

**Efeitos cardiovasculares da associação entre baixas doses de  
cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio em ratos**

**Tháís de Oliveira Faria**

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas**

**(Fisiologia Cardiovascular)**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**-Vitória, Maio de 2014**

---

Thaís de Oliveira Faria, Faria Tde O.

**Efeitos cardiovasculares da associação entre baixas doses de cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio em ratos.** [Vitória] 2014.

**106 p.**, 29,7cm (UFES, PhD, Ciências Fisiológicas, 2009)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde.

Orientadora: Ivanita Stefanon , Universidade Federal do Espírito Santo

1. Cloreto de Mercúrio, 2. Infarto do Miocárdio, 3. Ventrículo Direito, 4. Endotélio vascular

---

**Efeitos cardiovasculares da associação entre baixas doses de cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio em ratos**

Thaís de Oliveira Faria

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

Aprovada em 29 /05 /2014 por:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ivanita Stefanon – Orientador - UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Frizera Vassallo – Co-orientadora - UFES

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virginia Soares Lemos

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazare Souza Bissoli

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suely Gomes de Figueredo

Coordenador do PPGCF:

---

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

Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Maio de 2014

*Dedico este trabalho aos meus grandes incentivadores,  
minha amada família, Racine, Neli, Thiago, Gizele, Felipe  
e ao grande amor da minha vida, Marcelo.*

*“It is important in life not to be strong, but to feel strong, to measure yourself at least once. If you want something in life, reach out and grab it.”*

*Christopher McCandless*

## RESUMO

A exposição a metais pesados tem sido associada como causa de diversas doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio. O objetivo do presente estudo foi investigar se a exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio aumenta o prejuízo funcional em tiras isoladas de ventrículo direito e na reatividade vascular de ratos submetidos ao infarto do miocárdio. Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos experimentais: Controle (veículo), HgCl<sub>2</sub> (exposição durante 4 semanas: primeira dose 4,6 µg/kg, doses subsequentes de 0,07 µg/kg/day, i.m. para suprir a perda diária), infarto do miocárdio (INF) e infarto do miocárdio associado ao cloreto de mercúrio. Para caracterizar o nosso modelo experimental de infarto do miocárdio, dados hemodinâmicos e ponderais foram coletados uma semana após injúria do infarto do miocárdio. O estudo da tensão isométrica de tiras isoladas de ventrículo direito e da reatividade vascular de anéis isolados de aorta também foram avaliadas. A exposição crônica ao cloreto de mercúrio não foi capaz de adicionar danos aos parâmetros ponderais e hemodinâmicos já causados pela injúria do infarto do miocárdio. No âmbito cardíaco, em condições basais, apesar de similar L-máx, o tempo de relaxamento estava aumentado no grupo INF, mas inalterado no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF quando comparado ao grupo Controle. No grupo INF também foi observado, prejuízo na função do retículo sarcoplasmático (RS) e redução do influxo de cálcio transsarcolemal, que foi associado a redução na expressão protéica da SERCA2a e ao aumento da expressão protéica da PLB. Entretanto, no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF, nenhuma alteração na L-máx, função lusitropica ou dF/dt- foi observado, exceto pela tendência na redução da função do RS. Esses achados podem ser explicados pela normalização do influxo de cálcio transsarcolemal e no aumento da expressão protéica do NCX. Esses resultados sugerem que a exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio atenuam o prejuízo funcional do RS e a redução do influxo de cálcio transsarcolemal observado no grupo INF, assim como nas expressões protéicas do NCX, PLB e SERCA2a. No âmbito vascular, a exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio associada ao infarto do miocárdio causa disfunção endotelial através da ativação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), na qual foi confirmada após incubação com SOD (150 U/ml), apocinina (0,3 mM), alopurinol (100 µM) e catalase (1000 U/ml). Além disso, no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF, a injúria vascular também pode ser devido a redução da biodisponibilidade do NO, observado após a administração do L-Name (100 µM). Em conjunto, esses resultados podem explicar o aumento da reatividade vascular à fenilefrina nos animais do grupo HgCl<sub>2</sub>-INF. Nossos resultados sugerem que a xantina oxidase representa uma importante fonte produtora de EROs, que resulta na redução da biodisponibilidade de NO no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF. Em conclusão, nossos resultados enfatizam que baixas doses de cloreto de mercúrio podem agravar a injúria induzida pelo infarto do miocárdio.

**Palavras chave:** Infarto agudo do miocárdio, cloreto de mercúrio, contratilidade miocárdica, reatividade vascular.

## ABSTRACT

Heavy metal exposure has been associated with several cardiovascular diseases, such as myocardial infarction (MI), and altered cardiovascular function is related to both the causes and consequences of MI. The aim of this study was to investigate whether chronic exposure to low doses of mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>) enhances the functional deterioration of right ventricle strips and of aortic rings after MI. Male Wistar rats were divided into four groups: Control (vehicle), HgCl<sub>2</sub> (exposure for 4 weeks: 1st dose 4.6 µg/kg, subsequent doses 0.07 µg/kg/day, i.m. to cover daily loss), surgically induced MI and combined HgCl<sub>2</sub>-MI. To characterize our experimental MI model, morphological and hemodynamic measurements were performed one week after MI. Isometric tension of right ventricle strips were investigated and vascular reactivity was evaluated in isolated aortic rings. Chronic HgCl<sub>2</sub> exposure did not cause more injury than MI itself among the morphological or hemodynamic parameters evaluated. Regarding cardiac function, at basal conditions, despite similar maximum isometric force at L-max, relaxation time was increased in the MI group but unaffected in the HgCl<sub>2</sub>-MI compared to the Control group. Impairment of the sarcoplasmic reticulum (SR) function and reduction in the sarcolemmal calcium influx were observed in MI group associated with SERCA2a reduction and increased PLB protein expression. The combination of chronic HgCl<sub>2</sub> exposure and MI did not cause any alteration in the developed force at L-max, lusitropic function or -dF/dt except for a tendency of a reduction SR function. These findings could be partially explained by the normalization in the sarcolemmal calcium influx and the increase in NCX protein expression observed only in this group. These results suggest that chronic exposure to low doses of HgCl<sub>2</sub> prevents the impaired SR function and the reduced sarcolemmal calcium influx observed in MI likely by acting on NCX, PLB and SERCA2a protein expression. Regarding vascular reactivity, the combination of chronic HgCl<sub>2</sub> exposure and MI caused endothelial dysfunction by activating the oxidative stress pathway, which was confirmed after incubation with SOD (150 U/ml), apocynin (0.3 mM), allopurinol (100 µM) and catalase (1000 U/ml). Moreover, in the HgCl<sub>2</sub>-MI group, the vascular injury might also be correlated with reduced NO bioavailability, observed after L-Name administration (100 µM). Together, these findings explain the increased phenylephrine reactivity in animals from the HgCl<sub>2</sub>-MI group. Our results suggest that increased vascular xanthine oxidase ROS production represents an important mechanism of endothelial dysfunction in animals that have undergone chronic HgCl<sub>2</sub> exposure plus MI injury and that this dysfunction is most likely caused by reducing NO bioavailability. In conclusion, these results emphasize that low level chronic mercury exposure might aggravate the injury induced by MI.

**Keywords:** Acute myocardial infarction, mercury chloride, myocardial contractility, vascular reactivity.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema simplificado do influxo de cálcio e da deflagração da formação das pontes cruzadas em miócitos cardíacos. Modificado de Bers & Harris, 2011.

**Figura 2.** Entrada (setas vermelhas) e extrusão (setas verdes) do cálcio no miócito cardíaco (Modificado de Bers, 2014). ATP: trifosfato de adenosina, Ca: íon cálcio, PLN: fosfolamban,  $I_{Ca}$ : corrente do íon cálcio, NCX: trocador Na/Ca, RyR: receptor de rianodina.

**Figura 3.** Esquema representativo de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio vascular intacto e suas repercussões na circulação sistêmica e no músculo liso vascular. (1) Via do óxido nítrico (NO) - vasodilatadora, (2) e (3) Via inflamatória - vasodilatadora e vasoconstritora, (3) Via da endotelina - vasoconstritora. AA = ácido araquidônico; Arg = arginina; cGMP = monofosfato de guanosina cíclico; COX = ciclo-oxigenase; ECE = enzima conversora de endotelina;  $ET_1$  = endotelina 1; ETR = receptor de endotelina; GCs = guanilato ciclase solúvel; GMP = monofosfato de guanosina; NOS = óxido nítrico sintetase;  $PDE_5$  = fosfodiesterase de tipo 5; pre-ET = pré-endotelina.

**Figura 4.** Esquema representativo

**Figura 5.** Esquema representativo da divisão dos grupos experimentais.

**Figura 6.** Registros típicos de pressão ventricular esquerda (A) pressão arterial (B) e pressão ventricular direita (C) de ratos Wistar anestesiados.

**Figura 7.** Esquema representativo da montagem da tira isolada de ventrículo direito de ratos Wistar.



**Figura 8.** Registro típico de força isométrica desenvolvida pela tira isolada de ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à frequência de estimulação de 0,5 Hz e banhados com solução Krebs-Henseleit. O pico da deflexão positiva corresponde a força isométrica desenvolvida (Modificado de Vescovi, 2013).

**Figura 9.** Registro típico de PPP da tira isolada de ventrículo direito de ratos Wistar obtidas com estimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 segundos do estímulo elétrico aplicado ao músculo (Modificado de Vescovi, 2013).

**Figura 10.** Registro típico de tétano desenvolvido pela tira isolada de ventrículo direito de ratos Wistar submetidos a frequência de 10 Hz durante 15 segundos.

**Figura 11.** Registro típico da resposta ao isoproterenol obtida na preparação de tiras isoladas de ventrículo direito de ratos Wistar. Esta resposta foi realizada com o acréscimo da concentração de isoproterenol ( $10^{-4}$  M) à solução de Krebs-Henseleit com concentração de cálcio extracelular de  $0,62 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Figura 12.** Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Modificado de Angeli, 2013).

**Figura 13.** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems .

**Figura 14.** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0,9 a 1,3 gramas); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô

da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe)  $10^{-6}$  M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$  M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal e a força em gramas (g), eixo vertical. (Angeli, 2013).

**Figura 15.** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) (Angeli, 2013).

**Figura 16.** Esquema representativo da escolha realizada para apresentação dos resultados e a análise estatística utilizada.

**Figura 17.** Avaliação temporal do peso corporal durante a exposição ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) ou salina (Controle) em animais submetidos a cirurgia fictícia no vigésimo primeiro dia após o início da exposição. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM,  $n=30$  animais por grupo.

**Figura 18.** Avaliação temporal do peso corporal durante a exposição ao cloreto de mercúrio ou salina em animais submetidos a cirurgia fictícia (Controle) ou infarto do miocárdio (INF ou  $\text{HgCl}_2$ -INF) no vigésimo primeiro dia após o início da exposição. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM,  $n = 20-30$  animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs INF e  $\text{HgCl}_2$ -INF (ANOVA 1 via).

**Figura 19.** Tamanho da área de cicatriz de animais dos grupos INF e  $\text{HgCl}_2$ -INF. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n= 35$  animais por grupo.

**Figura 20.** Condições basais da contratilidade de tiras de ventrículo direito dos grupos Controle e exposto ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ). TA: Tempo de

ativação, TR: Tempo de relaxamento, dF/dt: relação da derivada de força sobre derivada de tempo máxima positiva (dF/dt+) e máxima negativa (dF/dt-). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 10 animais por grupo.

**Figura 21.** Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos de animais dos grupos Controle e expostos ao cloreto de mercúrio (grupo HgCl<sub>2</sub>). PPP: Potenciação relativa após pausas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 10 animais por grupo.

**Figura 22.** Avaliação do influxo de cálcio transsarcolemal através do PRC de animais dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 10 animais por grupo.

**Figura 23.** Efeito da exposição durante quatro semanas ao cloreto de mercúrio na força desenvolvida durante o pico (A) e platô do tétano (B) de animais dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 10 animais por grupo.

**Figura 24.** Efeito da exposição ao cloreto de mercúrio na resposta ao agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol, de animais dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 8 animais por grupo.

**Figura 25.** Condições basais da contratilidade de tiras de ventrículo direito dos grupos Controle, INF e INF-HgCl<sub>2</sub>. TA: Tempo de ativação, TR: Tempo de relaxamento, dF/dt: derivada de força sobre derivada de tempo máxima positiva (dF/dt+) e máxima negativa (dF/dt-). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 10-12 animais por grupo. \* p< 0,05 vs Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF. # p< 0,05 vs. Controle (ANOVA 1 via).

**Figura 26.** Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos de animais dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 10-12 animais por grupo. #p< 0,05 vs. Controle (ANOVA 1 via).

**Figura 27.** Efeitos do infarto do miocárdio durante a crônica exposição ao cloreto de mercúrio na potenciação relativa de contrações isométricas de animais dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 8-10 animais por grupo. \* p< 0,05 vs. Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF, & p<0,05 vs. Controle e INF (ANOVA 1 via).

**Figura 28.** Efeito da exposição durante quatro semanas ao cloreto de mercúrio associado ao infarto do miocárdio no pico (A) e platô do tétano (B) de animais Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 10-12 animais por grupo. \* p< 0,05 vs. Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF (ANOVA 1 via).

**Figura 29.** Contratilidade de tiras de ventrículo direito dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF após a administração do fármaco isoproterenol (10<sup>-4</sup>M). Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 8-10 animais por grupo. # p< 0,05 vs. Controle (ANOVA 1 via).

**Figura 30.** Níveis protéicos de amostras do ventrículo direito dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> na análise de densitometria pela técnica de Western Blot de SERCA2a (A), PLB (B), PLB fosforilado na serina 16 (C), SERCA/PLB (D), NCX (E). Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 6-8 animais por grupo. # p< 0,05 vs. Controle (teste t-Student).

**Figura 31.** Níveis protéicos do ventrículo direito dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF na análise de densitometria pela técnica de Western Blot de SERCA2a (A), PLB (B), PLB fosforilado na serina 16 (C), SERCA/PLB (D), NCX (E). Os

resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 6-8 animais por grupo. #  $p < 0,05$  vs. Controle, \*  $p < 0,05$  vs. Controle e  $\text{HgCl}_2$ -INF, &  $p < 0,05$  vs. Controle e INF (ANOVA 1 via).

**Figura 32.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos Controle,  $\text{HgCl}_2$ , INF e  $\text{HgCl}_2$ -INF. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. \* $p < 0,05$  vs. Controle (ANOVA uma via).

**Figura 33.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B)  $\text{HgCl}_2$ , (C) INF e (D)  $\text{HgCl}_2$ -INF na presença (E+) e na ausência do endotélio vascular (E-).  $\xi p < 0,05$  teste t-Student. (E) Todos os grupos E. (F) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos na presença e ausência do endotélio vascular entre os grupos. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. \* $p < 0,05$  vs. Controle (ANOVA uma via).

**Figura 34.** Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos Controle,  $\text{HgCl}_2$ , INF e  $\text{HgCl}_2$ -INF. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. \* $p < 0,05$  vs. Controle; &  $p < 0,05$  vs.  $\text{HgCl}_2$ -INF (ANOVA uma via).

**Figura 35.** Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle,  $\text{HgCl}_2$ , INF e  $\text{HgCl}_2$ -INF.  $p > 0,05$  (ANOVA uma via)

**Figura 36.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B)  $\text{HgCl}_2$ , (C) INF e (D)  $\text{HgCl}_2$ -INF na presença e na ausência do fármaco L-NAME. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos na presença e ausência do fármaco L-NAME entre os grupos. O

número de animais utilizados estão representados entre parênteses. \* $p < 0.05$  vs Controle (ANOVA uma via).

**Figura 37.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B)  $HgCl_2$  número de animais utilizados estão representados entre parênteses. §  $p < 0,05$  vs  $HgCl_2$ -INF + 1400W (Teste t-Student não pareado).

**Figura 38.** Resultados da expressão protéica das isoformas endotelial e induzível da óxido nítrico sintase (eNOS e iNOS, respectivamente), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta abdominal dos grupos Controle,  $HgCl_2$ , INF e  $HgCl_2$ -INF. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM e como relação entre a densidade das bandas da eNOS, iNOS e da  $\beta$ -actina. Controle,  $HgCl_2$  e  $HgCl_2$ -INF vs. INF  $p < 0,05$ . O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

**Figura 39.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B)  $HgCl_2$ , (C) INF e (D)  $HgCl_2$ -INF na presença e na ausência do fármaco SOD. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. # $p < 0.05$  vs  $HgCl_2$  e & $p < 0,05$  vs  $HgCl_2$ -INF. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos na presença e ausência da enzima SOD entre os grupos  $HgCl_2$ , INF e  $HgCl_2$ -INF. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. (ANOVA uma via).

**Figura 40.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B)  $HgCl_2$ , (C) INF e (D)  $HgCl_2$ -INF na presença e na ausência do fármaco apocinina. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. \* $p < 0.05$  vs Controle e & $p < 0,05$  vs  $HgCl_2$ -INF. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos na presença e ausência

do fármaco apocinina entre os grupos. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. (ANOVA uma via).

**Figura 41.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B) HgCl<sub>2</sub>, (C) INF e (D) HgCl<sub>2</sub>-INF na presença e na ausência do fármaco alopurinol. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. \*p<0,05 vs HgCl<sub>2</sub>-INF + Alopurinol (Teste t-Student não pareado).

**Figura 42.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B) HgCl<sub>2</sub>, (C) INF e (D) HgCl<sub>2</sub>-INF na presença e na ausência da enzima catalase. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. §p<0,05 vs. condição sem o fármaco (Teste t-Student não pareado, comparando a presença e ausência da catalase em cada grupo experimental).

**Figura 43.** Resultados da expressão protéica das isoformas manganês e cobre/zinco da SOD (Mn SOD e Cu/Zn SOD, respectivamente), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média ± EPM, como relação entre a densidade das bandas da Mn SOD, Cu/Zn SOD e da β-actina. \*p<0,05. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Avaliação do peso corporal entre os grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> antes do início do tratamento e durante as subsequentes semanas de exposição.

**Tabela 2.** Parâmetros ponderais mensurados quatro semanas após o início dos experimentos.

**Tabela 3.** Parâmetros hemodinâmicos mensurados quatro semanas após o início dos experimentos.

**Tabela 4.** Avaliação do peso corporal dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF antes do início do tratamento e durante as subsequentes semanas de exposição.

**Tabela 5.** Parâmetros ponderais mensurados quatro semanas após o início dos experimentos.

**Tabela 6.** Parâmetros hemodinâmicos avaliados quatro semanas após o início dos experimentos

**Tabela 7.** Valores de resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl) em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 9.** Valores de resposta máxima (R<sub>max</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 10.** Valores de resposta máxima (R<sub>max</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença (E+) e ausência do endotélio (E-) vascular dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.



**Tabela 11.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à acetilcolina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 12.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 13.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou não do L-NAME dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 14.** Valores de resposta máxima (Rmáx) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou não do 1400W dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 15.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou ausência da enzima SOD dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 16.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou ausência do fármaco apocinina dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 16.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou ausência do fármaco alopurinol dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

**Tabela 18.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou ausência da enzima catalase dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

# INTRODUÇÃO

---

## 1 Introdução

### 1.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E DA EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO

No Brasil, as doenças crônicas não transmissíveis constituem o problema de saúde pública de maior magnitude e correspondem a 72% das causas de morte, sendo as doenças cardiovasculares responsáveis por 50% desses valores (Ministério da Saúde, 2011). De fato, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte e incapacidade funcional no Brasil e no mundo ocidental. Em 2009, no Brasil, as taxas de mortalidade ajustadas por idade e sexo foram de 228,4 óbitos por 100.000 habitantes, com discreto predomínio das taxas por doenças cerebrovasculares (70,7 por 100.000 habitantes) em relação às doenças isquêmicas do coração (69,2 por 100.000 habitantes) (de Fatima et al., 2012). Dentre as doenças que afetam o sistema cardiovascular, a doença arterial coronariana, que tem no infarto do miocárdio o seu principal efector, é responsável por aproximadamente metade dos óbitos (American Heart Association, 2012).

Sendo assim, importantes avanços na terapêutica farmacológica e no desenvolvimento de novas técnicas no manejo do paciente foram implementadas (Bocchi et al., 2012). Em conjunto, esses avanços proporcionaram a redução dos índices de mortalidade por infarto do miocárdio ao longo dos últimos anos (Kesteloot et al., 2002; Bax et al., 2003, Bocchi et al., 2012). Entretanto, mesmo com os significativos progressos terapêuticos, estes não atingiram a abrangência estimada e a incidência de doenças cardiovasculares permanece elevada. Nesse contexto, a previsão de custos diretos e indiretos no tratamento padrão do infarto agudo do miocárdio, utilizando angioplastia primária, em 2008, foi estimado em aproximadamente R\$12.900,00, custando o dobro caso se utilize o *stent*

coronário por paciente tratado no Brasil (Marques et al., 2012). Além dos altos custos hospitalares, o infarto do miocárdio provoca sensível perda da qualidade de vida do paciente, resultando em aposentadorias precoces e consequentemente em altos custos socioeconômicos para o país (Bocchi et al., 2012).

