg, subsequent dose 0.07 µg/kg/day, *im* to cover daily loss). Our group described that this treatment led to blood levels of ~8 ng/mL (Wiggers et al., 2008). All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology, were in accordance with the National Institute of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by local ethics committee (CEUA-EMESCAM 003/2007, 007/2007).

Arterial blood pressure, ventricular pressure and heart rate measurements. At the end of treatment, rats (N = 22) were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, Sigma (St Louis, MO, USA), and a polyethylene catheter (PE50) filled with heparinized saline (50 U/ml) was introduced into the carotid artery to measure arterial systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP). The carotid artery catheter was introduced into the left ventricle to measure systolic pressure (LVSP) and its positive and negative time derivatives (dP/dt + LV and dP/dt – LV, respectively), as well as left ventricular end diastolic pressure (LVEDP). Recordings were performed over a 30-min period with a pressure transducer (TSD104A), and with an interface and data collection software (MP100A, BIOPAC System, Inc., Santa Barbara, CA, USA). Heart rate (HR) was determined from intra-beat intervals.

Isolated heart perfusion. After treatment, rats (N = 14) were anesthetized with urethane (1.2 g/kg), treated with heparin (500 UI, *i.p.*) and euthanized by exsanguination; the heart was excised after 10 min and mounted in an isolated organ chamber and perfused according to the Langendorff technique at constant flow (10 mL/min) with Krebs–Henseleit bicarbonate buffered solution containing (in mM): 120 NaCl, 5.4 KCl, 1.25 CaCl₂, 2.5 MgSO₄, 1.2 Na₂SO₄, 2.0 NaH₂PO₄, 20 NaHCO₃, and 11 glucose (salts used were of analytical grade; Sigma, St Louis, MO, USA and Merck, Darmstadt, Germany). This solution was filtered and continuously bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH = 7.4) and kept between 34 and 35 °C. After mounting, the left atrium was opened and a soft distensible balloon mounted at the tip of a rigid plastic tube was inserted into the left ventricular cavity through the atrioventricular valve. To avoid liquid accumulation in the ventricular cavity, the ventricle was perforated with a puncture needle. The

balloon was connected, via a Y piece, to a pressure transducer (TSD 104A) and to a syringe so that the diastolic pressure of the left ventricle could be adjusted to predetermined values by injecting water into the balloon. The resulting pressure was registered. The hearts were driven with isolated suprathreshold rectangular pulses (5 ms duration) at a constant rate (3.3 Hz) through a pair of Ag/AgCl electrodes attached to the upper region of the right ventricle. Mechanical activity was investigated by measuring developed left ventricular isovolumic systolic pressure (LVISP). To evaluate contractility the rate of rise of LVISP (dP/dt) was used because it is highly sensitive to changes in contractility (Gleason and Braunwald, 1962). These parameters were measured with a pressure transducer connected to an amplifier (MP 100 Biopac Systems; Inc.; CA) and recorded with a data acquisition system (BIOPAC MP100WSW, including a software Acqknowledge III, Goleta, CA). The isovolumic pressure derivative (dP/dt) was gotten offline by the same software (digital filter Blackman –61 dB, 25 KHz of cut frequency and sample rate of 1000/s). All measurements began 30 min after mounting to allow the beating preparation to adapt to the *in vitro* conditions. The coronary perfusion pressure (CPP) was continuously registered by connecting a pressure transducer (TDS 104A) to the inflow of the aortic pressure tube. Since coronary flow was kept constant (10 mL/min), changes of the CPP were dependent on changes of coronary resistance.

Protocols were performed beginning with a constant diastolic pressure of 5 mm Hg by adjusting the volume of the balloon. Ventricular function curves were obtained by measuring the left ventricular isovolumic systolic pressure (LVISP) developed while diastolic pressure was increased from 0 to 30 mm Hg in steps of 5 mm Hg. Balloon volume was kept constant during experiments involving other protocols; this permitted changes in diastolic and systolic pressures to be measured. Initially, recordings were taken under control conditions in both groups. In order to analyze inotropic response, a single dose of isoproterenol (Sigma, St Louis, MO, USA) *in bolus* (100 µl, 10 µM) was administered to evaluate β-adrenoceptor response.

Assay of cardiac myosin ATPase activity. Some animals were killed at the end of hemodynamic measurements. The hearts were rapidly frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C until the day of analysis. Briefly, as previously reported (Moreira et al., 2003), myosin was prepared from minced and homogenized left ventricles extracted with KCl-phosphate buffer (0.3 M KCl and 0.2 M phosphate buffer [pH 6.5] (Klotz et al., 1975)). Myosin ATPase activity was assayed according to previous reports (Klotz et al., 1975; Cappelli et al., 1989) by measuring inorganic phosphate (Pi) liberation from 1 mM ATP in the presence of 50 mM HEPES (pH 7), 0.6 M KCl, 5 mM CaCl₂, or 10 mM ethylene glycol-bis (β-amino ethyl ether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA) in a final volume of 200 µL. Samples were assayed in duplicate or triplicate and corrected for non-enzymatic hydrolysis by using controls assayed in the same conditions, except that the protein sample was added after the interruption of the reaction by using 200 µL of 10% trichloroacetic acid. The reaction was initiated by addition of the protein sample to avoid the inactivation at 30 °C caused by a lack of substrate. The enzyme activity was calculated as the difference between activities observed in the presence of Ca²⁺ and that in the presence of 10 mM EGTA. Pi was determined by the method of Chan et al. (1986) (Chan et al., 1986). The specific activity was reported as nmol Pi released per min per mg of protein. Protein was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