Assim, mesmo que o paciente sobreviva à injúria do infarto agudo do miocárdio, as consequências dessa doença podem ser catastróficas, como o desenvolvimento progressivo de distúrbio cardíaco funcional e/ou estrutural, que caracteriza a síndrome de insuficiência cardíaca (Bauersachs & Widder, 2008; Bocchi et al., 2012). Dados epidemiológicos evidenciam que aproximadamente 40% dos pacientes apresentam disfunção sistólica já nos primeiros dias após o infarto do miocárdio (Cleland et al., 2005). Adicionalmente, aproximadamente 80% dos óbitos após infarto do miocárdio foram precedidos de insuficiência cardíaca (Velazquez et al., 2004). De fato, a aplicação de métodos mais eficientes no tratamento precoce após a injúria cardiovascular provocada pelo infarto agudo do miocárdio e o concomitante envelhecimento populacional resultaram no aumento da incidência da insuficiência cardíaca (Najaf et al., 2009; Velagalet et al., 2008, Piegas et al., 2009). Quando a síndrome de insuficiência cardíaca é instalada no paciente, o coração é incapaz de ejetar ou se encher de sangue em taxas suficientes para manter o débito cardíaco adequado às demandas metabólicas teciduais (Bauersachs & Widder 2008), o que evidencia a intrínseca ligação temporal entre o infarto do miocárdio, a progressão para a insuficiência cardíaca e a mortalidade.

Dentre os diversos fatores de risco clássicos associados ao desenvolvimento do infarto agudo do miocárdio, encontram-se a hipertensão arterial, as dislipidemias, a obesidade abdominal, o diabetes, a inatividade física,

o hábito de fumar, o consumo excessivo de álcool, miocardites virais e autoimunes (Lanas et al., 2007; Anand et al., 2008; Bocchi et al., 2012;). Adicionalmente, é possível que outros fatores de risco possam ter importante papel na gênese dessa doença. Pode-se incluir, entre estes, os fenômenos inflamatórios, a disfunção endotelial, a resistência à insulina, os fatores genéticos e a exposição a metais pesados (Bauersachs & Schafer 2004, Vassallo et al., 2011; Braunwald, 2013).

Atualmente, tem-se destacado a íntima relação entre a exposição aos metais pesados como importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Sabe-se que a exposição crônica a metais pesados está associada ao desenvolvimento e instalação de doenças cardiovasculares como a aterosclerose, hipertensão arterial, doença da artéria coronária e infarto do miocárdio (Salonen et al., 1995; Houston 2009; Vassallo et al., 2011). No trabalho desenvolvido por Salonen e colaboradores (1995), indivíduos expostos ao mercúrio, mesmo que em níveis sub-tóxicos, apresentaram maior risco de desenvolverem doenças cardiovasculares como o infarto do miocárdio. Entretanto, mesmo com os indícios de forte associação entre exposição aos metais pesados, especialmente o mercúrio, e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, poucos estudos foram destinados a explorar os possíveis mecanismos fisiológicos envolvidos na associação dessas duas injúrias.

O mercúrio é um metal tóxico que têm seus efeitos prejudiciais ao sistema cardiovascular descritos há muitos anos (Vassallo et al., 2011). Por ser um metal amplamente utilizado, várias fontes em potencial se tornaram presentes na rotina da população mundial. Atualmente, a população em geral está exposta ao mercúrio por três fontes principais, sendo elas: o consumo de peixes

contaminados, o uso e manipulação de amálgamas dentários e o timerosal contido em vacinas (Clarkson, 2003, Vassallo et al., 2011).

Historicamente, o maior relato de grave intoxicação por mercúrio ocorreu na cidade de Minamata (Japão), através da ingestão de peixes contaminados com metilmercúrio. Entre as décadas de 20 e 60, uma empresa japonesa especializada na produção de acetaldeído e PVC despejava metilmercúrio diretamente na baía de Minamata. Estima-se que em quatro décadas foram despejados cerca de 150 toneladas de metilmercúrio na baía, ocasionando a contaminação da população que comia os peixes contaminados provenientes da baía. No total, dois milhões de pessoas foram expostas, 900 pessoas morreram e 3000 pessoas sofreram a “Doença de Minamata” (Asano et al., 2000). A “Doença de Minamata” foi caracterizada por danos cerebrais, ataxia, retardo mental, danos hepáticos, hipertensão arterial, convulsões e distúrbios metabólicos (Eto 2000; Eto, 2006). 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 devido a grande quantidade de metal lançado no ambiente pelas atividades de garimpo (Cleary, 1994). A exposição populacional ocorria através da inalação do vapor de mercúrio pelos garimpeiros e pelo consumo de peixes contaminados com metilmercúrio através do fenômeno da bioacumulação (Hacon et al, 1997; Hacon et al., 2000). Com isso, os níveis sanguíneos de mercúrio em indivíduos que consomem peixes regularmente é de 5,65 ng/ml (McKelvey et al., 2007). Estima-se que esses valores aumentam o risco de episódios isquêmicos no miocárdio (Salonen et al, 1995; Rissanen et al., 2000).

Além da contaminação ambiental, outra importante fonte de exposição ao mercúrio é a ocupacional. 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 ao vapor de mercúrio e ao mercúrio inorgânico, visto que este metal é amplamente empregado na rotina desses profissionais (Zavariz Gina, 1992; Asano et al., 2000; Mahaffey, 2005). Em trabalhadores expostos a manipulação de amálgamas dentários, a exposição ocupacional ao vapor de mercúrio pode ocorrer durante a produção, implantação e remoção das amálgamas. Além disso, importantes estudos desenvolvidos por Halbach e colaboradores (1995/2008) observaram que após a retirada da restauração, a concentração sanguínea de mercúrio pode alcançar níveis sanguíneos de 5 nmol/L (Halbach, 1995; Halbach et al., 2008). Adicionalmente, estudos apontam valores sanguíneos compreendidos entre 7-10 ng/ml de cloreto de mercúrio em trabalhadores expostos. Esses níveis são capazes de induzir a instalação de doenças cardiovasculares (Gupta et al., 1996; Chen et al., 2005).

Outra fonte em potencial de exposição ao mercúrio ocorre através do composto organomercurial, o timerosal, que desde o ano de 1930 vem sendo amplamente utilizado como conservante em drogas biológicas, como vacinas e soros (Federal Food and Drug Administration, 2009). Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil, o timerosal encontra-se como componente da formulação de diversas vacinas administradas (Ministério da Saúde, 2001). Porém à múltipla exposição à vacinas contendo timerosal em indivíduos durante o período gestacional ou infantil coloca em dúvida a segurança da utilização deste composto como estabilizante de vacinas (Dórea et al., 2013). Estudo realizado no Brasil, mostrou que a concentração de mercúrio sanguíneo em escolares após a vacinação contra hepatite B foi de 4,2 a 21,1 µg/Kg (Dórea et al., 2009), e isso pode ser relacionado como causa de doenças neurológicas e cardíacas em crianças (Geiger e Geiger, 2003).

## 1.2 ALTERAÇÕES CARDÍACAS PRESENTES NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E NA EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO

Em condições normais, o coração opera como fonte geradora de força para o bombeamento sanguíneo adequado, o que permite a perfeita distribuição dos nutrientes às células e delas recolhe os dejetos metabólicos produzidos pelas inúmeras reações bioquímicas necessárias à conservação da vida celular (Braunwald, 2013). Por desempenhar função crucial na manutenção da vida, qualquer doença que afete o aparelho cardiovascular, pode ocasionar um desfecho clínico desfavorável, até a morte do indivíduo. Com isso, pesquisas que visam compreender os fenômenos envolvidos nas doenças cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio, receberam destaque na comunidade científica nas últimas décadas, sendo foco de estudo de diversos grupos de pesquisas.

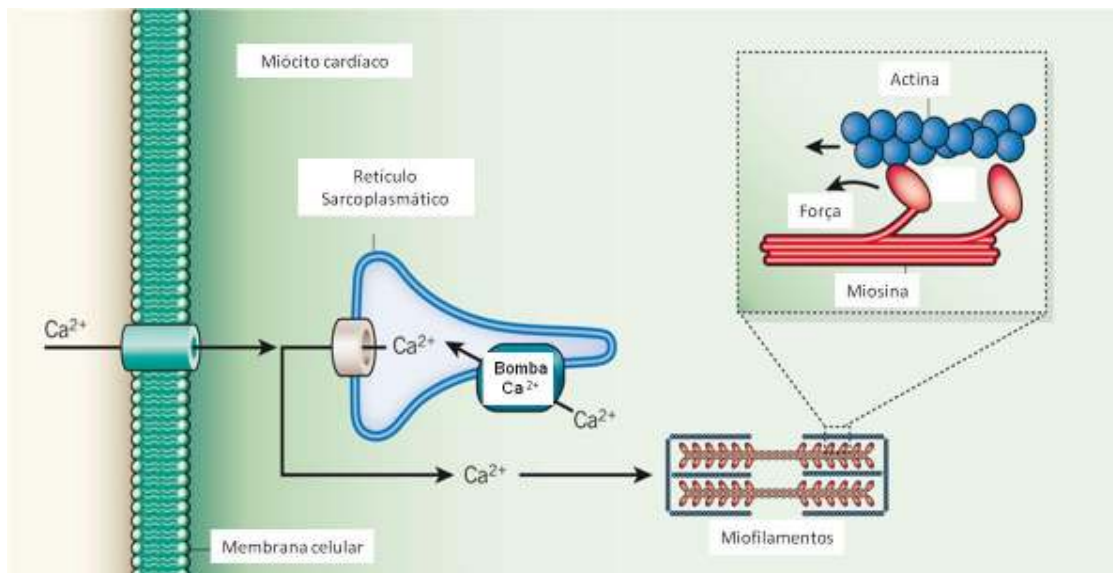
Atualmente o modelo experimental mais utilizado para estudar os efeitos do infarto do miocárdio é o da ligadura permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda em ratos (Johns & Olson, 1954, Pfeffer et al., 1985; Mill et al., 1990; Zornoff et al., 2009). Este modelo consegue simular os principais eventos observados na cardiopatia isquêmica humana, como por exemplo, a perda celular aguda, a reação inflamatória associada, o remodelamento de matriz extracelular, assim como todas as disfunções cardíacas e vasculares observadas em humanos (Zornoff et al, 2009; Mill et al., 2011).

Sabe-se que o coração necessita do desencadeamento de diversos mecanismos organizados sequencialmente para que sua capacidade contrátil não entre em colapso estrutural e/ou funcional. Portanto, em condições de funcionamento normal, o cálcio desempenha papel crucial no complexo processo conhecido como acoplamento excitação-contração cardíaco (Lederer et al., 2013).



Esse processo envolve uma coordenada cascata de eventos que depende inicialmente do aumento passageiro da concentração intracelular de cálcio, que resultará na estimulação da formação das pontes cruzadas entre os miofilamentos e as proteínas contráteis (Bers & Harris, 2011).

O processo do acoplamento excitação-contração se inicia a partir da deflagração do potencial de ação cardíaco, quando o influxo de cálcio ocorre via canais ativados por despolarização (canais para cálcio do tipo L), contribuindo para a formação do platô do potencial de ação. A manutenção do platô do potencial de ação cardíaco é mantido pelo fenômeno conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio, onde o influxo inicial do cálcio promove liberação de cálcio dos estoques intracelulares, sendo o retículo sarcoplasmático o principal reservatório, ao ativar os canais de rianodina. Em conjunto, o influxo de cálcio durante o potencial de ação e a sua liberação dos estoques intracelulares permitem que ocorra a ligação direta desse íon aos miofilamentos, o que será responsável pela gênese da força e encurtamento muscular (Bers & Harris, 2011; Lederer et al., 2013; Bers 2014). Ou seja, quando o cálcio atinge níveis intracelulares em torno de  $10^{-5}M$ , ocorre o favorecimento de sua ligação à troponina C. Essa interação permite 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 fosfato inorgânico que resulta na liberação da energia necessária para que ocorra o deslizamento dos miofilamentos, proporcionando a contração muscular (Bers & Harris, 2011; Lederer et al., 2013; Bers 2014). Essa sequência de eventos pode ser observada na Figura 1 de forma simplificada e na Figura 2 (setas vermelhas).

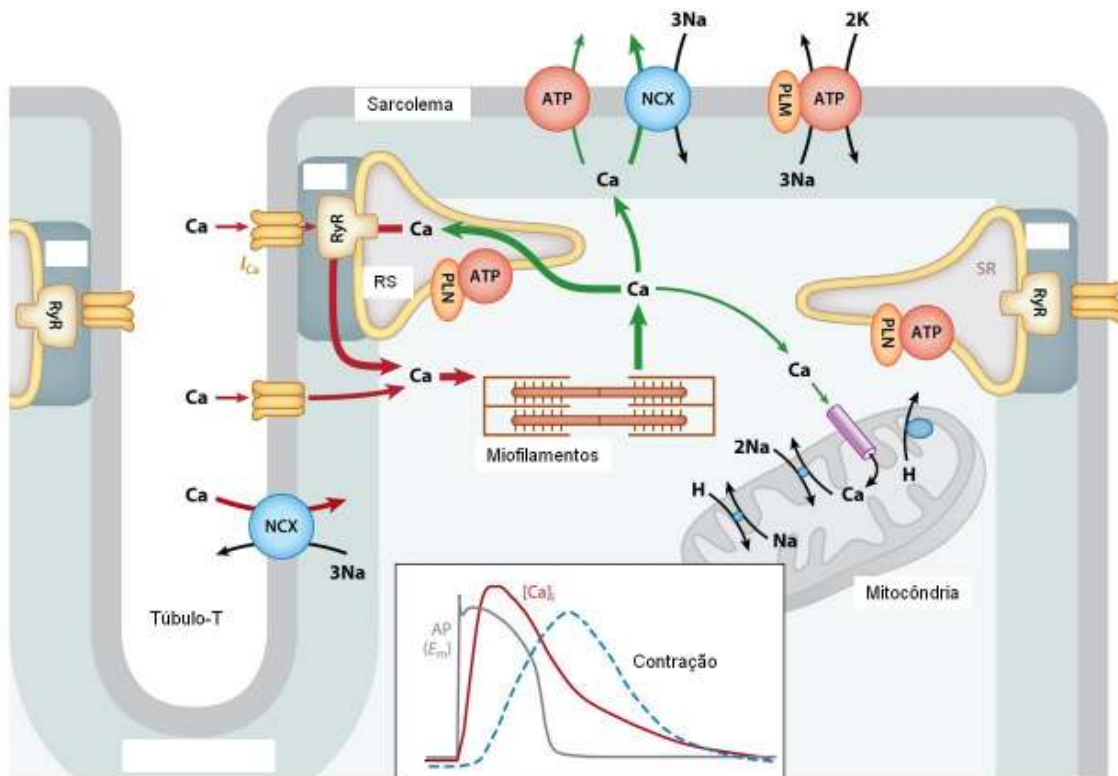


**Figura 1.** Esquema simplificado do influxo de cálcio e da deflagração da formação das pontes cruzadas em miócitos cardíacos. Modificado de Bers & Harris, 2011.

Em contrapartida, em situações de doença, estima-se que a homeostase anormal de cálcio colabore para o desenvolvimento e instalação da disfunção cardíaca como aquela presente na insuficiência cardíaca decorrente do infarto do miocárdio (Houser et al., 2000; Braunwald, 2013). Estudos mostraram que a sinalização do cálcio entre a superfície da membrana sarcolemal e o retículo sarcoplasmático encontra-se prejudicada, em outras palavras, o influxo de cálcio através do canais para cálcio tipo L são menos efetivos em disparar a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em miócitos hipertrofiados e insuficientes (Orchard & Brette, 2008). Com isso, a formação das pontes cruzadas e consequentemente a contração cardíaca pode ser prejudicada (Mill et al., 1998; Setefanon et al., 2013, Braunwald, 2013).

Uma vez completada a fase de contração cardíaca que se reflete através da ejeção de sangue pelo coração, termina a fase de sístole e começa o processo de diástole. A diástole cardíaca se inicia com a liberação do cálcio de sua ligação com a troponina C e a concomitante redução da sua concentração do meio intracelular (Lederer et al., 2013, Bers, 2014). Para isso, o cálcio passa a ser

removido para o meio extracelular e para os compartimentos intracelulares que o estocam (Figura 2, setas verdes). O transporte de cálcio para fora do citosol envolve a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), a bomba de cálcio do sarcolema e o uniporte de cálcio mitocondrial (Lederer et al., 2013, Bers, 2014). Assim, além de exercer papel fundamental na liberação de cálcio ativada por cálcio na gênese da contração miocárdica, o retículo sarcoplasmático também auxilia na recaptação de cálcio, resultando na redução da concentração desse íon no citoplasma. A principal responsável pela recaptação de cálcio nessa organela é a SERCA2a do retículo sarcoplasmático. O fosfolambam (PLB) é o inibidor endógeno da SERCA2a que quando fosforilado, devido ao aumento do AMPc (ativando PKA) ou cálcio-calmodulina quinase (CaMKII), deixa de inibir a bomba e permite o influxo ativo de cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático. Desta forma, a fosfolambam é uma importante proteína reguladora do relaxamento do miocárdio durante a diástole, por acelerar a remoção intracelular de cálcio, além de contribuir na manutenção do conteúdo de cálcio sarcoplasmático (Bers, Couchonal & Anderson, 2008). Adicionalmente, o NCX funciona com a estequiometria de 3:1, ou seja, três íons sódio fluem para o meio intracelular à medida que um íon cálcio é retirado do interior da célula. Torna-se evidente que as ações coordenadas entre os canais para cálcio tipo-L do sarcolema, a SERCA-2a e o NCX permitem ao miócito cardíaco manter o balanço normal de cálcio batimento a batimento do coração (Lederer et al., 2013, Bers, 2014).



**Figura 2.** Entrada (setas vermelhas) e extrusão (setas verdes) do cálcio no miócito cardíaco (Modificado de Bers, 2014). ATP: trifosfato de adenosina, Ca: íon cálcio, PLN: fosfolamban, I<sub>Ca</sub>: corrente do íon cálcio, NCX: trocador Na/Ca, RyR: receptor de rianodina

Nesse contexto, alterações nos mecanismos de extrusão de cálcio também podem alterar a contratilidade cardíaca, visto que interferem na concentração intracelular do cálcio (Bers, 2014). Estudos evidenciam que músculos cardíacos insuficientes apresentam redução na desvolução de restabelecer os níveis do cálcio durante a diástole, ocasionando prejuízo no ciclo de contração e relaxamento cardíaco (Braunwald, 2013). Estima-se que a liberação de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático encontra-se reduzida em pacientes com insuficiência cardíaca (Ahlers et al. 2005). Ainda, essa redução está associada ao menor influxo de cálcio durante a fase de despolarização, o que prejudica o processo de liberação de cálcio induzida por cálcio que ocorre através dos receptores de rianodina (Stern, 1992). Especula-se que os mecanismos

envolvidos na redução da liberação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático se deva à redução da recaptção de cálcio pela SERCA-2a, aumento na extrusão de cálcio pelo NCX e/ou aumento no vazamento de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Bers et al., 2003; Lederer et al., 2013; Bers, 2014). É importante ressaltar que o aumento da expressão da fosfolambam está associado à diminuição da afinidade da SERCA-2a pelo cálcio (Frank et al., 2003), resultando em prejuízo na recaptção desse íon durante a diástole. Em conjunto, essas alterações na dinâmica do cálcio, prolongam o tempo despendido durante a fase de relaxamento o que ocasiona o aumento da rigidez da câmara cardíaca e conseqüentemente a redução da geração de níveis satisfatórios de pressão sistólica e restrição diastólica (Gwathmey et al., 1987; Sikkil et al., 2014).

É notório que muitas das alterações cardíacas observadas após o evento isquêmico do infarto agudo do miocárdio também ocorram em outras doenças. Somando a isso, destaca-se outra importante injúria responsável por alterar a dinâmica do cálcio na contratilidade cardíaca que é a exposição a metais pesados. Diversos estudos mostram que diferentes concentrações de cloreto de mercúrio influenciam na cinética do cálcio ativador, na atividade das proteínas contráteis, no funcionamento do retículo sarcoplasmático e na inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA), da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase miosínica, da SERCA2a e da  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Shammo e MacLennan, 1975; Brunder et al., 1988; Halbach et al., 1989; Anner et al., 1990; Oliveira et al., 1994; da Cunha et al., 2001; Assis et al., 2003; Moreira et al., 2003). Essa alteração na homeostase do cálcio, pode prejudicar a correta formação e propagação do potencial de ação cardíaco, que poderá repercutir no funcionamento normal da bomba cardíaca.

Furieri e colaboradores (2011a) observaram que a exposição durante 30 dias a baixa concentração de cloreto de mercúrio (8 ng/ml no sangue), prejudicou

o relaxamento do ventrículo esquerdo de ratos anestesiados, o efeito inotrópico negativo em corações isolados e ocasionou o aumento da atividade da ATPase miosínica e inibição da NKA. Adicionalmente, esses corações apresentaram expressão protéica reduzida da SERCA-2a e aumentada do fosfalambam. Ainda, a razão SERCA2a/PLB, que indiretamente nos permitem inferir sobre a funcionalidade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, também estava reduzida após a exposição crônica ao cloreto de mercúrio (Furieri et al., 2011a).

Entretanto, estudos envolvendo injúrias como o infarto agudo do miocárdio e a exposição crônica a metais tóxicos estão voltados para as disfunções que acometem o ventrículo esquerdo, o que resulta na escassez de estudos que busquem avaliar a câmara cardíaca direita. Sendo assim, apesar da ampla evidência de que a função do ventrículo direito é determinante na resposta clínica de diversas doenças cardiovasculares, pouco se conhece dos mecanismos fisiológicos envolvidos em circunstâncias normais e em resposta às condições patológicas (Walker & Buttrick, 2013).

A disfunção ventricular direita, desde a década de oitenta, figura como forte e independente preditor de mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca (Polak et al., 1983). A disfunção sistólica do VD é o maior fator de risco para morte, morte súbita, insuficiência cardíaca e acidente vascular encefálico após o infarto do miocárdio em humanos (Anavekar et al., 2008). No estudo de Polak et al. (1983) foi observado que pacientes com insuficiência cardíaca pertencentes às classes funcionais II-IV, segundo NYHA, apresentaram forte correlação entre os anos de sobrevida e a fração de ejeção do VD. Nesse estudo, os pacientes foram acompanhados durante dois anos, aqueles que apresentaram fração de ejeção do ventrículo direito menor que 35%, foi observada apenas 23% de sobrevida, entretanto os pacientes com função normal do VD, apresentaram 71% de

sobrevida, independente da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Outros estudos, confirmaram esses achados clínicos e adicionaram o aumento nos valores de pressão da artéria pulmonar e, também, o aumento do diâmetro da câmara do VD como indicadores mais fortemente associados à sobrevida que se comparado a fração de ejeção do ventrículo esquerdo isolada (Di Salvo et al., 1995; Groote et al., 1998). Todavia, poucos estudos exploraram a avaliação da funcionalidade da câmara ventricular direita em situações de co-morbidades, como o que ocorre em indivíduos expostos ao cloreto de mercúrio e que venham sofrer o infarto do miocárdio.

### 1.3 ALTERAÇÕES VASCULARES PRESENTES NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E NA EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO

Com base histológica de que o endotélio vascular é constituído por uma única camada de células epiteliais pavimentosas, inicialmente acreditava-se que sua função era de servir apenas como barreira física entre o sangue e a camada média do músculo liso vascular. Somente em 1977, Moncada e colaboradores relataram a primeira indicação de que o endotélio vascular possuía fundamental importância no controle do tônus vascular, devido a constatação da produção de substâncias vasoativas. Vários estudos subsequentes relataram que além de atuarem no controle do tônus vascular, as células endoteliais sintetizam e liberam fatores que regulam a angiogênese e as respostas inflamatórias. Adicionalmente, são responsáveis pela manutenção do balanço entre a estimulação e a inibição da proliferação e migração das células do músculo liso vascular, além de prevenirem a agregação plaquetária e a trombose (Félétou & Vanhoutte, 2009).

As substâncias vasoativas podem ser superficialmente subdivididas em dois grandes grupos, sendo eles, substâncias potencialmente vasodilatadoras e

substâncias potencialmente vasoconstritoras. Nesse contexto, sabe-se que os principais fatores relaxantes derivados do endotélio vascular são: óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Furchogott & Zawadski, 1980) e a prostaciclina (Moncada et al., 1977). Dentre os fatores contráteis, os principais são: a angiotensina II (Skeegs et al., 1954), endotelina-1 (ET-1) (Yanagisawa et al., 1988), ânion superóxido (Rubany & Vanhoutte, 1986) e derivados da via do ácido araquidônico, o tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) e as prostaglandinas  $H_2$  e  $F_{2\alpha}$  (PGH<sub>2</sub> e PG F<sub>2 $\alpha$</sub> ) (Frolich & Fortermann, 1989).



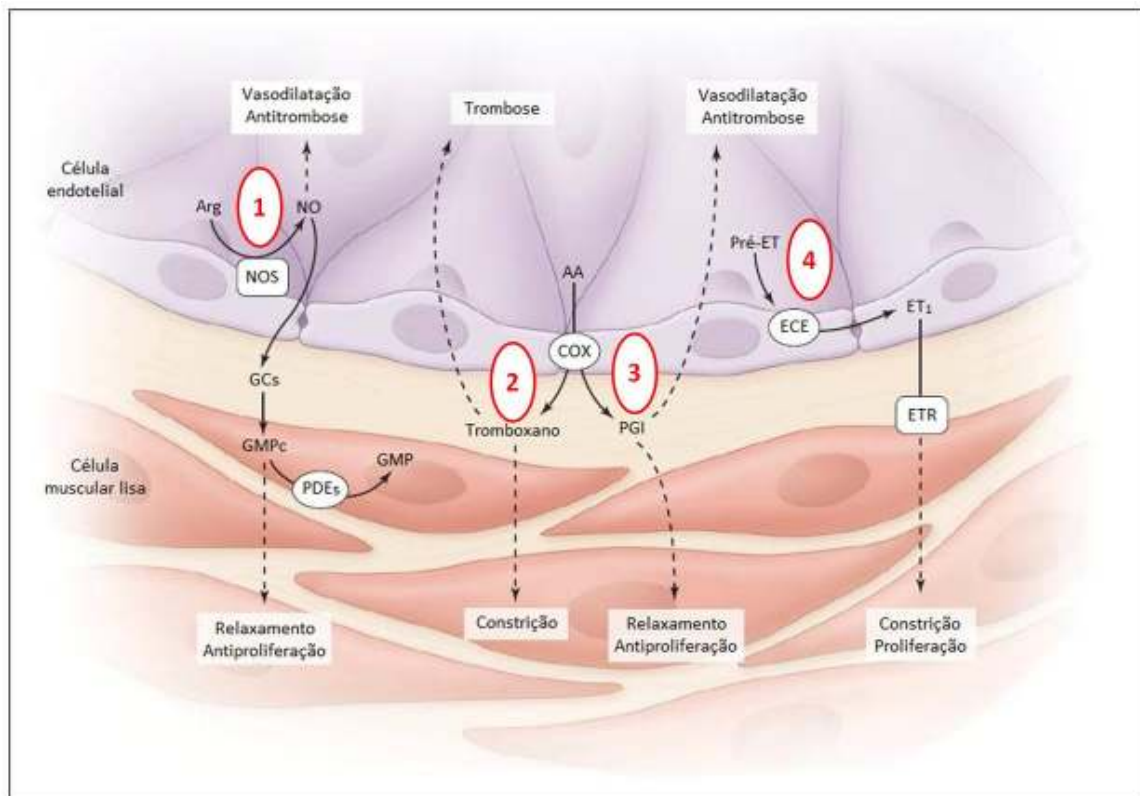


Figura 3. Esquema representativo de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio vascular intacto e suas repercussões na circulação sistêmica e no músculo liso vascular. (1) Via do óxido nítrico (NO) - vasodilatadora, (2) e (3) Via inflamatória - vasodilatadora e vasoconstritora, (3) Via da endotelina - vasoconstritora. AA = ácido araquidônico; Arg = arginina; cGMP = monofosfato de guanosina cíclico; COX = ciclo-oxigenase; ECE = enzima conversora de endotelina; ET<sub>1</sub>= endotelina 1; ETR = receptor de endotelina; GCs = guanilato ciclase solúvel; GMP = monofosfato de guanosina; NOS = óxido nítrico sintetase; PDE<sub>5</sub> = fosfodiesterase de tipo 5; pre-ET = pré-endotelina.

Sabe-se que as substâncias produzidas pelo endotélio vascular possuem importantes ações locais e sistêmicas, sendo que o prejuízo no seu equilíbrio fisiológico caracteriza o fenômeno descrito como disfunção endotelial, comumente presente em doenças que afetam o sistema cardiovascular, como a hipertensão arterial, aterosclerose, diabetes e a insuficiência cardíaca (Bauersachs & Widder 2008; Sena et al., 2013).

Na insuficiência cardíaca, o bombeamento sanguíneo ineficiente realizado pelo coração aumenta a resistência vascular periférica resultando no aumento da pós-carga. Estima-se que o aumento da resistência vascular periférica acontece principalmente devido a redução na vasodilatação periférica, como consequência da redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (Bauersachs & Widder, 2008). De fato, pacientes com insuficiência cardíaca apresentam disfunção endotelial que é comumente caracterizada pelo prejuízo no relaxamento vascular devido a baixa biodisponibilidade de óxido nítrico (Drexler et al., 1992; Katz et al., 1992; Katz et al., 2005). Além disso, a redução na resposta vasodilatadora é mais evidente em pacientes com insuficiência cardíaca causada por isquemia quando comparada àqueles que desenvolvem insuficiência cardíaca por causas não-isquêmicas (Klosinska et al., 2009).

Durante a instalação e o desenvolvimento da disfunção endotelial, vários mecanismos compensatórios são ativados na tentativa de restabelecer a homeostase tecidual. Esses mecanismos, incluem ações neuro-humorais e próprias do endotélio vascular, têm importante participação na disfunção endotelial observada em pacientes com insuficiência cardíaca e em modelos experimentais rotineiramente utilizados para avaliação dessa doença (Bauersachs & Widder, 2008). No entanto, a constante ativação desses mecanismos compensatórios pode ocasionar danos ainda maiores ao tecido em recuperação. Nessas circunstâncias, à ativação adrenérgica, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, e o concomitante aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), especialmente o peróxido nítrico, e a inadequada reserva antioxidante levam a redução da biodisponibilidade de NO (Bauersachs & Widder, 2008, Föstermann, 2008).

A redução da biodisponibilidade do NO está associado a doenças vasculares (Stroes et al., 1998; Frostermann e Munzel, 2006). Pacientes diagnosticados com insuficiência cardíaca severa (classificação funcional IV, segundo NYHA) apresentaram forte associação entre o prejuízo da função endotelial e o alto índice de mortalidade nesses indivíduos (Shechter et al. 2009). O estudo realizado por Katz et al. (2005) observou que após a manobra experimental conhecida como dilatação mediada por fluxo, pacientes diagnosticados com insuficiência cardíaca que apresentavam menor diâmetro da artéria braquial foram associados a pior taxa de sobrevivência. Em conjunto, esses trabalhos sustentam a idéia de que o NO tem participação fundamental na regulação da função vascular, tendo assim repercussões cardíacas. Com isso, a redução da biodisponibilidade do NO tornou-se importante preditor do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Bauersachs e Schaffer, 2004; Bauersachs e Wider, 2008).

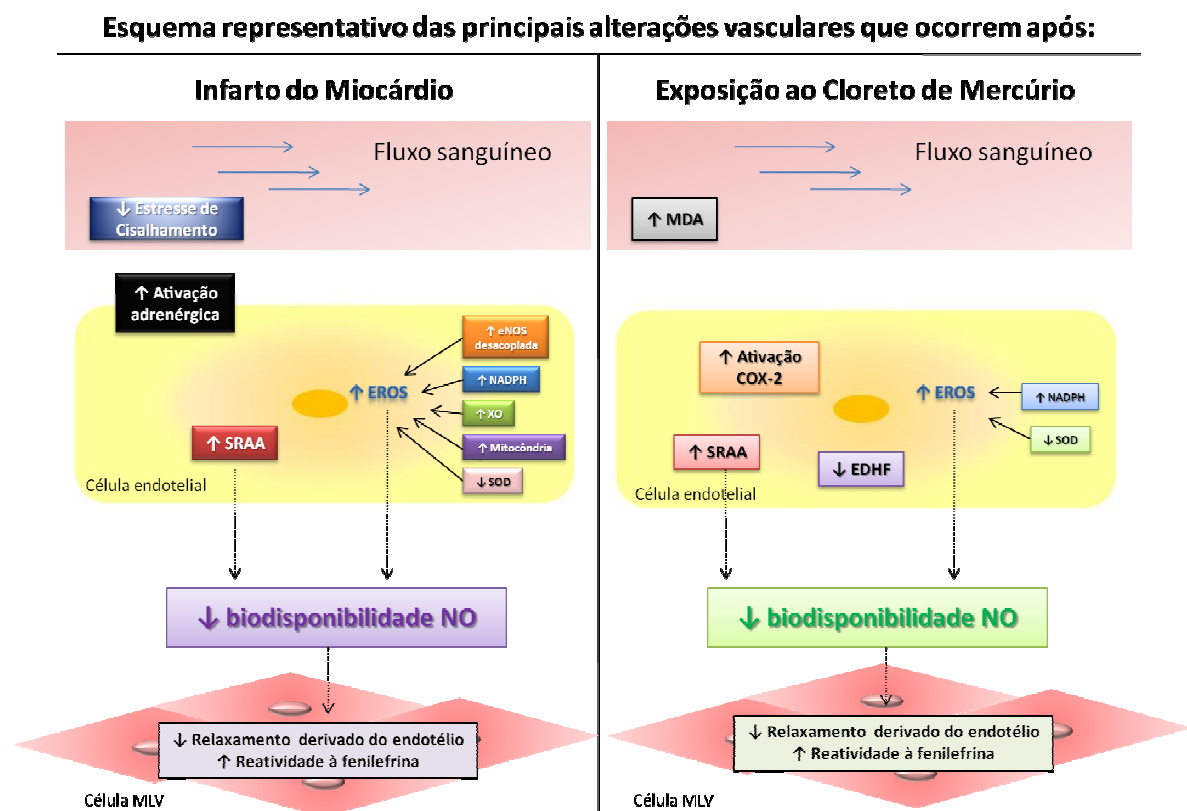
Importante fator responsável pela redução da biodisponibilidade do NO é o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Griendling & Alexander 1997; Rey e Pagano 2002). Quando a produção dessas substâncias pró-oxidantes supera a de antioxidantes, um estado de desequilíbrio é instalado, sendo chamado de estresse oxidativo. Com isso, a reação do NO com EROs, principalmente ânion superóxido, produz substâncias tóxicas como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e radicais hidroxila, que ao inibir a atividade biológica do NO, reduzem a resposta de relaxamento derivado do endotélio (Grunfeld et al, 1995; Kerr et al, 1999).

Várias fontes produtoras de radicais livres já foram descritas, entre elas destacam-se a NADPH oxidase, xantina oxidase, eNOS desacoplada e cadeia respiratória da mitocôndria (Bauersachs & Widder, 2008; Wesler & Bast, 2010;

Kim & Byzova, 2014). Dworakowski e colaboradores (2008) observaram aumento na produção de EROs proveniente da NADPH oxidase em veias safenas retiradas de pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Além disso, a atividade da xantina oxidase vascular encontra-se aumentada, em torno de 200%, em pacientes com insuficiência cardíaca crônica e isso está inversamente relacionado com a capacidade vasodilatadora dependente do endotélio nesses pacientes (Landmesser et al., 2002). De fato, a produção das EROs estão associadas ao desenvolvimento da disfunção endotelial que acomete pacientes com hipertensão, aterosclerose, diabetes, infarto do miocárdio e exposição a metais pesados (Vassallo et al., 2011; Rajendran et al., 2013; Angeli JK et al., 2013).

Atualmente, vários estudos relatam a presença de disfunção endotelial após exposição a metais pesados, especialmente cloreto de mercúrio (Wiggers et al. 2008, Furieri et al., 2011b; Rizzeti et al., 2013). Em aorta de ratos, a exposição aguda a baixas concentrações de cloreto de mercúrio (6 nM, in vitro) aumentou a reatividade vascular a fenilefrina, provavelmente devido ao aumento na produção das espécies reativas de oxigênio com consequente redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (Lemos et al., 2012). Além disso, ratos que recebiam doses diárias de 0,16 mg/kg de HgCl<sub>2</sub> por 30 dias demonstraram diminuição da capacidade antioxidante plasmática e aumento significativo de radicais livres circulantes (Gutierrez et al., 2006). Já aqueles que foram submetidos a exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio reduziram o relaxamento induzido pela acetilcolina devido ao aumento na produção de EROs provenientes da NADPH oxidase em aorta de ratos e do aumento da concentração plasmática de MDA (malondialdeído) (Wiggers et al. 2008b). Utilizando o mesmo modelo de exposição também foi demonstrado que os

animais submetidos a exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio apresentaram 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 prostanoídes vasoconstrictores (Furieri et al., 2011b).



**Figura 4.** Esquema representativo das principais alterações vasculares que ocorrem após o infarto do miocárdio ou após a exposição ao cloreto de mercúrio.

Nesse contexto, a exposição a metais pesados tem sido associado como importante causa no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, por exemplo, hipertensão, aterosclerose, doença arterial coronariana e infarto do miocárdio (Houston, 2007, Houston, 2011, Vassallo et al., 2011, Parck et al., 2013). Guallar e colaboradores (2002) observaram em um importante estudo caso-controle a associação entre os níveis de mercúrio presentes em amostras de unha estavam

intimamente relacionados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Gualar et al., 2002). Entretanto, até o presente momento, assim como foi observado no âmbito cardíaco, nenhum estudo foi desenvolvido com o objetivo de descrever os mecanismos envolvidos na associação entre a exposição ao cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio em vasos de condutância.

## **OBJETIVO**

---

## **2 OBJETIVO**

O objetivo principal deste trabalho foi testar a hipótese de que injúria do infarto agudo do miocárdio na presença da exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio causa danos na contratilidade miocárdica e na função vascular de ratos.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar o modelo de insuficiência cardíaca em ratos
- Avaliar a contratilidade de tiras isoladas do ventrículo direito e a participação das proteínas contratéis do cálcio
- Avaliar a reatividade vascular em anéis isolados de aorta para estudo da via do óxido nítrico sintase e espécies reativas de oxigênio.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO**

Para este trabalho foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com peso corporal variando entre 170-210 gramas (8 semanas de idade), provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Estes animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e submetidos ao ciclo claro-escuro de 12 horas, sob condições controladas de temperatura, tendo livre acesso à água e ração padrão para roedores.

Todos os protocolos descritos foram realizados seguindo procedimentos éticos e em conformidade com as normas da legislação vigente para a prática didático-científica da vivisseção de animais de acordo com a Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (CEUA/UFES) regulamentado pela portaria 087/2011 de 29 outubro de 2011.

##### **3.1.1 Grupos Experimentais**

Os animais foram aleatoriamente selecionados para a realização dos procedimentos de exposição crônica ao cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio:

###### **3.1.1.1 Exposição crônica ao cloreto de mercúrio**

Os animais do grupo Controle receberam, diariamente, injeções intramusculares de solução salina isotônica (NaCl 0,9% - 0,33 mL/Kg) durante o período de 4 semanas. Os animais pertencentes ao grupo HgCl<sub>2</sub> receberam, no primeiro dia do tratamento, injeção intramuscular contendo 4,6 µg/Kg de cloreto de mercúrio. Nos dias subsequentes, levando em consideração que a meia-vida

do cloreto de mercúrio é de 37 dias (Azevedo, 2003), os ratos receberam doses diárias de reforço (0,07 µg/kg) contendo somente a quantidade estimada de excreção diária desses animais, segundo protocolo experimental desenvolvido por Wiggers et al. (2008a). As soluções contendo cloreto de mercúrio eram diluídas em solução salina isotônica. Ainda, para suplementação correta da solução de cloreto de mercúrio a ser administrada, os animais foram pesados regularmente.

Como previamente descrito, essa exposição produz concentração sanguínea de aproximadamente  $7,97 \pm 0,59$  ng/mL de HgCl<sub>2</sub>, sendo que esses valores parecem se estabilizar a partir da terceira semana de exposição (Wiggers et al. 2008a).

### *3.1.1.2. Técnica utilizada na produção do infarto do miocárdio*

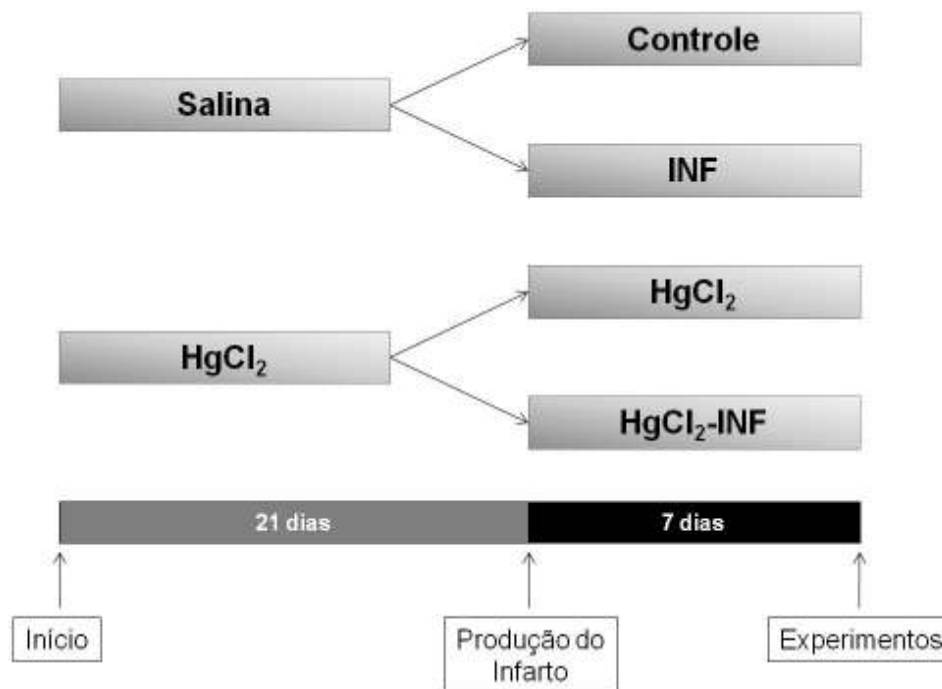
Ao final da terceira semana de exposição (21° dia), os animais de ambos os grupos (Controle e HgCl<sub>2</sub>) foram submetidos ao procedimento de indução do infarto do miocárdio, que foi realizado de acordo com a técnica padrão em nosso laboratório (Mill et al., 1990), seguindo a descrição original feita por Johns e Olson (1954), sucintamente descrita abaixo.