Na⁺-K⁺ ATPase activity assay. The enzymatic material was extracted as described by Velema and Zaagsma (1981) with the following modifications: ventricular tissue was homogenized in a solution

containing Tris–HCl 20 mM and EDTA 1 mM pH 7.5. Na^+ - K^+ ATPase activity was assayed by measuring Pi liberation from 3 mM ATP in the presence of NaCl 125 mM, MgCl_2 3 mM, KCl 20 mM and Tris–HCl 50 mM (pH 7.5). The enzyme was preincubated for 5 min at 37 °C and the reaction was initiated by adding the ATP. Incubation times and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. The reaction was stopped by the addition of 200 μL of 10% trichloroacetic acid. Controls with addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct for nonenzymatic hydrolysis of the substrate. All samples were in duplicate. The specific activity was reported as nmol Pi released per min per mg of protein unless otherwise stated. The specific activity of enzyme was determined in the presence and absence of 5 mM of ouabain.

Western blot analysis. After Langendorff experiments, hearts were homogenized and proteins [50 μg for PLB, PLB-phospho-Ser¹⁶ and 100 μg for SERCA, NCX, α -1, α -2] were separated by 7.5% (SERCA, NCX, α -1 and α -2), 15% (PLB) SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and were incubated with mouse monoclonal antibodies for SERCA (1:500, Affinity BioReagents, CO, USA), NCX (1:200, Abcam Cambridge, MA, USA), PLB (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Affinity BioReagents, CO, USA), α -1 (1:1000, Upstate, Billerica, MA) or rabbit polyclonal antibodies for PLB phospho-Ser16 (1:5000, Badrilla, Leeds, UK) and α -2 (1:1000, Upstate, Billerica, MA). After washing, membranes were incubated with anti-mouse or anti-rabbit (1:5000, StressGen, Victoria, Canada) immunoglobulin antibody conjugated to horseradish peroxidase. After thorough washing, immunocomplexes were detected using an enhanced horseradish peroxidase/luminal chemiluminescence system (ECL Plus, Amersham International, Little Chalfont, UK) and film (Hyperfilm ECL International). Signals on the immunoblot were quantified with the National Institutes of Health Image V1.56 computer program. The same membrane was used to determine GAPDH expression using a mouse monoclonal antibody (1:5000, Abcam Cambridge, MA, USA).

Morphometric analysis. In the present study, two different quantifications were considered in order to analyze putative actions of mercury treatment on cardiac structure. Firstly, a determination was made as to whether treatment could modify the size or morphology of myocyte cell bodies. Secondly, it was determined if the measurements could detect a variation in collagen content.

Cardiomyocyte cell body quantification. Histologic sections of ventricular tissue of 4- μm thickness were stained with Masson's trichrome. Three sections for each animal were analyzed using a high resolution monochromatic photcamera CCD (SonyXC-75CE) attached to a photomicroscope (LeicaDMRB). The morphometric analyses were performed with an Image System Analysis (Leica Q500MC) with 8 bits of images in gray gradation (256 levels of gray: 0 representing black as blank and 255 colors). The binary edition was used to remove artifacts that did not correspond to cardiomyocyte (cell body) stained area. Cardiomyocyte (60–80 per animal) analyses were performed with 40 \times lenses in which the cell nuclei were clearly observed. The same illumination conditions were used for all measurements. Calibration of the system was carried out using a stage micrometer (Leitz) that allowed computation of the object area in units of μm^2 .

Cardiac collagen quantification. Regarding the collagen content evaluation we used Picrius Sirius red staining. This technique is widely used for measuring collagen content in different tissues. Tissue samples were dehydrated, embedded in paraffin and cut in sections of (4 μm) thickness. These sections were stained with 0.5% Sirius Red F3BA (Aldrich Chemical Company). The quantification of collagen in left ventricle was performed using an image analysis system from LEICA (LEICA 500YW, Cambridge, UK) and expressed as percent of

tissue area. A single researcher unaware of the experimental groups performed the analysis.

Data analysis and statistics. Results are reported as means \pm SEM. Differences were analyzed using Student's *t*-test or two-way ANOVA followed by a Tukey test. $p \leq 0.05$ was considered significant. For protein expression, data are expressed as the ratio between signals on the immunoblot corresponding to the studied protein and GAPDH.

Results

In rats exposed to 30-day HgCl_2 treatment no differences in body weight between groups were observed either before or after treatment. Left and right ventricles weight normalized by body weight also showed no differences (Table 1).