Os animais, após serem pesados, eram anestesiados com mistura de ketamina (50 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) que foi administrada por via intraperitoneal. Em seguida, foram posicionados e fixados em decúbito dorsal sobre mesa cirúrgica. A região torácica esquerda foi tricotomizada com corte cutâneo paraesternal e após a divulsão dos músculos peitorais, as costelas foram expostas. O coração foi rapidamente exteriorizado após toracotomia e aplicação de leve pressão de sentido póstero-anterior na caixa torácica. A aproximadamente 3 mm de sua origem, o ramo interventricular da artéria

coronária esquerda foi ocluída permanentemente por sutura simples, com fio mononylon 6.0. (Medline, Brasil). O coração foi reintroduzido no tórax e a toracotomia foi rapidamente fechada por sutura em forma de bolsa. Quando os movimentos respiratórios não eram reassumidos espontaneamente, foi promovida hiperinsuflação pulmonar. Os ratos que foram submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico, com exceção da oclusão da artéria coronária (cirurgia fictícia), formaram os grupos controles (Controle e HgCl<sub>2</sub>).

Ao final de ambos os procedimentos, os animais foram classificados em quatro grupos experimentais (Figura 5):

1. Grupo Controle: submetidos à injeções diárias de salina e cirurgia fictícia.
2. Grupo cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>): submetidos à exposição crônica ao cloreto de mercúrio e cirurgia fictícia.
3. Grupo infarto do miocárdio (INF): submetidos à injeções diárias de salina e à oclusão permanente da artéria coronária.
4. Grupo cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio (HgCl<sub>2</sub>-INF): submetidos à exposição crônica ao cloreto de mercúrio e à oclusão permanente da artéria coronária.



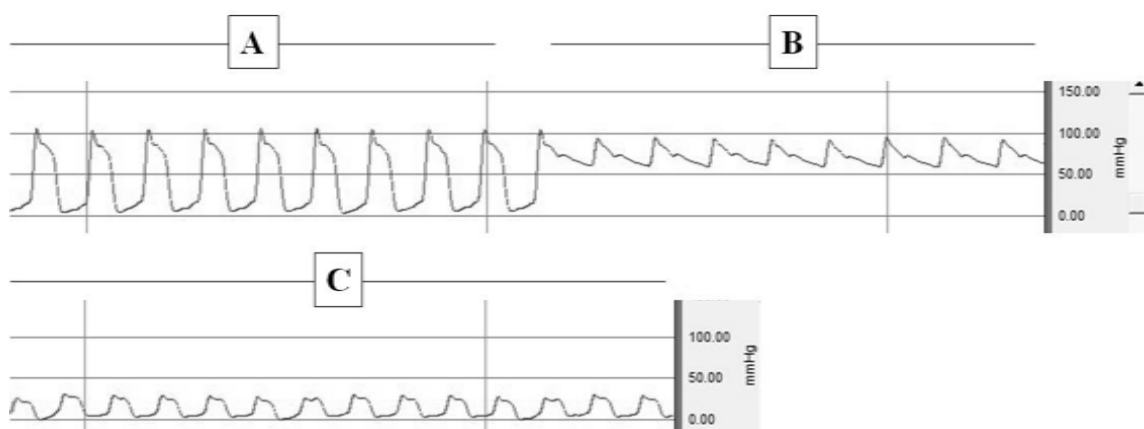
**Figura 5.** Esquema representativo da formação dos grupos experimentais.

### 3.2 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Para avaliar a associação da crônica exposição ao cloreto de mercúrio com o infarto do miocárdio na função hemodinâmica, quatro semanas após o início dos experimentos, os animais foram pesados, anestesiados com mistura de ketamina (70mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos à cirurgia para cateterização da artéria carótida e veia jugular direitas, pela qual se pode medir a pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD). Ainda, quando no ventrículo esquerdo (VE), as pressões sistólica do VE (PSVE) e pressão diastólica final do VE (PDFVE), e quando no ventrículo direito (VD) as pressões sistólica do VD (PSVD) e pressão diastólica final do VD (PDFVD). O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação da dose utilizada. Para a cateterização, foi utilizado cateter de polietileno PE 50 (Clay-Adams), preenchido com solução de heparina (50 UI/ml). Os valores de pressão foram coletados após estabilização do

registro, e representam a média de no mínimo 10 ciclos cardíacos consecutivos. A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir do registro de pressão arterial sanguínea pulsátil.

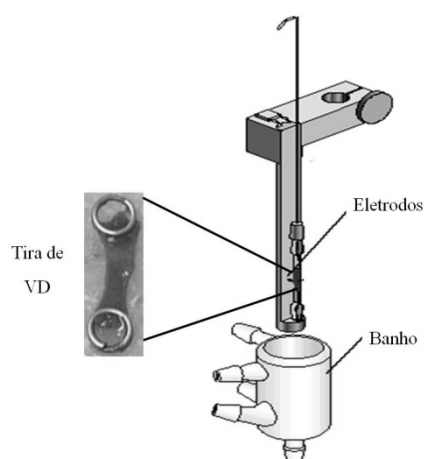
A PAS e PAD e as PSVE, PDFVE, PSVD e PDFVD foram mensuradas através de transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac) conectado ao sistema de aquisição de dados (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA), utilizando taxa de amostragem de 2000 amostras/ segundo, enviados ao computador e salvo para análise posterior. Um registro típico dessas aferições estão representados na Figura 6. A frequência cardíaca (FC) foi calculada a partir do registro de pressão sanguínea pulsátil e as derivadas de (dP/dt) máxima positiva e máxima negativa do VE e VD foram obtidas dos registros de ondas de pressão intraventricular esquerda em função do tempo.



**Figura 6.** Registros típicos de pressão intraventricular esquerda (A), pressão arterial (B) e pressão intraventricular direita (C) de ratos Wistar anestesiados.

### 3.3 ESTUDO FUNCIONAL DE TIRAS ISOLADAS DO VENTRÍCULO DIREITO

Em parte dos animais, ao fim da avaliação hemodinâmica, ainda sob plano anestésico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o tórax foi aberto e o coração cuidadosamente removido. Através do coto da aorta, o coração foi continuamente perfundido com solução de Krebs-Henseleit modificada contendo NaCl 120 mM, KCl 5,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 27 mM e glicose 11 mM. A solução foi gaseificada com mistura carbogênica contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>, a temperatura de 30°C. Em plataforma de parafina, o VD foi separado do VE e teve uma tira retirada no sentido longitudinal. Em seguida, suas extremidades foram presas a anéis de aço inoxidável (0,5 cm de diâmetro) e as tiras foram suspensas verticalmente em câmara de vidro previamente preenchida com 20 mL da solução nutritora de Krebs. As extremidades superiores foram conectadas pelo anel e um fio de aço ao transdutor de força isométrica e as extremidades inferiores foram fixadas pelo anel ao gancho fixo da cuba (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema representativo do aparato experimental para estudo da tira isolada de ventrículo direito de ratos Wistar.

Para manter a viabilidade contrátil do tecido na condição *in vitro*, as tiras de VD eram estimuladas eletricamente através de um par de eletrodos de platina

posicionados próximos a tira (pulsos retangulares com duração de 12 ms e voltagem um e meio vezes o limiar), mantendo a frequência de estimulação padrão de 0,5 Hz. Após o período de aclimatação, as tiras eram estiradas gradualmente até obter tensão ativa máxima ( $L_{m\acute{a}x}$ ). As preparações foram mantidas no período de estabilização durante 30 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais. A força contrátil foi mensurada através do transdutor de força isométrica (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA) acoplado ao amplificador (DA100C Byopac Systems, Inc; CA) e registrada pelo sistema de aquisição de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA) através do computador. Para a aquisição dos dados foi utilizado registro de amostragem de 500 amostras/segundo.

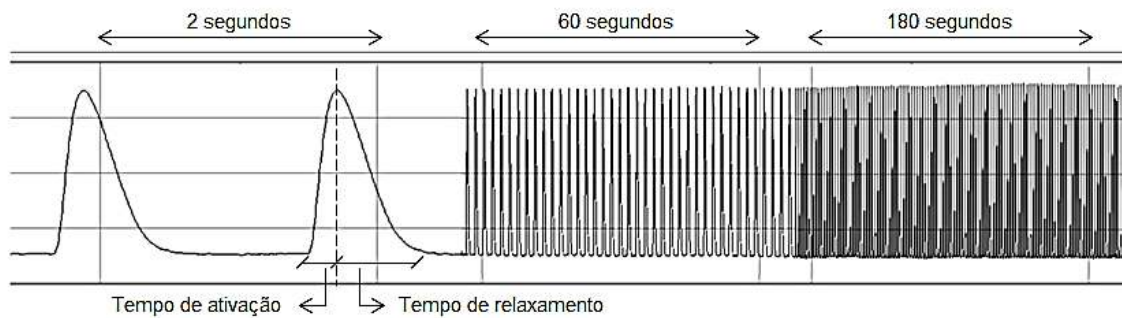
### **3.3.1 Protocolos experimentais**

Com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio associados ao infarto do miocárdio, foram analisados os seguintes parâmetros funcionais nas tiras de VD dos grupos estudados: condições basais, potenciação relativa obtida após pausas de 15, 30 e 60 segundos (PPP); contrações após repouso de 10 minutos (PRC); contrações tetânicas e resposta inotrópica  $\beta$ -adrenérgica ao isoproterenol ( $10^{-5}$  M). Os protocolos serão detalhados nos próximos tópicos.

#### **3.3.1.1 Condições basais**

Antes de iniciar manobras experimentais, os parâmetros funcionais como: pico de força isométrica ( $L_{m\acute{a}x}$ ); tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento de 90% das contrações isométricas (Figura 8); derivada de força/derivada de tempo (dF/dt) máxima positiva (+) e máxima negativa (-) foram analisados (Figura 8).





**Figura 8.** Registro típico de força isométrica desenvolvida pela tira isolada de ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à frequência de estimulação de 0,5 Hz e banhados com solução Krebs-Henseleit. O pico da deflexão positiva corresponde a força isométrica desenvolvida (Modificado de Vescovi, 2013).

### 3.3.1.2 Efeitos da potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos na força isométrica

As potenciações relativas pós-pausa (PPP, do inglês *post pause potentiation*) foram obtidas com o objetivo de avaliar de forma indireta a contribuição do retículo sarcoplasmático (RS) na contração. A potenciação relativa foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa e a amplitude da contração anterior à pausa de 15, 30 e 60 segundos de duração (Figura 9).



**Figura 9.** Registro típico de PPP da tira isolada de ventrículo direito de ratos Wistar obtidas com estimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 segundos do estímulo elétrico aplicado ao músculo (Modificado de Vescovi, 2013).

### 3.3.1.3 Avaliação das contrações obtidas após repouso de 10 minutos

Para avaliar o influxo de cálcio transsarcolemal, foi utilizada a solução previamente descrita (Krebs normal), entretanto livre de cálcio e acrescida de 10 mM de cafeína, com a finalidade de depletar o conteúdo de cálcio intracelular e do retículo sarcoplasmático. Após, as contrações musculares serem abolidas, o estímulo elétrico foi cessado por 10 minutos. Segundos antes de estimulação ser reiniciada, as preparações foram reperfundidas com solução de Krebs padrão, previamente descrita.

As contrações obtidas após repouso de 10 minutos (PRC, do inglês *post rest contraction*), foram calculadas como a razão entre a amplitude da primeira contração após a pausa e a amplitude da contração estabilizada anterior à pausa multiplicadas por cem.

### 3.3.1.4 Avaliação das contrações tetânicas

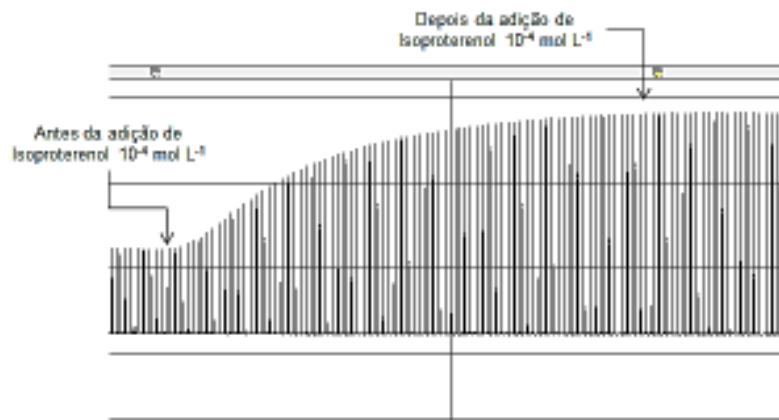
Após 30 minutos de estabilização das tiras de VD na presença de 5 mM de cafeína, a tensão tetânica era obtida. Rapidamente, o estímulo era desligado para ter sua frequência ajustada a 10 Hz, e novamente ligado durante 15 segundos. Para fins experimentais utilizamos a força desenvolvida nos picos e platôs dessas contrações, que refletem respectivamente, o influxo de cálcio transsarcolemal e a responsividade das proteínas contráteis ao cálcio (Figura 10).



**Figura 10.** Registro típico de tétano desenvolvido pela tira isolada de ventrículo direito de ratos Wistar submetidos a frequência de 10 Hz durante 15 segundos (Modificado de Vescovi, 2013).

### *3.3.1.5 Influência do agonista $\beta$ -adrenérgico sob a resposta da força contrátil*

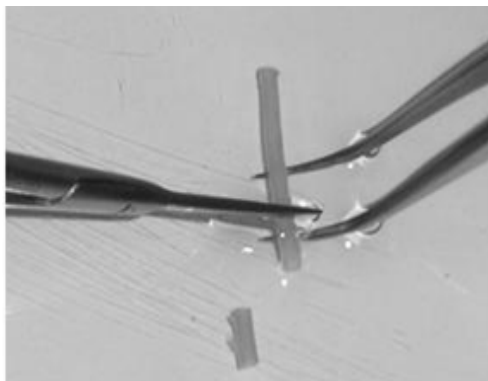
Para avaliar a interferência da associação entre a exposição crônica ao cloreto de mercúrio e o infarto do miocárdio na resposta  $\beta$ -adrenérgica de tiras isoladas de VD, foi utilizado o isoproterenol ( $10^{-4}$  M), agonista  $\beta$ -adrenérgico. Como as preparações isoladas de ratos exibem melhores respostas inotrópicas positivas quando submetidas a baixas concentrações extracelulares de cálcio (Vassallo et.al. 1994), a solução utilizada nessa manobra experimental continha concentração de 0,62mM de cálcio (solução normal possui 1,25 mM cálcio). A resposta inotrópica induzida pelo agonista adrenérgico foi calculada como a razão entre a amplitude máxima na força de contração na presença do isoproterenol e a amplitude da contração estabilizada anterior à sua administração.



**Figura 11.** Registro típico da resposta ao isoproterenol obtida na preparação de tiras isoladas de ventrículo direito de ratos Wistar. Esta resposta foi realizada com o acréscimo da concentração de isoproterenol ( $10^{-4}$  M) à solução de Krebs-Henseleit com concentração de cálcio extracelular de  $0,62 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Modificado de Vescovi, 2013).

### 3.4 ESTUDO DA REATIVIDADE EM ANÉIS ISOLADOS DE AORTA

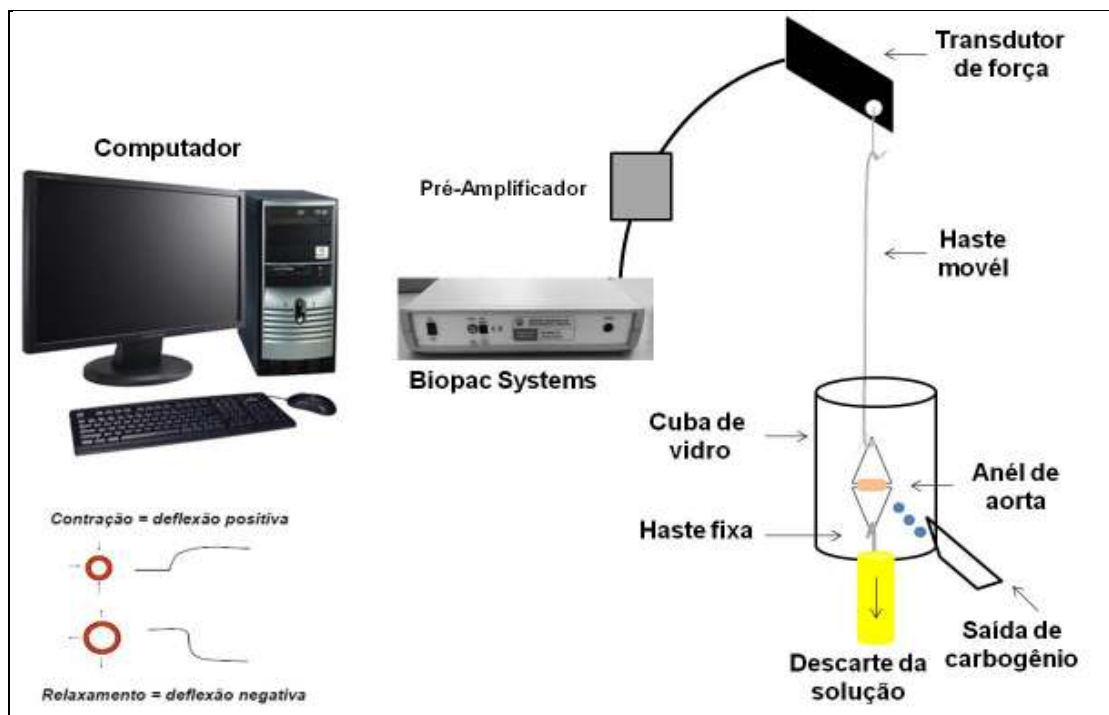
Para averiguar se a associação da exposição crônica ao cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio seria capaz de alterar a reatividade vascular, parte dos animais representando cada grupo experimental (Controle,  $\text{HgCl}_2$ , INF,  $\text{HgCl}_2$ -INF) foram analisados. Para isso, os animais eram pesados, anestesiados com mistura de ketamina (70mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e em seguida, eutanaziados e exangüinados. A aorta torácica foi removida e imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs- Henseleit modificada (composição em mM: NaCl 127; KCl 4.7;  $\text{NaHCO}_3$  18;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.17;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2; glicose 11 e EDTA 0,01). A aorta torácica foi cuidadosamente manipulada para retirada do tecido conectivo e adiposo, e depois dividida em 6-8 segmentos cilíndricos com 3-4 mm de comprimento como demonstrado na (Figura 12).



**Figura 12.** Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Modificado de Angeli, 2013).

Após a manipulação, os segmentos foram adaptados ao aparato experimental. Cada anel da artéria foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs mantida aquecida a  $36 \pm 0,5$  °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), mantendo o pH estável em 7,4 de acordo com método descrito por Marín et al (1988).

Para a montagem da preparação experimental dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos vasculares, de forma que permanecessem paralelos. Um fio foi fixado a uma haste fixa à parede da cuba e o outro conectado verticalmente a uma haste móvel presa ao transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração no diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (GRASS<sup>®</sup> Force-displacement transducer FT03, Mass) conectado ao sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA) e este ao computador (Figura 13).



**Figura 13.** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems .

Após a montagem os anéis de aorta isolados foram submetidos à tensão de repouso de 1g, reajustada, quando necessário, durante aproximadamente 45 minutos de estabilização. Com as estabilização das preparações, os protocolos experimentais foram iniciadas e serão detalhadas nos próximos tópicos.

### 3.4.1 Protocolos experimentais

#### 3.4.1.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio

Após o período de estabilização (Figura 14 A), foi adicionado cloreto de potássio (KCl) 75 mM ao banho, para verificar a atividade contrátil induzida por despolarização e, assim, avaliar a viabilidade do músculo liso vascular (Figura 14 B). Quando foi obtida uma variação de 1 grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornarem a tensão de repouso (Figura 14 B, C). Dessa forma, os anéis que não obtiveram a contração foram descartados.

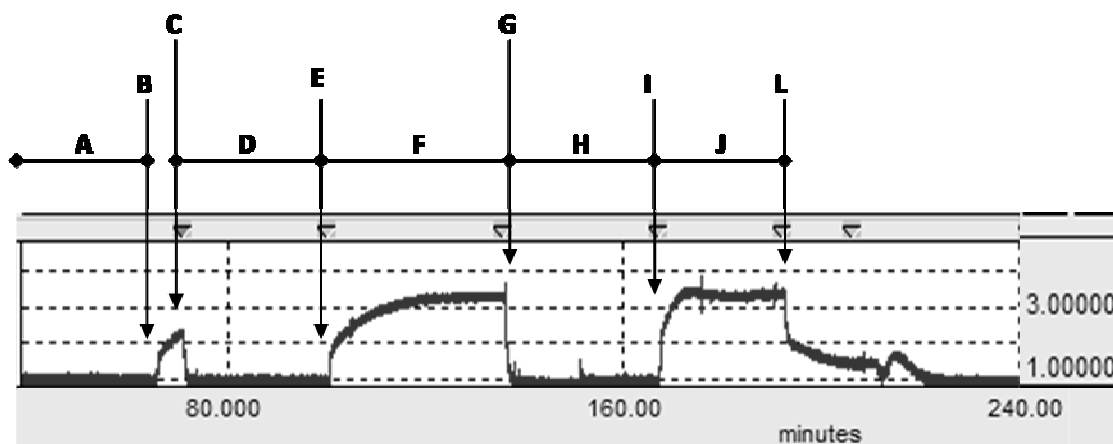
Novamente, após 30 minutos de estabilização (Figura 14 D), uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada ao banho para a aquisição da contração máxima do músculo liso vascular, aferida somente após 30 minutos de ação, tempo necessário para atingir o platô no registro da contração (Figura 14 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para que retornassem à tensão de repouso e, depois de passarem novamente pelo período de 30 minutos de estabilização (Figura 14 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

#### *3.4.1.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio*

A viabilidade endotelial foi avaliada por meio de pré-contratação na presença de fenilefrina  $10^{-6}$  M. Essa única concentração induziu aproximadamente 75 % da contração máxima ao KCl 75 mM. Após a contração seguiu-se a indução do relaxamento produzido através da adição de acetilcolina  $10^{-5}$  M (Figura 14 I, J, L).

Para avaliar a resposta independente do endotélio vascular, os anéis foram submetidos à remoção mecânica desta camada com o auxílio de haste de aço inoxidável, que foi cuidadosamente inserida na luz do vaso e friccionada à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina  $10^{-5}$  M induzir relaxamento, após a pré-contratação com fenilefrina ( $10^{-6}$  M).

A figura 14 apresenta o registro típico que ilustra os protocolos experimentais acima descritos.



**Figura 14.** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0,9 a 1,3 gramas); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina ( $10^{-6}$  M); J) Platô da contração induzida pela fenilefrina; L) Adição de acetilcolina ( $10^{-5}$  M). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal e a força em gramas (g), eixo vertical. (Angeli, 2013).

### 3.4.1.2 Avaliação da resposta vascular à fenilefrina, à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio.

Após a realização do teste de integridade do endotélio vascular, os anéis foram novamente lavados três vezes com solução de Krebs para que retornassem à tensão basal. Posteriormente, esses anéis foram submetidos a vários protocolos experimentais, com objetivo de estudar os efeitos da associação da exposição crônica ao cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio na reatividade vascular. Após a incubação, foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina ou à ACh ou ao nitroprussiato de sódio.



#### **3.4.1.2.1 Efeito da resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

Para avaliar o efeito da resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M). O efeito da resposta contrátil à fenilefrina, foi calculado como percentual de resposta ao KCl (75 mM).

#### **3.4.1.2.2 Avaliação da resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio**

Para avaliar a resposta vasodilatadora independente do endotélio vascular foram realizadas curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio ( $10^{-10}$  a  $3 \cdot 10^{-3}$  M), em anéis de artéria aorta pré-contraídos com fenilefrina. Essa pré-contracção foi realizada com doses crescentes e acumulativas de fenilefrina, até que a contracção atingisse aproximadamente 75% da contracção máxima atingida pelo KCl. A resposta vasodilatadora à ao nitroprussiato de sódio foi calculada como percentual de resposta ao relaxamento à fenilefrina.

#### **3.4.1.2.3 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio**

Para avaliar a resposta vasodilatadora dependente do endotélio vascular foram realizadas curvas concentração-resposta à ACh ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina ( $10^{-6}$  M). A resposta vasodilatadora à ACh foi calculado como percentual de resposta ao relaxamento à fenilefrina.

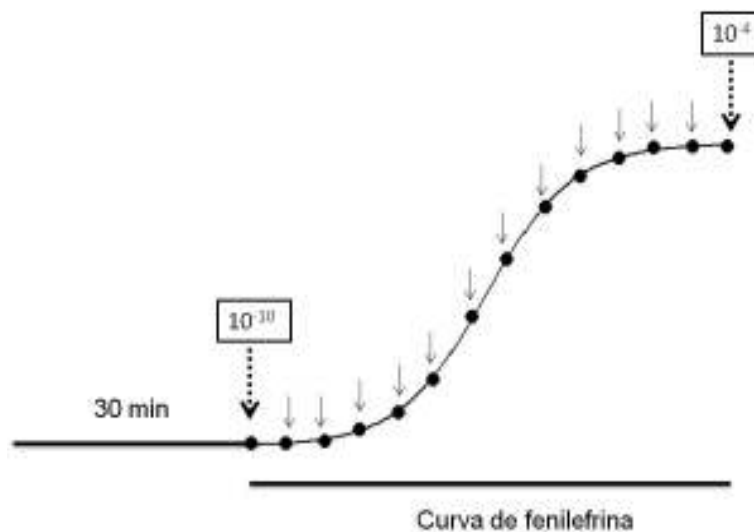
#### **3.4.1.5 Modulação do endotélio vascular sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, em alguns experimentos, o endotélio foi removido mecanicamente, como descrito anteriormente. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina  $10^{-5}$  M em induzir relaxamento, após pré-contracção com fenilefrina. Sendo assim, curvas concentração-resposta à

fenilefrina foram realizadas em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-).

#### 3.4.1.6 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta

Para avaliar a capacidade da associação entre a exposição crônica ao cloreto de mercúrio e o infarto do miocárdio de modificar a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos, foram utilizadas algumas intervenções farmacológicas. Sendo assim, os protocolos de reatividade vascular foram conduzidos da seguinte forma: curvas concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$ M) foram realizadas após 30 minutos da incubação do fármaco a ser estudado (Figura 15).



**Figura 15.** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$ M).

É importante ressaltar que, em cada segmento vascular, foi realizada apenas uma curva concentração-resposta à fenilefrina. Essa medida foi

necessária para evitar o tempo prolongado de experimento, já que isso resultaria em prejuízo na preparação utilizada nesse estudo.

#### ***3.4.1.6.1 Efeito do bloqueio da via do óxido nítrico, sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina***

Para avaliar a influência da biodisponibilidade do óxido nítrico sobre a resposta contrátil à fenilefrina na associação da exposição crônica ao cloreto de mercúrio e o infarto do miocárdio, foi utilizado o inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS) o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 µM) e o inibidor seletivo da iNOS (1400W, 1µM). Após o teste de integridade endotelial e posterior ao retorno da tensão de repouso os anéis de aorta foram expostos aos fármacos, separadamente.

#### ***3.4.1.6.2 Envolvimento de radicais livres sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta***

Para verificar o envolvimento de EROs sobre o efeito da associação da exposição crônica ao cloreto de mercúrio e o infarto do miocárdio na resposta contrátil à fenilefrina foram utilizados: a apocinina (100 µM), inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, ou seja, inibe uma das principais enzimas formadoras de radicais livres; alopurinol (100 µM), inibidor seletivo da xantina oxidase; a superóxido dismutase (SOD, 150 U ml<sup>-1</sup>), é um importante anti-oxidante fisiológico que converte ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); e a catalase (1000 U/ml), “varredor” de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sendo assim, após o teste de integridade endotelial e posterior ao retorno da tensão de repouso os anéis de aorta foram expostos aos fármacos, separadamente.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA E EXTENÇÃO DO INFARTO

Para caracterização do modelo do infarto do miocárdio, após os animais serem sacrificados, o coração foi rapidamente retirado e colocado em solução salina gelada (NaCl 0,9%). Os átrios foram removidos dos ventrículos, e esses dissecados, separados e pesados. O septo interventricular foi considerado parte do VE. A hipertrofia cardíaca foi avaliada utilizando pesos úmidos do VD e VE corrigidos pelo PC do respectivo animal. Os contornos do VE e área de cicatriz (AC) do coração foram cuidadosamente separados e delineados sobre papel milimetrado, sendo as áreas medidas por contagem de pontos, para obtenção da área correspondente em mm<sup>2</sup> (Mill et. al, 1990). O resultado da medida do infarto é descrito aqui como a área percentual infartada do VE em relação a área total do VE. Adicionalmente, os pulmões tiveram seus pesos avaliados.

### 3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da associação da exposição crônica ao cloreto de mercúrio e o infarto do miocárdio na expressão protéica da SERCA-2a, PLB, pPLB<sup>Ser16</sup>, trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) de tiras isoladas do VD de ratos dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF, HgCl<sub>2</sub>-INF. No âmbito vascular, as isoformas endotelial e induzível da óxido nítrico sintase (eNOS e iNOS, respectivamente), isoformas cobre/zinco e manganês SOD (Cu/Zn SOD e Mn SOD, respectivamente) foram avaliadas em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF, HgCl<sub>2</sub>-INF. A expressão protéica de todas as proteínas foi realizada em condições basais (segmentos retirados logo depois do animal ser sacrificado).

Os tecidos (VD e aorta) foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento em que foram utilizados. Com auxílio do homogeneizador (Marconi, MA102/MINI, Brasil), as amostras teciduais foram homogeneizadas em microtubos contendo solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH:7,4, em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10/20 minutos, 6.000/11.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  (amostras de aorta e VD, respectivamente) e, em seguida, o sobrenadante era coletado. Em pequena amostra do sobrenadante era realizada a quantificação protéica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) segundo método de Bradford (Bradford, 1976).

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para carga de 40-60  $\mu\text{g}$  de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39  $\mu\text{M}$  de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%).

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para 1,5 M Tris HCl pH: 8,8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em solução tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a corrente constante de 60V por aproximadamente 3 horas (PowerPac<sup>TM</sup> HC, BioRad, Singapura) a  $8^{\circ}\text{C}$ . Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para a membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, foi realizado o método de transferência líquida no qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados no sistema de sanduíche em suporte Holder Cassete e acoplados á uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo solução tampão de

transferência (Tris 25mM, glicina 190mM, SDS 0.1% e Metanol 20%) à 8° C com uma corrente de 60 V por 2 horas.

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5% ou albumina 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante toda a noite à 4 °C, sob agitação, em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para SERCA-2a (1:1000 Thermo Scientific, IL, USA), PLB (1:1000 Thermo Scientific, IL, USA), pPLB<sup>Ser16</sup> (1:5000, Badrilla, UK) e trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (1:1000 Thermo Scientific, IL, USA) e GAPDH (1:5000) para amostras isoladas de tiras isoladas do ventrículo direito e eNOS (1:250 BD Transduction Laboratories<sup>TM</sup>, Lexington, UK), iNOS (1:200 BD Transduction Laboratories<sup>TM</sup>, Lexington, UK), Cu-Zn SOD (1:1000, Cell Signaling Technology, USA), Mn SOD (1:1000, Cell Signaling Technology, USA) e β-actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA) para amostras isoladas de aorta.

Depois disto, as membranas eram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 30 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (1:5000, StressGen, Victoria, Canada) ou IgG anti-coelho conjugado com peroxidase (1:5000, StressGen, Victoria, Canada).

Todas as proteínas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a

um sistema de detecção (EL, Amersham™ GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas eram colocadas em contato com filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham™, UK), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas.

A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isto, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram escaneadas e analisados com o software Image J.

### 3.7 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

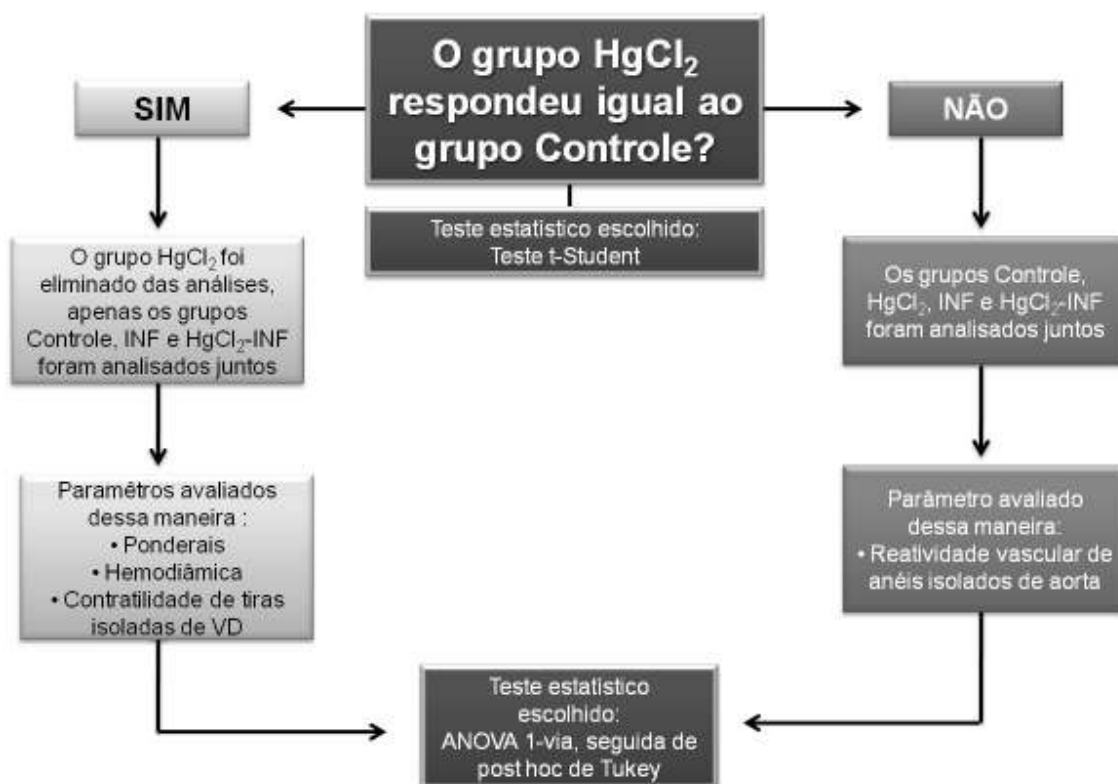
As respostas da tira de ventrículo direito foram corrigidas pelo peso de cada tira, sendo os resultados expressos em g/g. O efeito da resposta contrátil à fenilefrina, em anéis de aorta, foi expressa como percentual de resposta ao KCl. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, evocadas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina.

Para a determinação dos valores de resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ , que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de

concentração-resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente.

Os resultados da expressão protéica foram apresentados como relação entre a densidade óptica destas proteínas em relação ao GAPDH ou  $\beta$ -actina.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado ou análise de variância (ANOVA), de uma via. Quando ANOVA apresentava significância estatística era realizado o *pos-hoc* de Tukey utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .



**Figura 16.** Esquema representativo da escolha realizada para apresentação dos resultados e a análise estatística utilizada.



### 3.8 REAGENTES E FÁRMACOS

- 1400W (Sigma)
- 2-Hidroxietilmercaptano ( $\beta$ -mercaptoetanol) (Sigma)
- 3', 3'', 5', 5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico (Azul de Bromofenol)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Albumina bovina (Sigma)
- Alopurinol (Sigma)
- Anticorpo para detectar  $\beta$ -actina (Sigma)
- Anticorpo para detectar Cu-Zn SOD (Cell Signaling)
- Anticorpo para detectar eNOS (BD Biosciences)
- Anticorpo para fosfolambam detectar (Thermo Scientific)
- Anticorpo para iNOS detectar (BD Biosciences).
- Anticorpo para NCX detectar (Thermo Scientific)
- Anticorpo para SERCA-2a detectar (Thermo Scientific)
- Anticorpo para detectar fosfolambam fosforilado na serina 16 (Badrilla)
- Anticorpo para detectar GAPDH (Abcam)
- Anticorpo para detectar Mn SOD (Cell Signaling)
- Apocinina (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)

- Bicarbonato de sódio (Merck)
- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate #500-0006 (Bio-Rad)
- Cafeína (Merck)
- Catalase (1000 U/mL) (Sigma)
- Cloreto de cálcio (Merck)
- Cloreto de cálcio (Merck)
- Cloreto de magnésio (Merck)
- Cloreto de mercúrio (Sigma)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Cloreto de vanádio (III) (Sigma)
- DL-Ditiotreitol (DTT) (Sigma)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)
- Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Fosfato de potássio (Sigma)
- Fosfato de sódio (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Heparina (Cristália)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Ketamina (Bayer)
- Leite desnatado (Nestlé)

- Metanol (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)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- Persulfato Amônico (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (BioRad)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL) (Amersham Life Science, Pharmacia biotech)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)
- Superóxido Dismutase (SOD) (Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (BioRad)
- Xilazina (Agener)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C.

## **RESULTADOS**

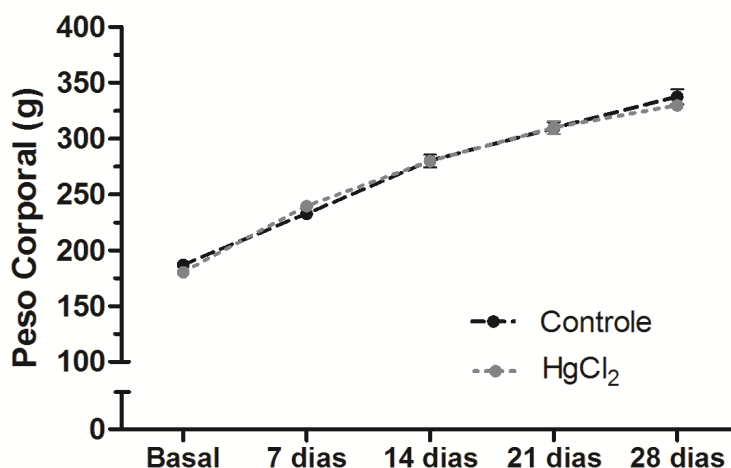
---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

#### 4.1.1 Avaliação da exposição crônica ao cloreto de mercúrio

A figura 17 e a tabela 1 mostram a evolução temporal do peso corporal dos animais durante a exposição por quatro semanas ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) ou a salina (Controle). Como podemos observar, não foi detectada nenhuma diferença entre os grupos avaliados, mesmo após ambos serem submetidos a cirurgia fictícia no vigésimo primeiro dia após o início da exposição.



**Figura 17.** Avaliação temporal do peso corporal durante a exposição ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) ou salina (Controle) em animais submetidos a cirurgia fictícia no vigésimo primeiro dia após o início da exposição. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM, n=30 animais por grupo.

**Tabela 1.** Avaliação do peso corporal entre os grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> antes do início do tratamento e durante as subsequentes semanas de exposição.

| Peso (g)          | inicial | 7 dias  | 14 dias | 21 dias | 28 dias |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Controle          | 190 ± 8 | 232 ± 4 | 279 ± 5 | 305 ± 5 | 338 ± 6 |
| HgCl <sub>2</sub> | 186 ± 2 | 239 ± 4 | 279 ± 4 | 308 ± 4 | 333 ± 3 |

Os resultados estão expressos como média ± EPM, n=30 animais por grupo.

Além de nenhuma alteração de peso corporal como já mencionado acima, a exposição durante quatro semanas ao cloreto de mercúrio também não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros ponderais (Tabela 2) e hemodinâmicos avaliados (Tabela 3).

**Tabela 2.** Parâmetros ponderais mensurados quatro semanas após o início dos experimentos.

|                          | Controle      | HgCl <sub>2</sub> |
|--------------------------|---------------|-------------------|
| <b>PP (g)</b>            | 1,61 ± 0,04   | 1,65 ± 0,06       |
| <b>PP/PC (mg/g)</b>      | 4,78 ± 0,09   | 5,09 ± 0,16       |
| <b>PP Seco (g)</b>       | 0,320 ± 0,012 | 0,329 ± 0,011     |
| <b>PP Seco/PC (mg/g)</b> | 0,940 ± 0,031 | 1,006 ± 0,033     |
| <b>VE (g)</b>            | 0,670 ± 0,014 | 0,651 ± 0,019     |
| <b>VE/PC (mg/g)</b>      | 1,98 ± 0,04   | 2,00 ± 0,03       |
| <b>VD (g)</b>            | 0,170 ± 0,006 | 0,169 ± 0,007     |
| <b>VD/PC (mg/g)</b>      | 0,501 ± 0,015 | 0,527 ± 0,017     |

PC, peso corporal; PP, peso do pulmão; VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n=15-20 animais por grupo.