In order to investigate cardiac effects, Langendorff-perfused hearts from both controls and from 30-day exposed rats were used. Fig. 1 shows that the LVISP was reduced in the mercury-treated group with diastolic pressure fixed at 5 mm Hg. Reduction was also observed for positive and negative dP/dt, while coronary perfusion pressure did not change. When performing ventricular function curves, LVISP was reduced in the mercury-treated group for all diastolic pressure values (Fig. 2A). Similar behavior was obtained with positive and negative dP/dt (Figs. 2B–C), but diastolic pressure increments did not change the coronary perfusion pressure (data not shown).

Isoproterenol was used in order to test if HgCl_2 treatment could alter the myocardial response to inotropic interventions. Isoproterenol administration (100 μL , 10 μM , *in bolus*) increased LVISP and positive and negative dP/dt in both groups. However, the increase in LVISP and positive dP/dt showed a percentage reduction in the mercury-treated group suggesting a reduction in the β -adrenergic inotropic action (Fig. 3). During this inotropic intervention no changes in coronary perfusion pressure were observed.

In order to investigate the underlying mechanisms that could explain those mechanical effects on hearts from mercury-treated rats, NKA and myosin ATPase activities were measured. Myocardial myosin ATPase activity was increased (Ct: 257.7 ± 11.7 vs HgCl_2 : 301.5 ± 9.3 nmol Pi/min/mg, $P < 0.05$) while NKA activity was reduced (Ct: 59.8 ± 4.5 vs HgCl_2 : 35.3 ± 8.6 nmol Pi/min/mg, $P < 0.05$) in the mercury-treated group. Protein expressions of NCX, α 1 and α 2 subunits of NKA, SERCA, phospholamban and its phosphorylated fraction were measured (Figs. 4 and 5) in order to evaluate calcium handling mechanisms. After 30-day mercury treatment reduces expression of α -1 NKA subunit and NCX expression, but expression of α -2 NKA subunit did not change. Moreover, after exposure to low doses of mercury, SERCA expression and phosphorylated phospholamban were reduced while phospholamban expression was increased. These changes led to a reduction in SERCA/PLB ratio, suggesting the reduction in calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum contributing to the calcium overload.

Since no changes in myocardial mass were found analyzing ventricular weight we investigated myocardial morphology by analyzing putative actions of mercury treatment on cell morphology. No

Table 1
Body weight and ventricular weights from Control and HgCl_2 treated rats.

	Control	N	HgCl_2	N
BW initial (g)	251 \pm 4	12	251 \pm 5	12
BW final (g)	364 \pm 4	12	365 \pm 8	12
LV (mg)	886 \pm 42	12	904 \pm 47	12
LV/BW (mg/g)	2.3 \pm 0.1	12	2.4 \pm 0.1	12
RV (mg)	229 \pm 11	12	227 \pm 8	12
RV/BW (mg/g)	0.6 \pm 0.02	12	0.6 \pm 0.03	12

Initial and final body weight (BW); Left (LV) and right (RV) ventricular weight; LV/BW and RV/BW weight ratios from Control and HgCl_2 -treated rats. Results represent mean \pm SEM. N-Number of animals used. * $p < 0.05$. Student's *t* test.

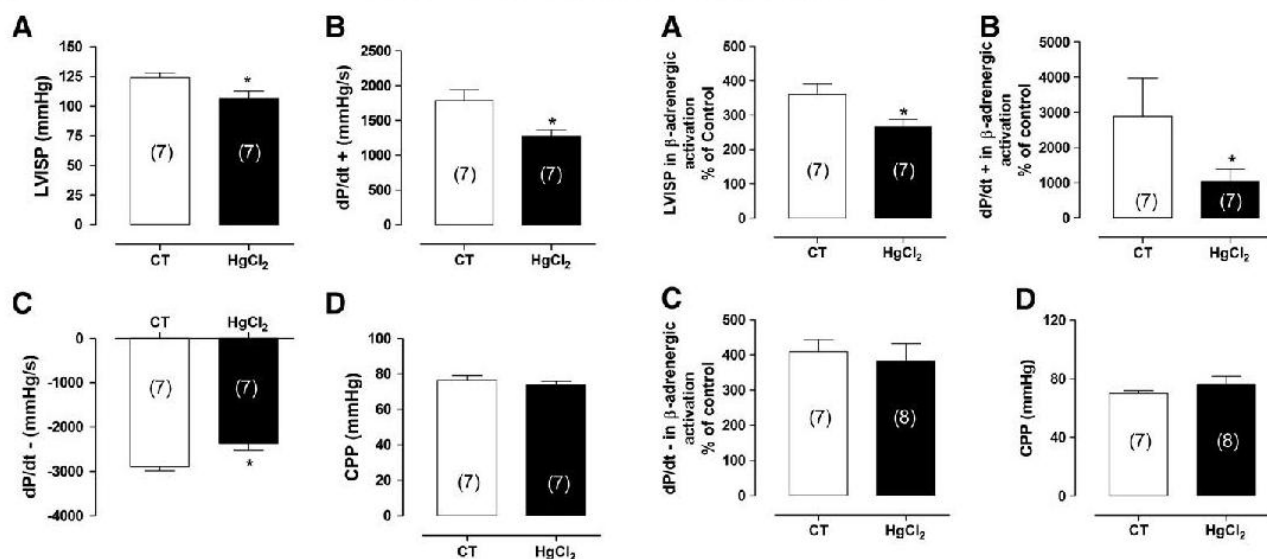


Fig. 1. (A) LVISP—Left ventricle systolic isovolumetric pressure, (B) positive first time derivative (dP/dt +), (C) negative first time derivative (dP/dt -) and (D) coronary perfused pressure from Control (CT) and HgCl₂-treated (HgCl₂) rats under control conditions in Langendorff apparatus. Results represent mean \pm SEM. Number of animals used is indicated in parentheses. * $p < 0.05$. Student's *t* test.

changes for morphometric results were observed for perimeter, width, length and area of myocardial cells (results not shown). In addition, no changes were observed in collagen fraction in left ventricle from the mercury-treated group as compared with controls (5.1 ± 0.8 vs $4.7 \pm 0.6\%$ of tissue area).

To investigate if such changes could produce hemodynamic effects, we performed measurements of systolic, diastolic, mean arterial pressure and heart rate in anesthetized rats. No differences were observed between the two groups (Table 2). The measurement of ventricular pressures, LVSP and time derivatives also did not change. However, only LVEDP increased in the 30-day mercury-treated group.

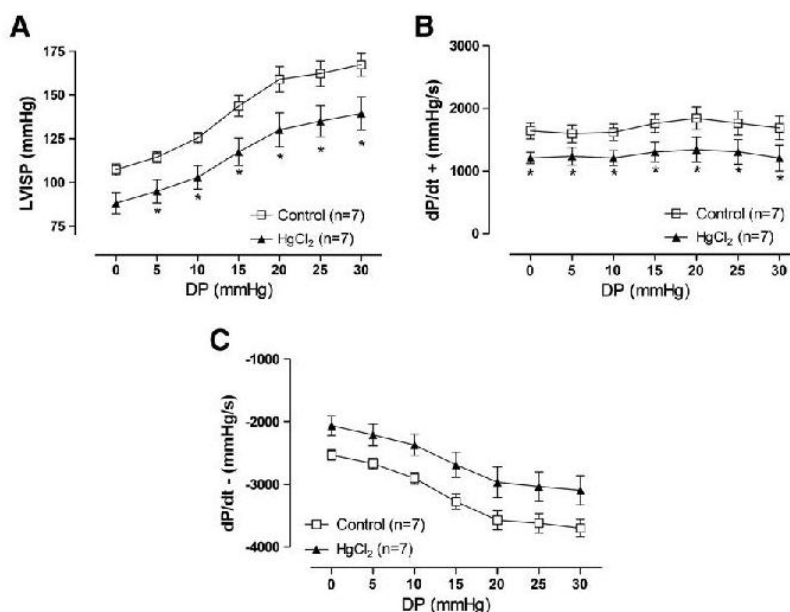


Fig. 2. (A) LVISP—Left ventricle systolic isovolumetric pressure, (B) positive first time derivative (dP/dt +), (C) negative first time derivative (dP/dt -) curves obtained at different diastolic pressure (DP) from Control and HgCl₂-treated rats. Results represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$. ANOVA two-way and Tukey test.

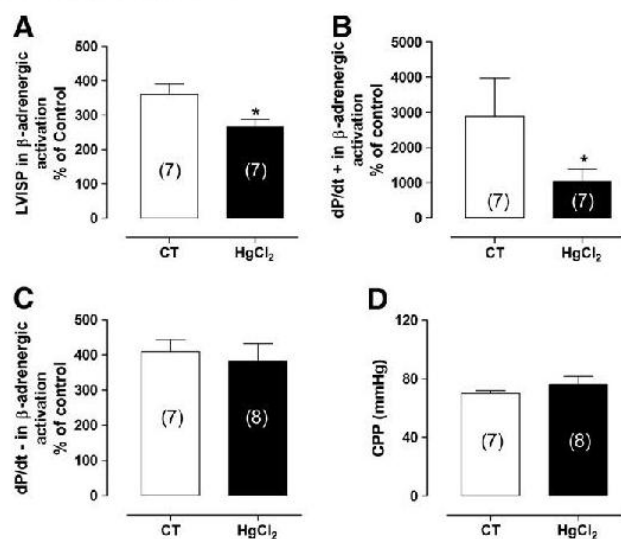


Fig. 3. β -adrenergic activation by isoproterenol (100 μ L, 10 μ M, *in bolus*) in Langendorff apparatus on LVISP (A), dP/dt+ (B), dP/dt- (C) and on CPP (D) from Control and HgCl₂-treated rats. Results represent mean \pm SEM. Number of animals used is indicated in parentheses. * $p < 0.05$. Student's *t* test.

Discussion

The main findings presented here show that 30-day treatment with low mercury concentration produced a negative inotropic effect in perfused hearts, although myosin ATPase activity increased. This contractility reduction was explained by alterations in calcium-handling mechanisms because of both diminished protein expression of SERCA, NKA ($\alpha 1$ subunit) and NCX, and increased PLB expression together with a reduced response to β -adrenergic stimulation. This treatment did not change arterial or ventricular pressures, although it produced a small but significant increase of LVEDP in anesthetized rats.