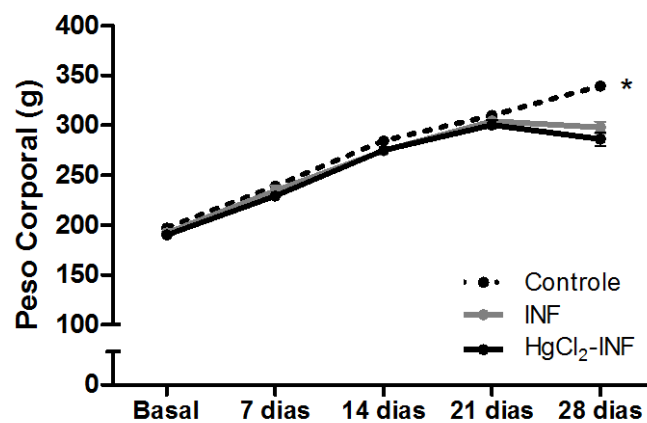
**Tabela 3.** Parâmetros hemodinâmicos mensurados quatro semanas após o início dos experimentos.

|                           | <b>Controle</b> | <b>HgCl<sub>2</sub></b> |
|---------------------------|-----------------|-------------------------|
| <b>FC (bpm)</b>           | 306,0 ± 27,5    | 292,0 ± 12,2            |
| <b>PAS (mmHg)</b>         | 114,9 ± 2,3     | 114,3 ± 3,6             |
| <b>PAD (mmHg)</b>         | 85,7 ± 3,6      | 82,3 ± 4,3              |
| <b>PSVE (mmHg)</b>        | 135,3 ± 3,1     | 134,5 ± 5,6             |
| <b>PDFVE (mmHg)</b>       | 5,3 ± 0,6       | 5,9 ± 0,7               |
| <b>dP/dt+ VE (mmHg/s)</b> | 6872 ± 195      | 6742 ± 254              |
| <b>dP/dt- VE (mmHg/s)</b> | -6480 ± 237     | -6193,3 ± 274           |
| <b>PSVD (mmHg)</b>        | 31,2 ± 2,1      | 29,0 ± 1,7              |
| <b>PDFVD (mmHg)</b>       | 2,04 ± 0,24     | 2,56 ± 0,34             |
| <b>dP/dt+ VD (mmHg/s)</b> | 1470 ± 114      | 1250 ± 44,3             |
| <b>dP/dt- VD (mmHg/s)</b> | -1438 ± 86,8    | -1233 ± 46,2            |

FC: frequência cardíaca, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, PSVE: Pressão sistólica de ventrículo esquerdo, PDFVE: Pressão diastólica final de ventrículo esquerdo, dP/dt+: Derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima positiva e dP/dt-: Derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima negativa, PDFVD: Pressão diastólica final de ventrículo direito, dP/dt+ VD: Derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima positiva e dP/dt- VD: Derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima negativa. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 15-20 animais por grupo.

#### 4.1.2 Avaliação da associação entre exposição crônica ao cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio

A figura 18 mostra a evolução temporal do peso corporal dos animais durante a exposição por quatro semanas ao cloreto de mercúrio ou a salina. Como podemos observar, não foi detectada nenhuma diferença entre os grupos até o dia da cirurgia. Porém, sete dias após a cirurgia, os animais infartados (INF e HgCl<sub>2</sub>-INF), independente da exposição ao cloreto de mercúrio, apresentaram menor peso corporal, quando comparados ao grupo Controle.



**Figura 18.** Avaliação temporal do peso corporal durante a exposição ao cloreto de mercúrio ou salina em animais submetidos a cirurgia fictícia (Controle) ou infarto do miocárdio (INF ou HgCl<sub>2</sub>-INF) no vigésimo primeiro dia após o início da exposição. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM, n = 20-30 animais por grupo. \* p < 0,05 vs INF e HgCl<sub>2</sub>-INF (ANOVA 1 via).



**Tabela 4.** Avaliação do peso corporal dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF antes do início do tratamento e durante as subsequentes semanas de exposição.

| Peso (g)               | inicial | 7 dias  | 14 dias | 21 dias   | 28 dias  |
|------------------------|---------|---------|---------|-----------|----------|
| Controle               | 196 ± 3 | 232 ± 4 | 279 ± 5 | 309 ± 5   | 337 ± 6  |
| INF                    | 201 ± 5 | 234 ± 5 | 274 ± 5 | 303 ± 6,7 | 299 ± 6* |
| HgCl <sub>2</sub> -INF | 180 ± 4 | 229 ± 5 | 271 ± 5 | 296 ± 6   | 287 ± 7* |

Os resultados estão expressos como média ± EPM.

\* p < 0,05 vs. Controle (ANOVA 1 via).

A tabela 5 sumariza os parâmetros ponderais de cada órgão obtidos de animais dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF quatro semanas após o início do estudo. Além da alteração de peso corporal como já mencionado acima, alterações significativas foram encontradas nos grupos INF e HgCl<sub>2</sub>-INF quando comparados ao grupo Controle nos parâmetros como aumento da razão entre o peso do pulmão (PP)/PC e entre o peso do ventrículo direito (VD)/PC (Tabela 5).

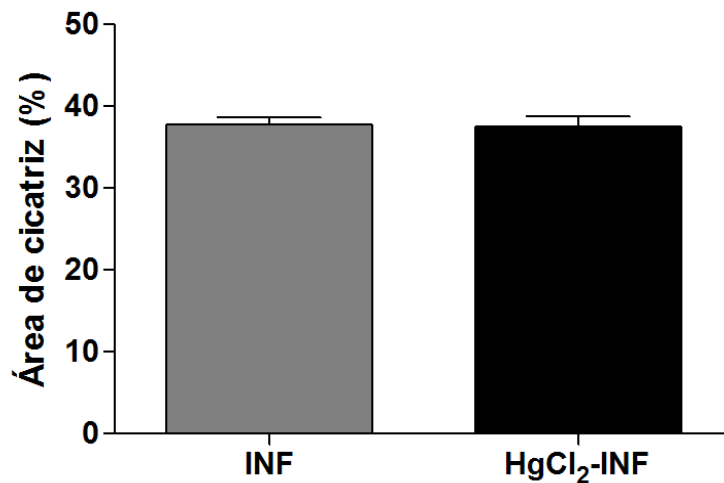
**Tabela 5.** Parâmetros ponderais mensurados quatro semanas após o início dos experimentos.

|                          | <b>Controle</b> | <b>INF</b>     | <b>HgCl<sub>2</sub>-INF</b> |
|--------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
| <b>PP (g)</b>            | 1,61 ± 0,04     | 2,04 ± 0,18*   | 1,97 ± 0,10*                |
| <b>PP/PC (mg/g)</b>      | 4,78 ± 0,09     | 6,53 ± 0,48*   | 6,63 ± 0,44*                |
| <b>PP Seco (g)</b>       | 0,320 ± 0,012   | 0,382 ± 0,032  | 0,365 ± 0,019               |
| <b>PP Seco/PC (mg/g)</b> | 0,940 ± 0,031   | 1,245 ± 0,082  | 1,273 ± 0,078               |
| <b>VE (g)</b>            | 0,670 ± 0,014   | 0,651 ± 0,016  | 0,614 ± 0,017               |
| <b>VE/PC (mg/g)</b>      | 1,98 ± 0,04     | 2,04 ± 0,06    | 2,10 ± 0,04                 |
| <b>VD (g)</b>            | 0,170 ± 0,006   | 0,178 ± 0,010  | 0,165 ± 0,009               |
| <b>VD/PC (mg/g)</b>      | 0,501 ± 0,015   | 0,621 ± 0,032* | 0,612 ± 0,043*              |

PC, peso corporal; PP, peso do pulmão; VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito, AI, área do infarto. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 15-20 animais por grupo.

\*  $P < 0,05$  vs Controle (ANOVA 1 via).

Para confirmação do infarto do miocárdio, a área de cicatriz dos animais de todos os grupos experimentais foi avaliada pela técnica de planimetria. Apenas os animais de ambos os grupos infartados apresentaram área de cicatriz, e ela foi similar entre eles (INF 37,8 ± 0,9 vs. HgCl<sub>2</sub>-INF 37,5 ± 1,3 %,  $p > 0,05$ ) (Figura 19).



**Figura 19.** Tamanho da área de cicatriz de animais dos grupos INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 35 animais por grupo.

As medidas hemodinâmicas obtidas através do cateterismo cardíaco estão apresentadas na tabela 6. Quatro semanas após o início dos experimentos, o grupo INF e HgCl<sub>2</sub>-INF apresentaram redução significativa PAS e PAD e aumento significativo da PDFVE em relação ao grupo Controle (Tabela 6). Além disso, a frequência cardíaca, PSVE, a dP/dt+ e a dP/dt- foram reduzidas pelo infarto do miocárdio, independente da prévia exposição ao cloreto de mercúrio ou salina (Tabela 6).

**Tabela 6.** Parâmetros hemodinâmicos avaliados quatro semanas após o início dos experimentos

|                           | <b>Controle</b> | <b>INF</b>     | <b>HgCl<sub>2</sub>-INF</b> |
|---------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
| <b>FC</b>                 | 306,0 ± 27,5    | 240,0 ± 12,6   | 240,0 ± 6,3                 |
| <b>PAS (mmHg)</b>         | 114,9 ± 2,3     | 96,1 ± 1,6*    | 95,0 ± 1,2*                 |
| <b>PAD (mmHg)</b>         | 85,7 ± 3,6      | 73,6 ± 1,9*    | 70,3 ± 2,7*                 |
| <b>PSVE (mmHg)</b>        | 135,3 ± 3,1     | 108,3 ± 2,2*   | 101,4 ± 2,2*                |
| <b>PDFVE (mmHg)</b>       | 5,3 ± 0,6       | 14,8 ± 1,1*    | 14,9 ± 0,81*                |
| <b>dP/dt+ VE (mmHg/s)</b> | 6872 ± 195      | 3862 ± 175*    | 3688 ± 142*                 |
| <b>dP/dt- VE (mmHg/s)</b> | -6480 ± 237     | -4205 ± 186*   | -4041 ± 143*                |
| <b>PSVD (mmHg)</b>        | 31,2 ± 2,1      | 31,6 ± 1,2     | 31,5 ± 1,8                  |
| <b>PDFVD (mmHg)</b>       | 2,04 ± 0,24     | 5,14 ± 0,54*   | 4,40 ± 0,48*                |
| <b>dP/dt+ VD (mmHg/s)</b> | 1470 ± 114      | 964,7 ± 103,3* | 1034 ± 118,9*               |
| <b>dP/dt- VD (mmHg/s)</b> | -1438 ± 86,8    | -1134,2 ± 6,6* | -1127,0 ± 65,8*             |

FC: frequência cardíaca, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, PSVE: Pressão sistólica de ventrículo esquerdo, PDFVE: Pressão diastólica final de ventrículo esquerdo, dP/dt+ VE: Derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima positiva e dP/dt- VE: Derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima negativa, PDFVD: Pressão diastólica final de ventrículo direito, dP/dt+ VD: Derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima positiva e dP/dt- VD: Derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima negativa. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n=15-20 animais por grupo.

\* p<0,05 vs. Controle

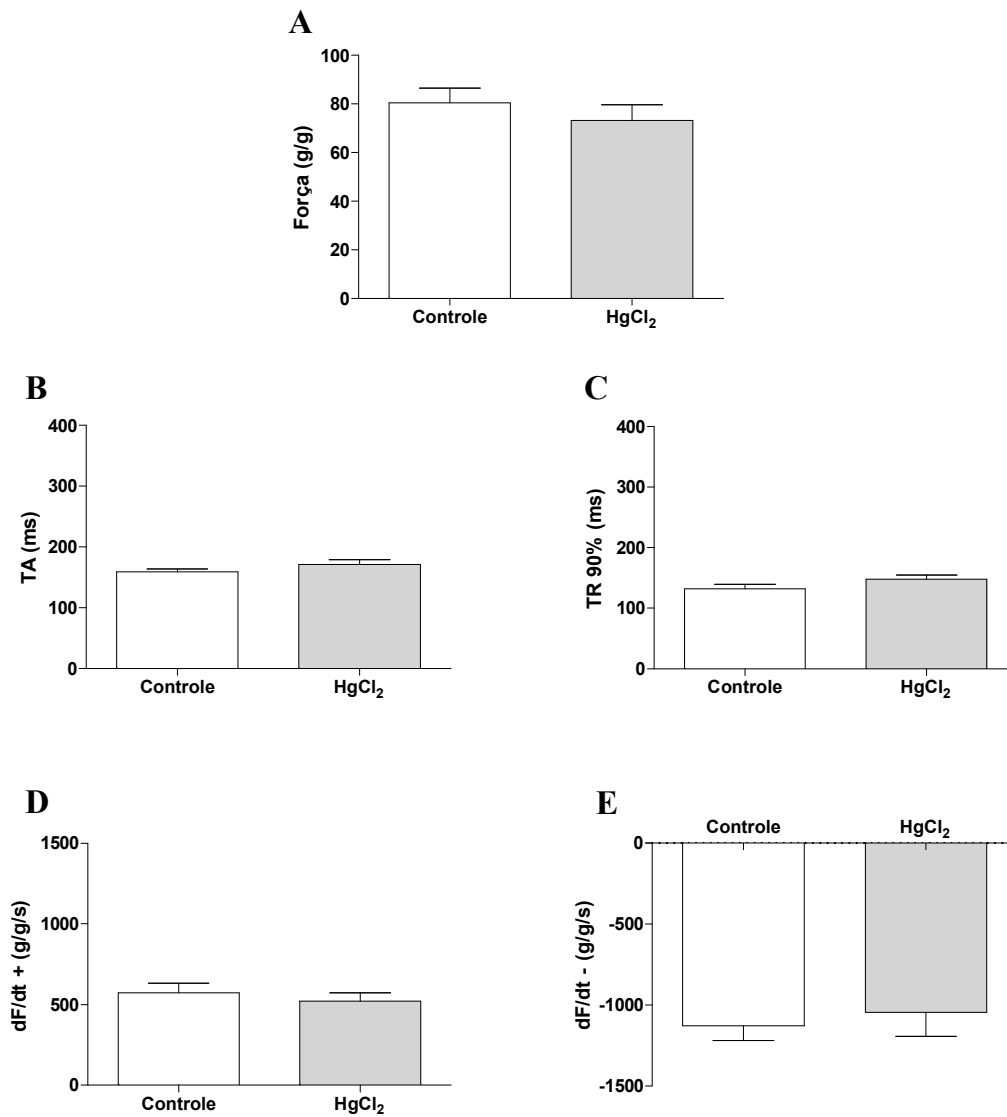
## 4.2 ESTUDO FUNCIONAL DE TIRAS ISOLADAS DO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS.

### 4.2.1 Avaliação da exposição crônica ao cloreto de mercúrio

A exposição crônica à baixas doses de cloreto de mercúrio, durante quatro semanas, não alterou nenhum dos parâmetros avaliados na contratilidade desenvolvida por tiras isoladas do ventrículo direito de ratos. Nos próximos tópicos os resultados serão detalhadamente apresentados.

#### 4.2.1.1 Condições Basais

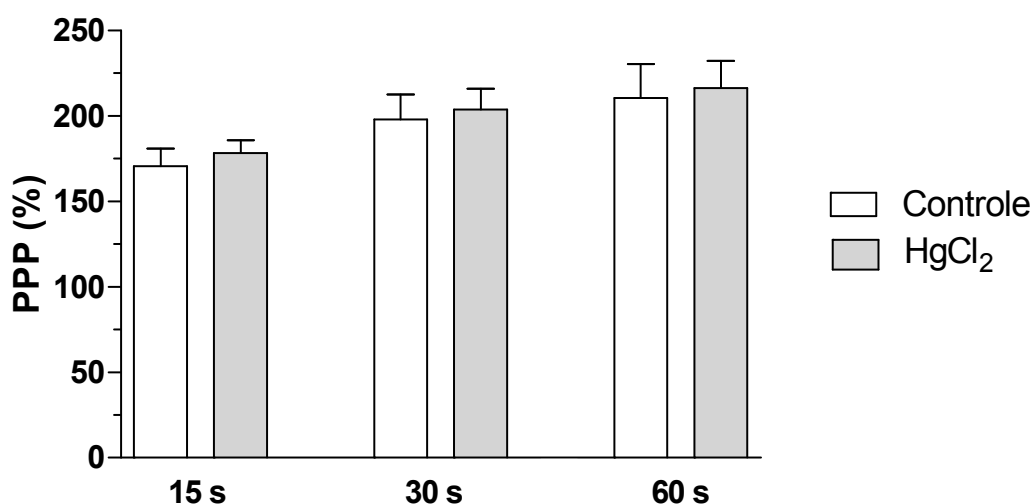
A força máxima desenvolvida pelas tiras de ventrículo direito foram semelhantes entre o grupo exposto ao cloreto de mercúrio, durante quatro semanas, quando comparado ao grupo Controle (Controle  $80,4 \pm 6,0$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $73,2 \pm 6,4$  g/g,  $p>0,05$ ). Adicionalmente, o tempo despendido para atingir a contração máxima (TA: Controle  $159 \pm 5,1$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $171 \pm 7,3$  ms,  $p>0,05$ ) e o tempo necessário para atingir 90% de relaxamento dessa contração máxima (TR 90%: Controle  $253 \pm 13,1$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $283,2 \pm 16,9$  ms,  $p>0,05$ ) foram semelhantes entre o grupo  $\text{HgCl}_2$  quando comparado ao grupo Controle. Ao avaliar as derivadas dF/dt máxima positiva (dF/dt+: Controle  $574 \pm 57,7$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $520 \pm 51,0$  g/(g/s),  $p>0,05$ ) e dF/dt máxima negativa (dF/dt-: Controle  $1129 \pm 90,2$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $1045 \pm 145,0$  g/(g/s),  $p>0,05$ ), nenhuma alteração foi observada (Figura 19).



**Figura 19.** Condições basais da contratilidade de tiras de ventrículo direito dos grupos Controle e exposto ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>). TA: Tempo de ativação, TR: Tempo de relaxamento, dF/dt: relação da derivada de força sobre derivada de tempo máxima positiva (dF/dt+) e máxima negativa (dF/dt-). Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 10 animais por grupo.

#### 4.2.1.2 Efeitos da potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos na força isométrica

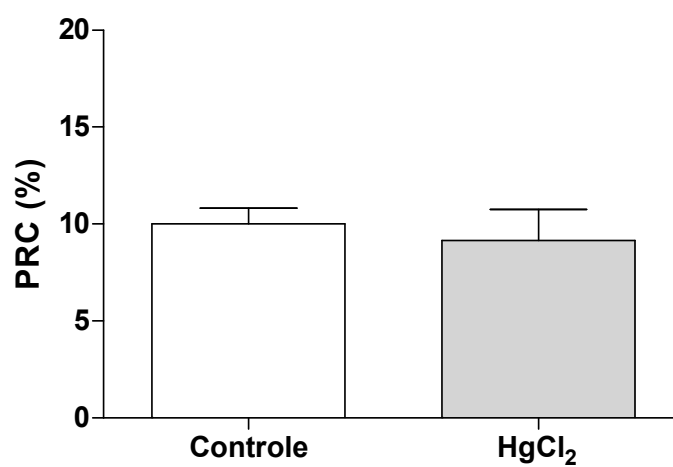
A figura 20 ilustra as potenciações relativas após pausas (PPP) de 15, 30 e 60 segundos. A exposição ao cloreto de mercúrio, durante quatro semanas, não alterou funcionalmente a atividade do retículo sarcoplasmático (RS) de tiras isoladas de ventrículo direito quando comparado ao grupo Controle (Pausa 15s: Controle  $170 \pm 10$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $178 \pm 7$  %,  $p > 0,05$ ; Pausa 30s: Controle  $198 \pm 14$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $203 \pm 12$  %,  $p > 0,05$ ; Pausa 60s: Controle  $211 \pm 19$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $216 \pm 15$  %,  $p > 0,05$ ).



**Figura 20.** Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos de animais dos grupos Controle e expostos ao cloreto de mercúrio (grupo HgCl<sub>2</sub>). PPP: Potenciação relativa após pausas. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 10 animais por grupo.

#### 4.2.1.3 Avaliação das contrações obtidas após repouso de 10 minutos

A manobra experimental de PRC (do inglês, *post rest contraction*) avaliou o influxo de cálcio transarcolemal em tiras isoladas de ventrículo direito. A figura 21 mostra que a crônica exposição a baixas doses de cloreto de mercúrio, durante quatro semanas, não alterou o influxo de cálcio transarcolemal quando comparado ao grupo Controle (Controle  $10,0 \pm 0,8$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $9,1 \pm 1,6$  %,  $p > 0,05$ ).

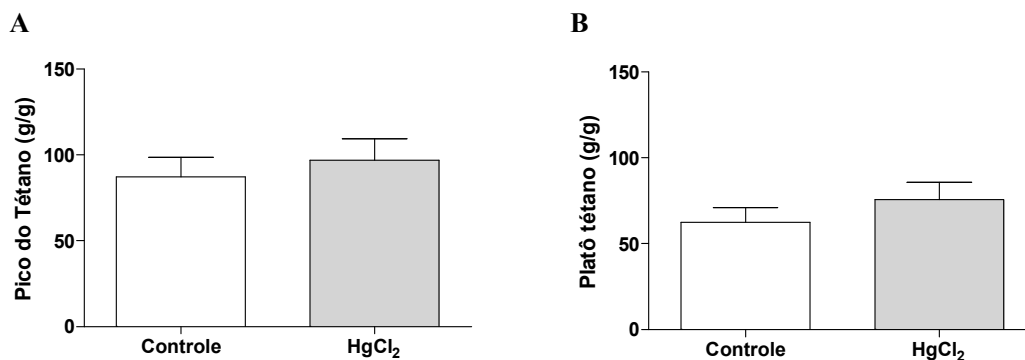


**Figura 21.** Avaliação do influxo de cálcio transarcolemal através do PRC de animais dos grupos Controle e  $\text{HgCl}_2$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 10 animais por grupo.