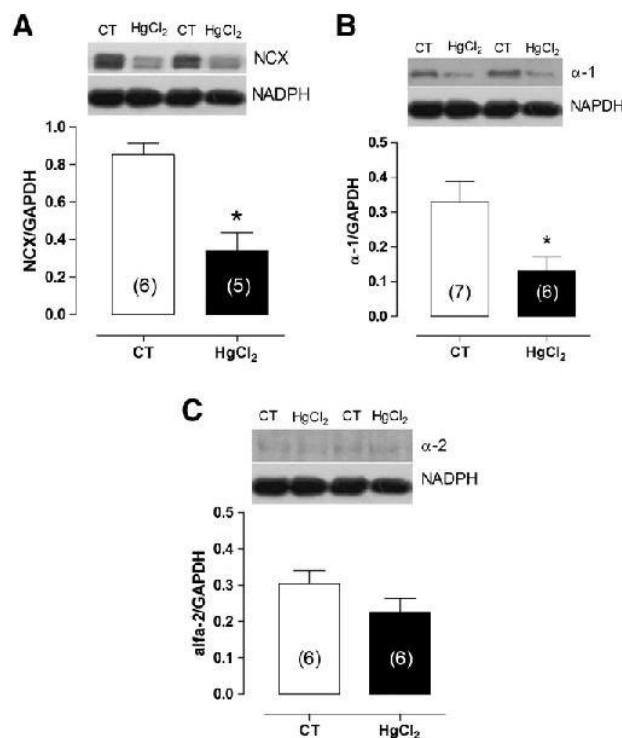


Fig. 4. Densitometric analysis of the Western blot for (A) NCX, (B) α -1 and (C) α -2 isoform of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase from control and HgCl_2 -treated rats. Number of animals used is indicated in parentheses. * $p < 0.05$ by Student's t test. Representative blots are also shown.

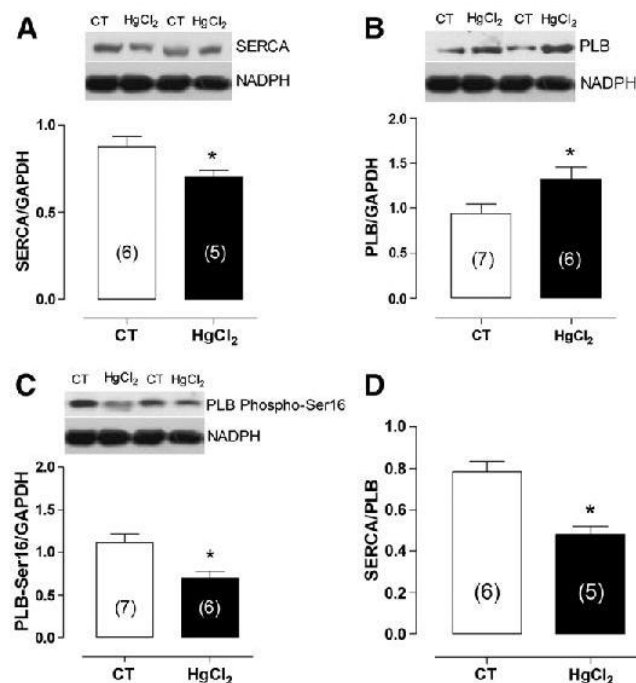


Fig. 5. Densitometric analysis of the Western blot for (A) SERCA (B) PLB (C) PLB-phospho Ser¹⁶ and (D) SERCA/PLB ratio protein expression in hearts from control and HgCl_2 -treated rats. Number of animals used is indicated in parentheses. * $p < 0.05$ by Student's t test. Representative blots are also shown.

Table 2

Hemodynamic parameters from untreated and HgCl_2 -treated rats.

	Control	N	HgCl_2	N
HR (bpm)	303 ± 14	10	319 ± 12	11
SBP (mm Hg)	103 ± 6	10	110 ± 5	11
DBP (mm Hg)	57 ± 4	10	62 ± 5	11
MBP (mm Hg)	77 ± 6	10	75 ± 5	11
LVSP (mm Hg)	110 ± 9	8	119 ± 7	10
LVEDP (mm Hg)	2.2 ± 0.3	8	3.9 ± 0.4*	10
dP/dt + LV (mm Hg/s)	3972 ± 740	8	4579 ± 617	10
dP/dt - LV (mm Hg/s)	4827 ± 547	8	4995 ± 495	10

Changes in systolic (SAP), diastolic (DAP) and mean blood pressure (MBP), heart rate (HR), left ventricle systolic pressure (LVSP), left ventricle end diastolic pressure (LVEDP) and in positive (dP/dt +) and negative first time derivatives (dP/dt -) from Control and HgCl_2 -treated rats. Results represent mean ± SEM. N- Number of animals used. Student's t test.

* $p < 0.05$.

Mercury is known to be an environmental risk factor for cardiovascular diseases (Houston, 2007). The reference blood concentration of mercury recommended by the US Environmental Protection Agency's, below which exposure is considered to be without adverse effect, is 5.8 ng/mL (National Academy of Sciences, 2000; Rice, 2005; Stern, 2005). In control populations, blood mercury concentration was reported to be 2.73 ng/mL in adults in New York City and 1 ng/mL in China. Mercury attains levels of 5.65 ng/mL (McKelvey et al., 2007) in regular fish consumption, and in workers that are regularly exposed attain levels between 7 and 10 ng/mL (Gupta et al., 1996; Chen et al., 2005).

Professional exposure to mercury vapor and release of mercury from removal of amalgam dental fillings increases its blood (18 nM; ~5 ng/mL) and plasma (5 nM; ~1.5 ng/mL) concentration (Halbach, 1995; Björkman et al., 1997; Langworth et al., 1997; Sandborgh-Englund et al., 1998). This form of the exposure is represented by elemental mercury. Once absorbed it can be oxidized into inorganic mercury (Rooney, 2007; Björkman et al., 2007). Professional exposure also produces central nervous system alteration (Langworth et al., 1997) and tooth fillings impair kidney function (Carmignani et al., 1989).

Mercury exerts its effects by combining with SH groups (Clarkson, 1972) and these actions might be the manner by which the metal exerts its effects on the cardiac myocytes (Halbach, 1989). However, the fact that mercury can concentrate inside the cells suggests that the metal might produce effects at even lower concentrations under chronic exposure. We have previously reported that chronic exposure to small concentrations do produce harmful vascular effects (Furieri et al., 2011; Wiggers et al., 2008) but studies regarding cardiac function with chronic exposure to low concentrations of the metal are scarce.

Given that relatively high blood levels of mercury are more likely to pose the metal as an environmental risk factor for cardiovascular diseases, we recently developed a method for producing a controlled chronic mercury administration that attains a blood concentration of 8 ng/mL (~29 nM). Using a similar exposure protocol, and to avoid effects of humoral and neural factors that exist in the blood, the perfused heart preparation was used. In these preparations a negative inotropic and lusitropic effect was observed in the mercury-treated group. The underlying mechanisms that could explain these findings are usually the reduction of NKA, NCX and SERCA activities (Bers, 2006). Biochemical analyses performed here showed that chronic mercury treatment reduces NKA activity, the expression of α -1 NKA subunit and NCX expression. Results also show reduction of SERCA expression, PLB increase and phosphorilated PLB reduction, which might lead to less calcium uptake and release. Such condition is known to reduce force development (Bers and Despa, 2006).

Chronic mercury treatment reduces NKA activity leading to increased intracellular sodium concentration, which reduces NCX activity, producing a calcium overload condition. In addition, the reduction of SERCA expression and phosphorylated phospholamban, while occurring an increase in phospholamban expression, reduced the SERCA/PLB ratio. These changes suggest that calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum is reduced, which contributes to the calcium overload. Consequently, the release of less calcium upon activation reduces force development.

Taken together these findings explain the reduced mechanical activity found in isolated hearts suggesting that mercury treatment might produce calcium overload. Considering that for the isolated perfused heart there is no protection by homeostatic mechanisms, the perfused heart showed reduction of cardiac mechanical activity, reinforcing the suggestion that this treatment begins to present signs of Hg toxicity.

Although mercury treatment reduced pressure generation, coronary perfusion pressure remained unchanged, even when isoproterenol was used. β -adrenergic activation should produce a vasodilatation after pressure increment. However, we should emphasize that the coronary flow depends mainly on a metabolic control (Gutterman and Cowley, 2006). Considering that both control and Hg-treated hearts presented similar coronary perfusion pressure we concluded that the coronary flow used was sufficient to maintain myocardial metabolic demands.

Since signs of mercury toxicity were observed *in vitro* we investigated mercury effects in anesthetized animals. Arterial and ventricular pressures were measured. No changes were observed compared to the non-treated rats. Similar results were found for arterial systolic pressure measured in awake rats when using a tail cuff technique (Wiggers et al., 2008). We should consider that the *in vitro* assay is not a good model to reproduce what occurs *in vivo*. A possible explanation for why *in vitro* LVISP was reduced in mercury-treated perfused hearts is the increased myosin ATPase activity and a putative rise in sympathetic tone that reduced the β -adrenergic response to isoproterenol found in the isolated perfused heart.

However, the increment of LVEDP and reduction in dp/dt during relaxation observed in mercury-treated rats indicate that there is some damage to ventricular mechanisms. We observed a reduction of NKA activity, NCX and SERCA expression and an increase in PLB expression. These findings taken together explain the generation of a calcium overload condition and LVEDP increase after mercury treatment. What is more, SERCA activity reductions and PLB increases are usually accompanied by increased LVEDP (Sjaastad et al., 2003), which is not unlike what is observed in other conditions such as heart failure. This negative inotropism and lusitropism *in vivo* were then blunted by the increased myosin ATPase activity and a rise in sympathetic tone. It is worth emphasizing that β -adrenergic activation regulates myosin ATPase activity through cyclic adenosine monophosphate, which explains this association (Winegrad et al., 1986).