#### 4.2.1.4 Avaliação das contrações tetânicas

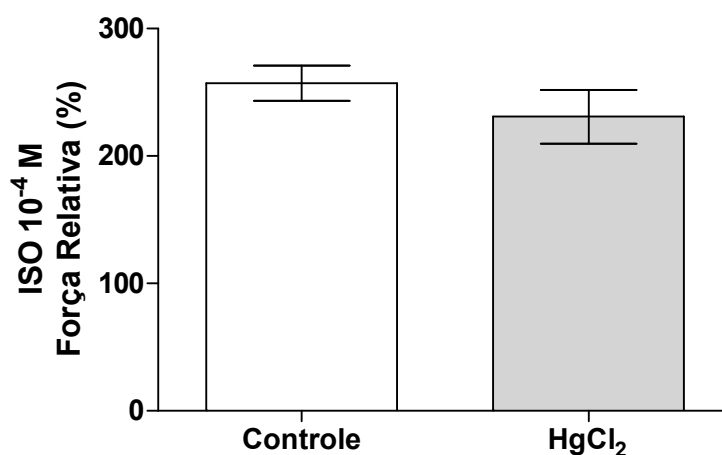
As contrações tetânicas foram utilizadas com o intuito de verificar, de forma indireta, a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e a disponibilidade do cálcio para a contração, através de seu influxo pelos canais de cálcio do tipo L (Leite et. al, 1995). Na manobra experimental do tétano, a força desenvolvida tanto no pico de contração (Controle  $87,2 \pm 11,3$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $97,0 \pm 12,4$  g/g,  $p > 0,05$ ) quanto no platô de contração (Controle  $62,4 \pm 8,4$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $75,1 \pm 10,0$  g/g,  $p > 0,05$ ) (Figura 22) foram semelhantes entre os grupos Controle e  $\text{HgCl}_2$ .



**Figura 22.** Efeito da exposição durante quatro semanas ao cloreto de mercúrio na força desenvolvida durante o pico (A) e platô do tétano (B) de animais dos grupos Controle e  $\text{HgCl}_2$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 10$  animais por grupo.

#### 4.2.1.5 Influência do agonista $\beta$ -adrenérgico sob a resposta da força contrátil

Com o objetivo de avaliar a participação  $\beta$ -adrenérgica na força contrátil, uma única dose de isoproterenol foi administrada ( $10^{-4}$  M). O exposição durante quatro semanas com o cloreto de mercúrio não resultou em nenhuma alteração dessa via analisada quando comparado ao grupo Controle (Controle  $257 \pm 13$  vs.  $\text{HgCl}_2$   $230 \pm 21$  %,  $p > 0,05$ ) (Figura 23).



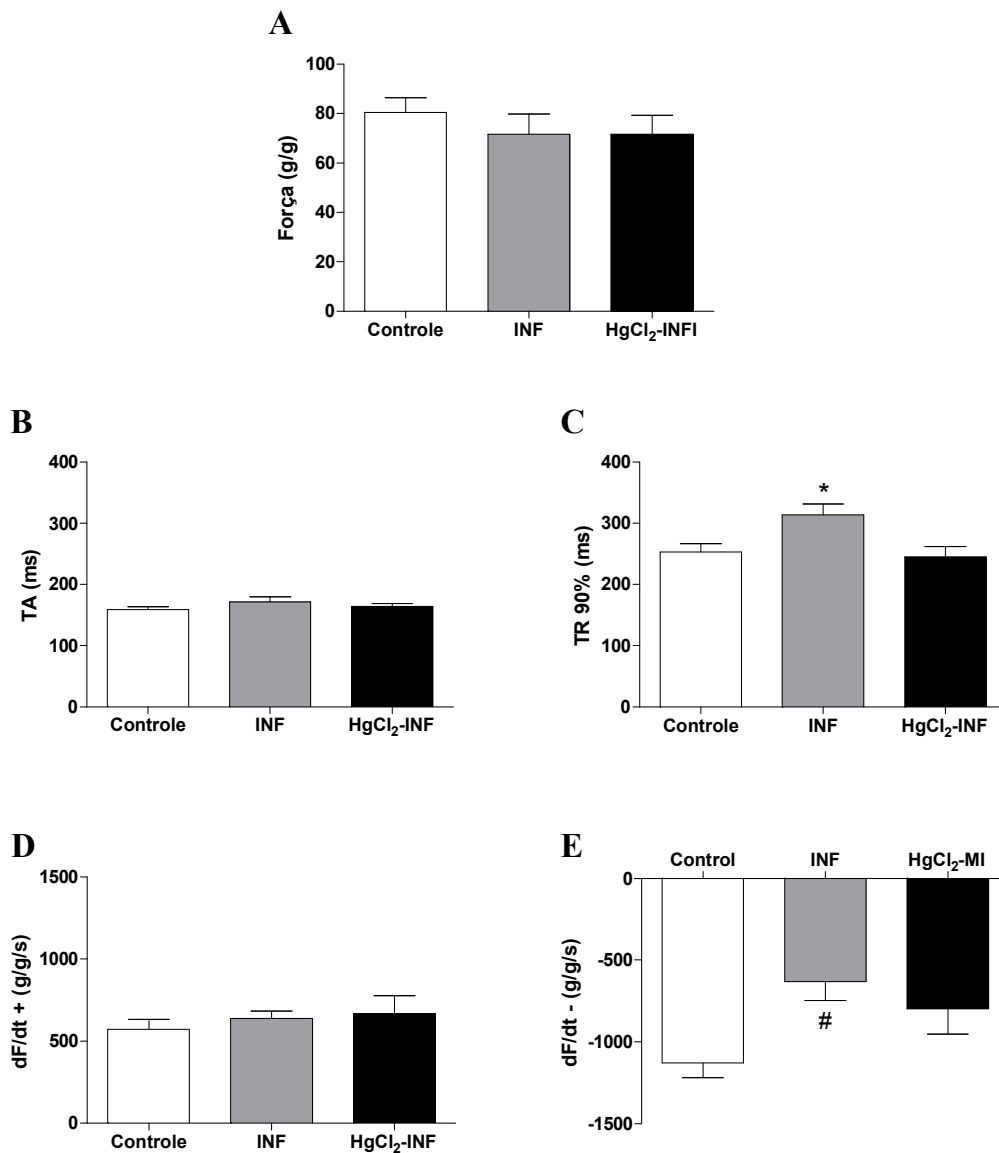
**Figura 23.** Efeito da exposição ao cloreto de mercúrio na resposta ao agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol, de animais dos grupos Controle e  $\text{HgCl}_2$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 8$  animais por grupo.

#### 4.2.2 Avaliação da associação entre exposição crônica ao cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio

Como apresentado anteriormente, a crônica exposição ao cloreto de mercúrio não alterou nenhum dos parâmetros de contratilidade avaliados nas tiras isoladas de ventrículo direito de ratos. Sendo assim, para melhor visualização dos resultados, o grupo  $\text{HgCl}_2$  foi omitido das análises subsequentes descritas.

##### 4.2.2.1 Condições Basais

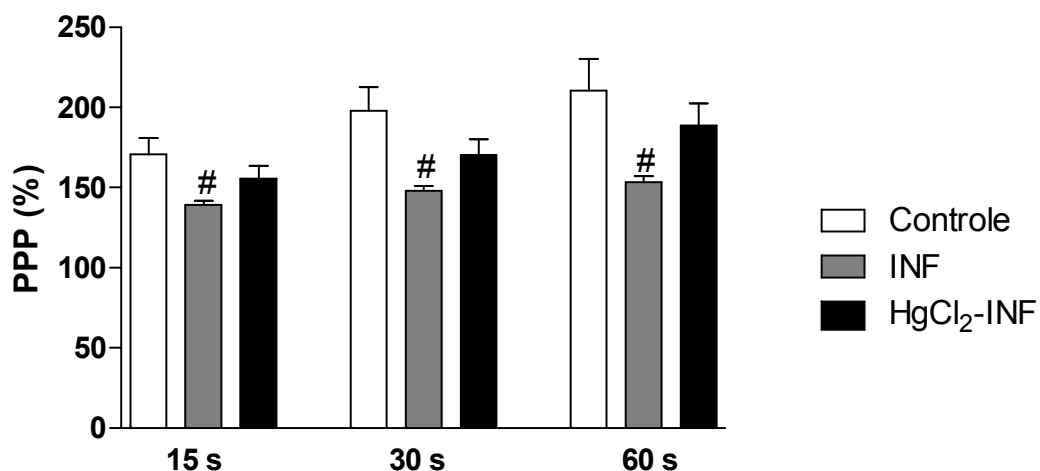
A Figura 24 apresenta os resultados dos efeitos da associação entre a crônica exposição ao cloreto de mercúrio e o infarto do miocárdio em condições basais de contração, observadas em tiras de ventrículo direito dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. O infarto do miocárdio não alterou a força isométrica máxima desenvolvida (Controle 80,4 ± 6,0; INF 71,7 ± 8,1 e HgCl<sub>2</sub>-INF 71,7 ± 7,6 g/g, p>0,05), o tempo necessário para alcançar a contração máxima (TA: Controle 159 ± 5,1; INF 172 ± 7,8 e HgCl<sub>2</sub>-INF 164 ± 4,5 ms, p>0,05), e a dF/dt+ (Controle 574 ± 57; INF 639 ± 45 e HgCl<sub>2</sub>-INF 669 ± 109 g/(g/s), p>0,05) em todos os grupos avaliados (Figura 24 A,B,D). Entretanto, o grupo INF apresentou aumento no tempo necessário para atingir 90% do relaxamento (TR 90%: Controle 253 ± 13; INF 313 ± 17,7 e HgCl<sub>2</sub>-INF 245 ± 17 ms, Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF vs. INF p<0,05) (Figura 24 C), e redução do parâmetro da dF/dt- (Controle -1129 ± 90; INF -630 ± 115 e HgCl<sub>2</sub>-INF 835 ± 141 g/(g/s), INF vs. Controle p<0,05) (Figura 24 E). Em contrapartida, os animais infartados que foram previamente expostos ao cloreto de mercúrio mantiveram todos os parâmetros de contratilidade, avaliados nas condições basais, semelhantes ao observado no grupo Controle. Esses resultados sugerem que o infarto do miocárdio adicionado à crônica exposição ao cloreto de mercúrio resulta em menor dano na contratilidade de tiras isoladas de ventrículo direito quando comparados aos animais submetidos apenas a injúria do infarto do miocárdio.



**Figura 24.** Condições basais da contratilidade de tiras de ventrículo direito dos grupos Controle, INF e INF-HgCl<sub>2</sub>. TA: Tempo de ativação, TR: Tempo de relaxamento, dF/dt: derivada de força sobre derivada de tempo máxima positiva (dF/dt+) e máxima negativa (dF/dt-). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= 10-12 animais por grupo. \* p < 0,05 vs Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF. # p < 0,05 vs. Controle (ANOVA 1 via).

#### 4.2.2.2 Efeitos da potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos na força isométrica

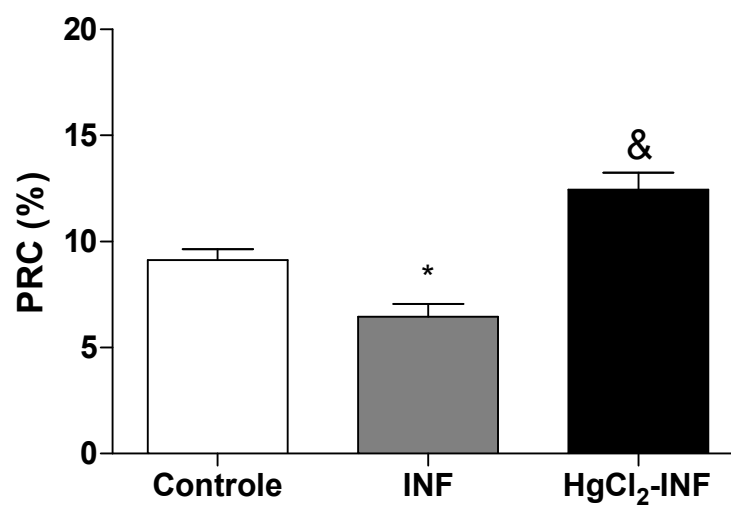
Os animais do grupo INF apresentaram redução na potenciação após as pausas de 15, 30 e 60 segundos quando comparados ao grupo Controle (Pausa 15s: Controle  $170 \pm 10$ ; INF  $139 \pm 2$ ; HgCl<sub>2</sub>-INF  $156 \pm 8,1\%$ ; Pausa 30s: Controle  $198 \pm 14$ ; INF  $148 \pm 2$ ; HgCl<sub>2</sub>-INF  $170 \pm 10 \%$ ; Pausa 60s: Controle  $198 \pm 14$ ; INF  $153 \pm 3$ ; HgCl<sub>2</sub>-INF  $189 \pm 13,8\%$ , INF vs. Controle,  $p < 0,05$ ). Entretanto, essa alteração não foi observada no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF. Esses resultados sugerem um maior prejuízo na função do retículo sarcoplasmático dos animais pertencentes ao grupo INF em comparação ao que foi observado nos animais do grupo HgCl<sub>2</sub>-INF (Figura 25).



**Figura 25.** Potenciação relativa após pausas de 15, 30 e 60 segundos de animais dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 10-12$  animais por grupo. # $p < 0,05$  vs. Controle (ANOVA 1 via).

#### 4.2.2.3 Avaliação das contrações obtidas após repouso de 10 minutos

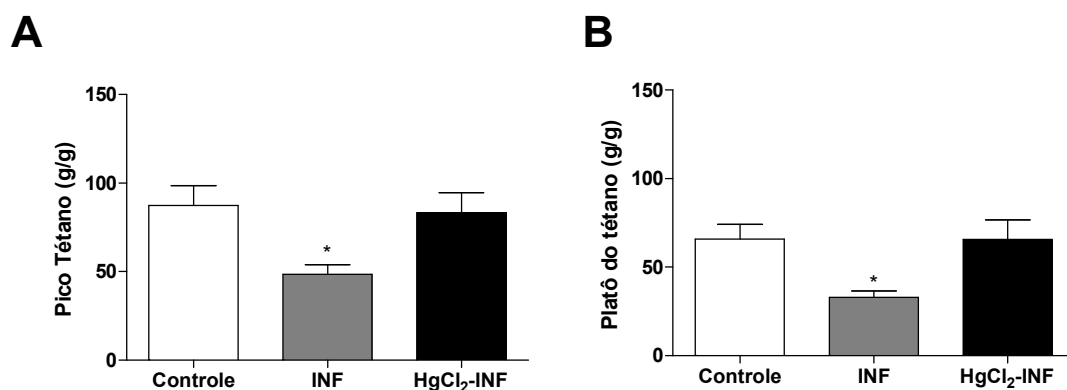
Ao avaliar o influxo de cálcio transsarcolemal, através da manobra experimental do PRC, foi observado prejuízo no influxo do cálcio apenas no grupo INF. Porém, o grupo de animais previamente exposto ao cloreto de mercúrio que sofreu o infarto do miocárdio (HgCl<sub>2</sub>-INF) apresentou aumento do influxo de cálcio transsarcolemal quando comparado aos demais grupos (Controle 9,13 ± 0,51; INF 6,45 ± 0,60; HgCl<sub>2</sub>-INF 12,45 ± 0,80, \* Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF vs. INF p<0,05, & Controle e INF vs. HgCl<sub>2</sub>-INF p<0,05) (Figura 26).



**Figura 26.** Efeitos do infarto do miocárdio durante a crônica exposição ao cloreto de mercúrio na potenciação relativa de contrações isométricas de animais dos grupos Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 8-10 animais por grupo. \* p< 0,05 vs. Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF, & p<0,05 vs. Controle e INF (ANOVA 1 via).

#### 4.2.2.4 Avaliação das contrações tetânicas

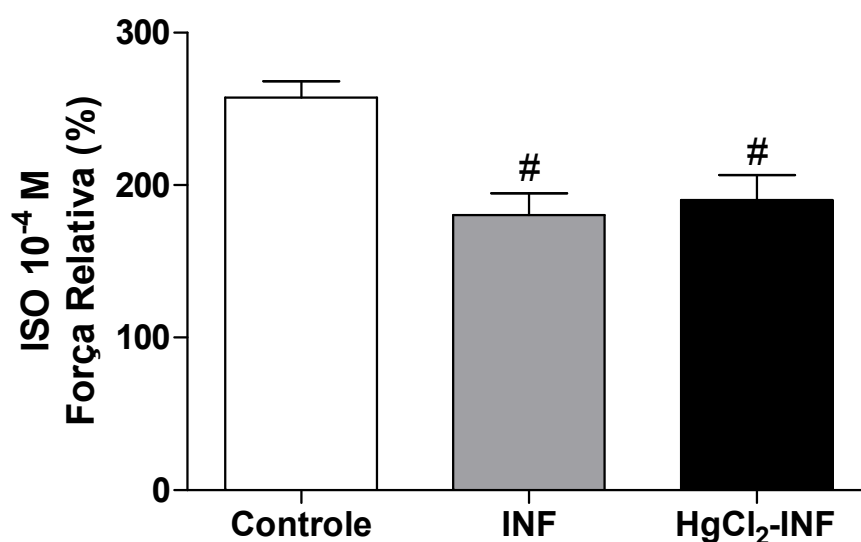
A figura 27 apresenta os resultados dos efeitos da crônica exposição ao cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio na contratilidade da tiras isoladas de ventrículo direito na manobra experimental do tétano. O grupo INF apresentou redução tanto na força desenvolvida no pico (Controle  $87,3 \pm 11,3$ ; INF  $48,5 \pm 5,5$ ; HgCl<sub>2</sub>-INF  $83,2 \pm 11,3$  g/g, \* Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF vs. INF  $p < 0,05$ ) quanto no platô do tétano (Controle  $65,9 \pm 8,2$ ; INF  $32,9 \pm 3,6$ ; HgCl<sub>2</sub>-INF  $65,6 \pm 11,3$  g/g, \* Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF vs. INF  $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF.



**Figura 27.** Efeito da exposição durante quatro semanas ao cloreto de mercúrio associado ao infarto do miocárdio no pico (A) e platô do tétano (B) de animais Controle, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 10-12$  animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs. Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF (ANOVA 1 via).

#### 4.2.2.5 Influência do agonista $\beta$ -adrenérgico sob a resposta da força contrátil

Na figura 28 pode-se observar que após a administração de isoproterenol na concentração de  $10^{-4}$ M a força máxima relativa em ambos os grupos submetidos ao infarto do miocárdio (INF e  $\text{HgCl}_2$ -INF) encontra-se reduzida quando comparada ao grupo Controle (Controle  $257 \pm 10$ ; INF  $180 \pm 14$ ;  $\text{HgCl}_2$ -INF  $190 \pm 16$  %, # INF e  $\text{HgCl}_2$ -INF vs. Controle  $p < 0,05$ ). Esse resultado indica que a injúria do infarto, independente se foi precedido ou não a exposição crônica ao cloreto de mercúrio, reduz a capacidade inotrópica produzida pelo isoproterenol.



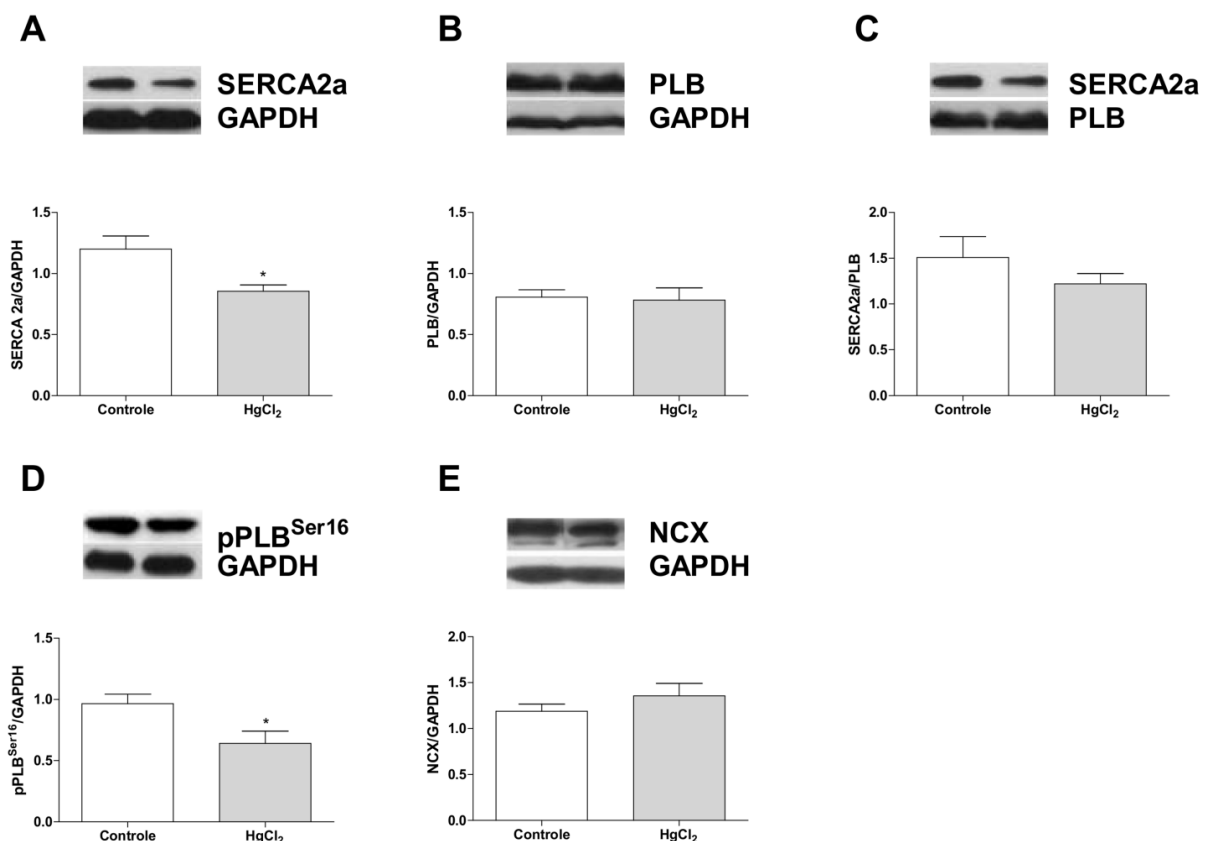
**Figura 28.** Contratilidade de tiras de ventrículo direito dos grupos Controle, INF e  $\text{HgCl}_2$ -INF após a administração do fármaco isoproterenol ( $10^{-4}$ M). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 8-10$  animais por grupo. #  $p < 0,05$  vs. Controle (ANOVA 1 via).