Because LVW/BW and RVW/BW did not change we also performed morphometric analyses. After mercury treatment no changes were observed for perimeter, length, width or area of myocytes. Regarding the evaluation in collagen content in mercury-treated animals compared with controls no changes were observed. Since 30 days mercury treatment with low doses did not produce morphological alterations our findings suggest that functional changes here described are not consequence of morphological changes.

Potential limitations of the study. In the present study, we used fluid-filled manometric system as a method for performing the hemodynamic experiments. If we compared the present results with those performed using microtip pressure transducers, we observed that the present values obtained with polyethylene catheter are lower when compared to those obtained with the microtip catheter (Zimmer and Millar, 1998). Results using the microtip catheter are commonly performed in anesthetized rats, thereby reducing differences with the fluid-filled

catheters. Because the use of anesthesia changes hemodynamic parameters, we used the fluid-filled manometric system to perform the present experiments, keeping in mind both the catheter's resonance effect and dumping which this manometric system produces. In any case, as the same fluid-filled manometric system was used to perform all experiments, we believe the present results to be acceptable.

In summary, results presented herein suggest that controlled chronic exposure to small concentrations of inorganic mercury, leading to plasma levels similar to those found after continuous occupational exposure, begins to affect heart function, eventhough several cardiovascular parameters, such as arterial pressure and LVSP measured *in vivo*, are still within normal ranges. In perfused hearts, however, a negative inotropic effect was found resulting from reduction in NKA activity, NCX and SERCA expression and PLB increases, together with a percentage reduction in the magnitude of the β -adrenergic response. It is important to emphasize that, although functional changes are not showing differences *in vivo*, heart function is maintained by compensatory or adaptive mechanisms such as sympathetic activation and increased myosin ATPase activity. These results reinforce the relevance of human chronic occupational exposure to small mercury concentration as a risk factor for heart function.

Conflicts of interest statement

None declared.

Acknowledgments

This study was supported by grants from "Ministerio de Ciencia e Innovación" (MCINN) (SAF 2009-07201), "Instituto de Salud Carlos III" ISCIII (Red RECAVA, RD06/0014/0011 and RD06/0014/0007) and Banco Santander Central Hispano, Spain, and by grants from "Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível superior" (CAPES), "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq), "Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo" (FAPES) and "Fundo Estadual de Ciência e Tecnologia" (FUNCITEC-39767531/07), Brazil.

References

- Anner, B.M., Moosmayer, M., Imesch, E., 1992. Mercury blocks the Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. *Am. J. Physiol.* 262, F830–F836.
- Assis, G.P.S., Silva, C.E., Stefanon, I., Vassallo, D.V., 2003. Effects of small concentrations of mercury on the contractile activity of the rat ventricular myocardium. *Comp. Biochem. Physiol. C* 134, 375–383.
- Bakir, F., Damluji, S.F., Amin-Zaqi, L., Murtadha, M., Khalidi, A., al-Rawi, N.Y., Tikriti, S., Dahahir, H.I., Clarkson, T.W., Smith, J.C., Doherty, R.A., 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181, 230–241.
- Bers, D.M., 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology* 21, 380–387.
- Bers, D.M., Despa, S., 2006. Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^{+} regulation in normal and failing hearts. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 315–322.
- Björkman, L., Sandborgh-Englund, G., Ekstrand, J., 1997. Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 156–162.
- Björkman, L., Lundekvam, B.F., Laegreid, T., Bertelsen, B.I., Morild, I., Lilleng, P., Lind, B., Palm, B., Vahter, M., 2007. Mercury in human brain, blood, muscle and toenails in relation to exposure: an autopsy study. *Environ. Health* 11, 6–30.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 218–254.
- Cappelli, V., Bottinelli, R., Poggesi, C., Moggio, R., Reggiani, C., 1989. Shortening velocity and myosin and myofibrillar ATPase activity related to myosin isoenzyme composition during postnatal development in rat myocardium. *Circ. Res.* 65, 446–457.
- Carmignani, M., Boscolo, P., Preziosi, P., 1989. Renal ultrastructural alterations and cardiovascular changes in rats exposed to mercuric chloride. *Arch. Toxicol.* 13, 353–356.
- Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375–380.
- Chen, C., Qu, L., Li, B., Xing, L., Jia, G., Wang, T., Gao, Y., Zhang, P., Li, M., Chen, W., Chai, Z., 2005. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin. Chem.* 51, 759–767.
- Clarkson, T.W., 1972. The biological properties and distribution of mercury. *Biochem. J.* 130, 61–63.
- Eto, K., 2000. Minamata disease. *Neuropathology* 20, 14–19.

- Furieri, L.B., Galán, M., Avendaño, M.S., García-Redondo, A.B., Aguado, A., Martínez, S., Cachofeiro, V., Bartolomé, M.V., Alonso, M.J., Vassallo, D.V., Salaices, M., 2011. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is ROS dependent. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1819–1831.
- Gleason, W.L., Braunwald, E., 1962. Studies on the first derivative of the ventricular pressure pulse in man. *J. Clin. Invest.* 41, 80–91.
- Gupta, M., Bansal, J.K., Khanna, C.M., 1996. Blood mercury in workers exposed to the preparation of mercury cadmium telluride layers on cadmium telluride base. *Ind. Health* 34, 421–425.
- Gutterman, D.D., Cowley Jr., A.W., 2006. Relating cardiac performance with oxygen consumption: historical observations continue to spawn scientific discovery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, 2555–2556.
- Halbach, S., 1989. Sulfhydryl-induced restoration of myocardial contractility after alteration by mercury. *Arch. Toxicol.* 13, 349–352.
- Halbach, S., 1995. Combined estimation of mercury species released from amalgam. *J. Dent. Res.* 74, 1103–1109.
- Hechtenberg, S., Beyersmann, D., 1991. Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity by cadmium, lead and mercury. *Enzyme* 45, 109–115.
- Houston, M.C., 2007. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern. Ther. Health Med.* 13, 128–133.
- Klotz, C., Aumont, M.C., Berson, G., Leger, J.J., Preteuille, M., Swynghedauw, B., 1975. Cardiac myosin, preparation, ATPase in chronic heart hypertrophy. *Recent Adv. Stud. Card. Struct. Metab.* 5, 263–271.
- Langworth, S., Sallsten, G., Barregard, L., Cynkier, I., Lind, M.L., Soderman, E., 1997. Exposure to mercury vapor and impact on health in the dental profession in Sweden. *J. Dent. Res.* 76, 1397–1404.
- Massaroni, L., Rossoni, L.V., Amaral, S.M.C., Stefanon, I., Oliveira, E.M., Vassallo, D.V., 1995. Hemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of mercury in anaesthetized rats and in Langendorff perfused rat hearts. *Pharmacol. Res.* 32, 27–36.
- McKelvey, W., Gwyn, R.C., Jeffrey, N., Kass, D., Thorpe, L.E., Garg, R.K., Palmer, C.D., Parsons, P.J., 2007. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York City adults. *Environ. Health Perspect.* 115, 1435–1441.
- Moreira, C.M., Oliveira, E.M., Bonan, C.D., Sarkis, J.J., Vassallo, D.V., 2003. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 135, 269–275.
- National Academy of Sciences, 2000. *Toxicological Effects of Methylmercury*. National Research Council, Washington, DC, USA.
- Oliveira, E.M., Vassallo, D.V., Sarkis, J.J.F., Mill, J.G., 1994. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, 86–91.
- Rhee, H.M., Choi, B.H., 1989. Hemodynamic and electrophysiological effects of mercury in intact anesthetized rabbits and in isolated perfused hearts. *Exp. Mol. Pathol.* 50, 281–290.
- Rice, D.C., 2005. The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. *Environ. Res.* 95, 406–413.
- Rooney, J.P.K., 2007. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 234, 145–156.
- Rossoni, L.V., Amaral, S.M.C., Vassallo, P.F., França, A., Oliveira, E.M., Varner, K.J., Mill, J.G., Vassallo, D.V., 1999. Effects of mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 989–997.
- Salonen, J.T., Seppanen, K., Lakka, T.A., Salonen, R., Kaplan, G.A., 2000. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis* 148, 265–273.
- Sandborgh-Englund, G., Elinder, C.G., Johanson, G., Lind, B., Skare, I., Ekstrand, J., 1998. The absorption, blood levels, and excretion of mercury after a single dose of mercury vapor in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 146–153.
- Sjaastad, I., Wasserstrom, J.A., Sejersted, O.M., 2003. Heart failure — a challenge to our current concepts of excitation-contraction coupling. *J. Physiol.* 546, 33–47.
- Stern, A.H., 2005. Balancing the risks and benefits of fish consumption. *Ann. Intern. Med.* 142, 949.
- Vassallo, D.V., Moreira, C.M., Oliveira, E.M., Bertollo, D.M., Veloso, T.C., 1999. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and Cysteine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 113–118.
- Velega, J., Zaagsma, J., 1981. Purification and characterization of cardiac sarcolemma and sarcoplasmic reticulum from rat ventricle muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 212 (2), 678–688.
- Virtanen, J.K., Vuolilainen, S., Rissanen, T.H., Mursu, J., Tuomainen, T.P., Korhonen, M.J., Valkonen, V.P., Seppänen, K., Laukkanen, J.A., Salonen, J.T., 2005. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 228–233.
- Wiggers, G.A., Peçanha, F.M., Briones, A.M., Pérez-Girón, J.V., Miguel, M., Vassallo, D.V., Cachofeiro, V., Alonso, M.J., Salaices, M., 2008. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, 1033–1043.
- Winegrad, S., Weisberg, A., Lin, L.E., McClellan, G., 1986. Adrenergic regulation of myosin adenosine triphosphatase activity. *Circ. Res.* 58, 83–95.
- Zimmer, H.G., Millar, H.D., 1998. Technology and application of ultraminiature catheter pressure transducers. *Can. J. Cardiol.* 14, 1259–1266.