### 4.2.2.3 Expressão das proteínas contráteis envolvidas na sinalização do cálcio

#### 4.2.2.3.1 Efeitos da crônica exposição ao cloreto de mercúrio na expressão de proteínas envolvidas na sinalização do cálcio

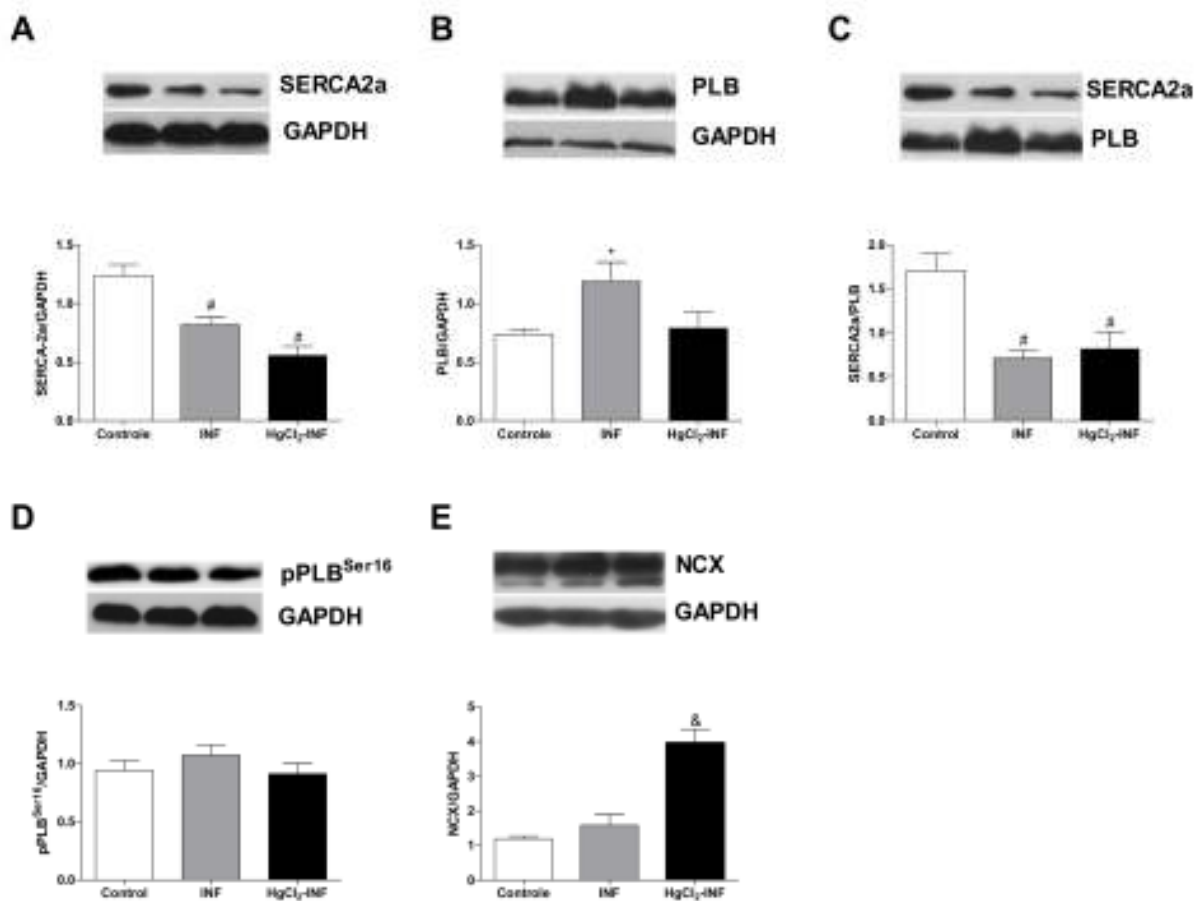
A expressão protéica da SERCA2a, PLB, PLB fosforilado na serina 16 e NCX em tiras isoladas de ventrículo direito foram avaliadas após a crônica exposição ao cloreto de mercúrio. A contínua exposição ao cloreto de mercúrio reduziu a expressão protéica da SERCA2a e pPLB<sup>Ser16</sup>, quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 29 A,D). Entretanto, a expressão protéica do PLB e NCX foi similar entre os grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> (Figura 29 B,C,E).



**Figura 29.** Níveis protéicos de amostras do ventrículo direito dos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> na análise de densitometria pela técnica de Western Blot de SERCA2a (A), PLB (B), PLB fosforilado na serina 16 (C), SERCA/PLB (D), NCX (E). Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 6-8 animais por grupo. #  $p < 0,05$  vs. Controle (teste t-Student).

#### *4.2.2.3.2 Efeitos da crônica exposição ao cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio na expressão de proteínas envolvidas na sinalização do cálcio*

Para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na via de sinalização do cálcio que resultaram na melhora funcional observada nas tiras isoladas de ventrículo direito, as expressões protéicas da SERCA2a, PLB, PLB fosforilado na serina 16 e NCX foram medidas. Foi observada uma redução na expressão da SERCA2a em ambos os grupos submetidos ao infarto do miocárdio (grupos INF e HgCl<sub>2</sub>-INF), apesar do aumento na expressão da PLB ser observado apenas no grupo INF (Figura 30 A,B,C). Essas alterações protéicas acarretaram uma redução da razão SERCA2a/PLB nos grupos INF e HgCl<sub>2</sub>-INF, sugerindo que a recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático encontra-se prejudicada em ambos os grupos submetidos à injúria do infarto do miocárdio. Não houve alteração da expressão protéica da pPLB<sup>Ser16</sup> em nenhum dos grupos avaliados (Figura 30 D). Além disso, a expressão protéica do NCX encontrou-se aumentada apenas no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF (Figura 30 E). Esses resultados destacam a melhor manutenção da homeostase do cálcio em ventrículo direito de ratos do grupo HgCl<sub>2</sub>-INF.



**Figura 30.** Níveis protéicos do ventrículo direito dos grupos Controle , INF e HgCl<sub>2</sub>-INF na análise de densitometria pela técnica de Western Blot de SERCA2a (A), PLB (B), PLB fosforilado na serina 16 (C), SERCA/PLB (D), NCX (E). Os resultados estão expressos como média ± EPM, n= 6-8 animais por grupo. # p< 0,05 vs. Controle, \* p< 0,05 vs. Controle e HgCl<sub>2</sub>-INF, & p<0,05 vs. Controle e INF (ANOVA 1 via).

#### 4.4 ESTUDO DA REATIVIDADE EM ANÉIS ISOLADOS DE AORTA

Como já demonstrado previamente na por este laboratório, a crônica exposição ao cloreto de mercúrio isoladamente altera a reatividade vascular de anéis isolados da aorta. Portanto, mesmo sendo considerado um grupo controle em nosso estudo, ele foi incluído nas análises subsequentes.

##### 4.4.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio

A exposição dos segmentos arteriais ao cloreto de potássio (KCl 75 mM) promoveu resposta contrátil de semelhante magnitude em todos os grupos experimentais avaliados: Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. O número total de animais utilizados em todos os protocolos experimentais submetidos à resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl) estão representados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Valores de resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl) em anéis isolados de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

|                             | <b>ΔKCl (75 mM)</b> |
|-----------------------------|---------------------|
| Controle (34)               | 2,35 ± 0,1          |
| HgCl <sub>2</sub> (30)      | 2,38 ± 0,1          |
| INF (25)                    | 2,07 ± 0,09         |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (25) | 2,16 ± 0,08         |

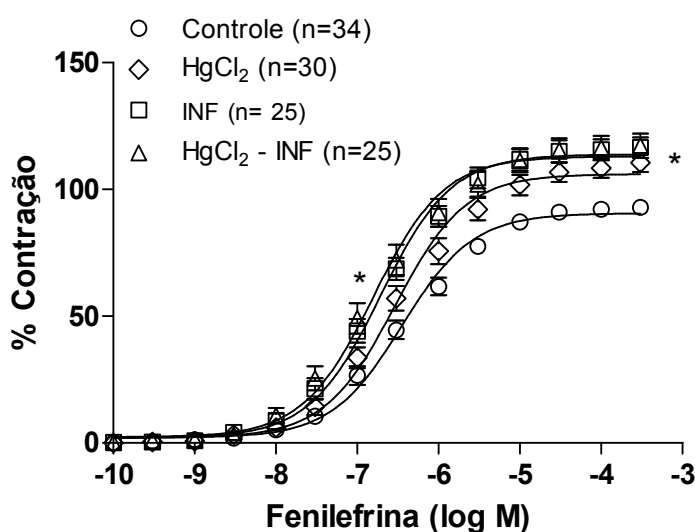
Valores expressos em média ± EPM.

p > 0,05 (ANOVA uma via).

Como nenhuma alteração na resposta ao KCl foi encontrada, os próximos resultados serão expressos como porcentagem da resposta obtida no delta do KCl para cada anel isolado de aorta estudado.

#### 4.4.2 Efeito da resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta

A fenilefrina (agonista  $\alpha$ - adrenérgico) produziu contração concentração-dependente nos anéis de aorta de todos os grupos (Figura 31). No entanto, a resposta máxima à fenilefrina nos grupos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF foi maior que a desenvolvida pelos anéis do grupo Controle. Já a sensibilidade, avaliada pela pD<sub>2</sub>, foi maior apenas nos grupos infartados (INF e HgCl<sub>2</sub>-INF) quando comparados aos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> (Tabela 8).



**Figura 31.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. \*p<0.05 vs. Controle (ANOVA uma via).

**Tabela 8.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

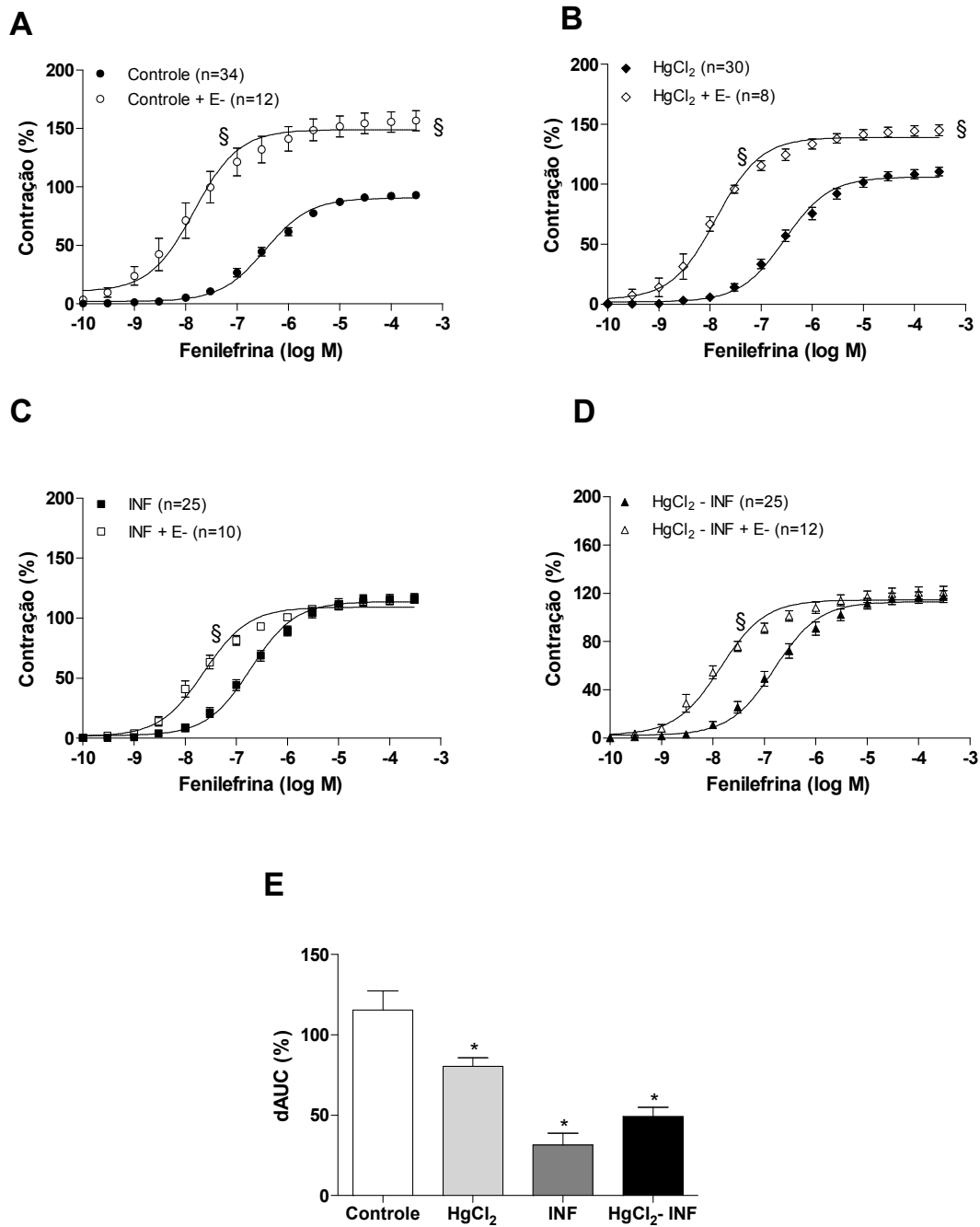
|                             | Rmax (%)     | pD <sub>2</sub> |
|-----------------------------|--------------|-----------------|
| Controle (34)               | 92,9 ± 2,4   | 6,42 ± 0,08     |
| HgCl <sub>2</sub> (30)      | 110,6 ± 3,7* | 6,52 ± 0,09     |
| INF (25)                    | 116,5 ± 4,1* | 6,80 ± 0,09*#   |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (25) | 117,2 ± 4,8* | 6,83 ± 0,10*#   |

Os valores estão expressos em média ± EPM. Os números de animais utilizados estão apresentados entre parênteses.

\*p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HgCl<sub>2</sub> (ANOVA uma via).

#### 4.4.3 Modulação do endotélio vascular sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta

A remoção mecânica do endotélio em anéis dos grupos Controle (Figura 32A) e HgCl<sub>2</sub> (Figura 32B) aumentou a resposta contrátil à fenilefrina (Rmax e pD<sub>2</sub>) em ambos os grupos. Por outro lado, nos grupos INF (Figura 32C) e HgCl<sub>2</sub>-INF (Figura 32D) a remoção do endotélio alterou apenas o parâmetro de sensibilidade (Tabela 9). No entanto, com a análise da diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC), a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina encontra-se reduzida nos grupos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF quando comparados ao grupo Controle (% dAUC, Controle 115,4 ± 12,0; HgCl<sub>2</sub> 80,5 ± 5,3; INF 31,6 ± 7,2; HgCl<sub>2</sub>-INF 49,3 ± 5,6; p<0,05 Controle vs. HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF) (Figura 32E).



**Figura 32.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B) HgCl<sub>2</sub>, (C) INF e (D) HgCl<sub>2</sub>-INF na presença (E+) e na ausência do endotélio vascular (E-). §p<0,05 teste t-Student. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos na presença e ausência do endotélio vascular entre os grupos. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. \*p<0.05 vs. Controle (ANOVA uma via).

**Tabela 9.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença (E+) e ausência do endotélio (E-) vascular dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

|                                | <b>Rmax (%)</b> | <b>pD<sub>2</sub></b> |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Controle E+ (34)               | 92,9 ± 2,4      | 6,42 ± 0,08           |
| Controle E- (12)               | 156,7 ± 8,5§    | 7,89 ± 0,19§          |
| HgCl <sub>2</sub> E+ (30)      | 110,6 ± 3,7     | 6,52 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> E- (8)       | 145,1 ± 4,4§    | 7,89 ± 0,10§          |
| INF E+ (25)                    | 116,5 ± 4,1     | 6,80 ± 0,09           |
| INF E- (10)                    | 115,9 ± 3,5     | 7,65 ± 0,11§          |
| HgCl <sub>2</sub> -INF E+ (25) | 117,2 ± 4,8     | 6,80 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> -INF E- (12) | 120,8 ± 5,1     | 7,89 ± 0,10§          |

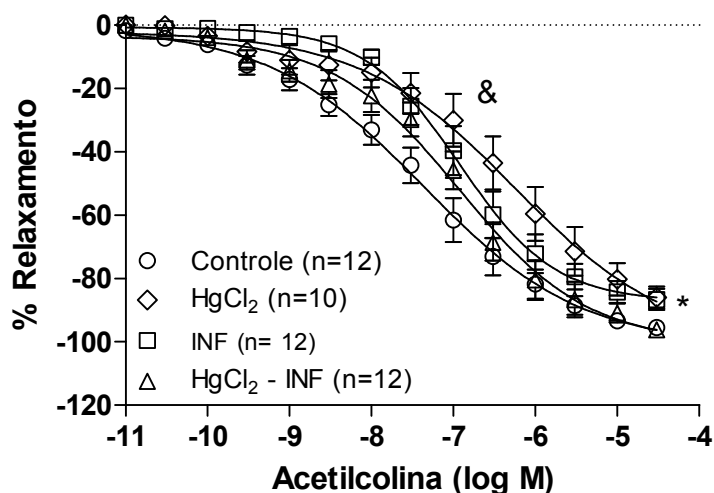
Os valores estão expressos como média ± EPM. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses.

§p<0,05 vs. E+ (Teste t-Student não pareado, comparando na presença e ausência do endotélio vascular de cada grupo experimental).

#### **4.4.4 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio**

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh). Todos os grupos apresentaram relaxamento durante a curva de ACh (Figura 33). Entretanto, enquanto os grupos HgCl<sub>2</sub> e INF apresentaram resposta máxima reduzida em relação ao grupo Controle, os animais infartados que foram submetidos à prévia exposição ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>-INF), apresentaram relaxamento normal (Tabela 10).





**Figura 33.** Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. \*p<0,05 vs. Controle; & p<0,05 vs. HgCl<sub>2</sub>-INF (ANOVA uma via).

**Tabela 10.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à acetilcolina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

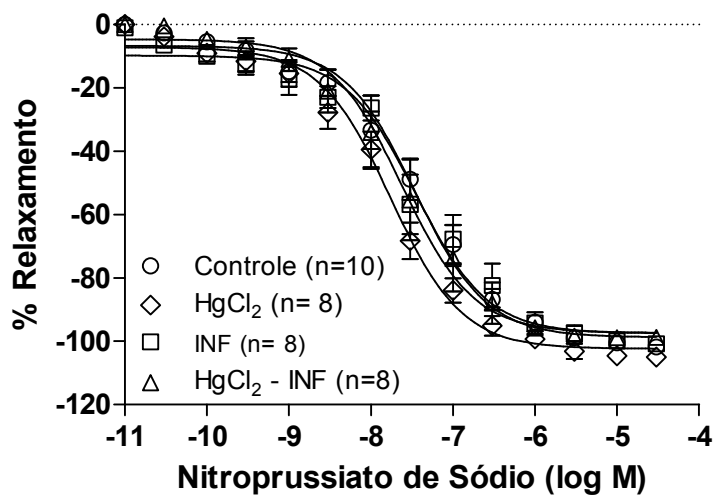
|                             | Rmax (%)     | pD <sub>2</sub> |
|-----------------------------|--------------|-----------------|
| Controle (12)               | 95,4 ± 1,4   | 7,32 ± 0,21     |
| HgCl <sub>2</sub> (10)      | 86,0 ± 3,2*& | 6,58 ± 0,27*    |
| INF (12)                    | 86,6 ± 3,9*& | 6,87 ± 0,17     |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (12) | 96,1 ± 1,4   | 6,97 ± 0,26     |

Os valores estão expressos em média ± EPM. Os números de animais utilizados estão apresentados entre parênteses.

\*p<0,05 vs Controle; & p<0,05 vs. HgCl<sub>2</sub>-INF (ANOVA uma via).

#### 4.4.5 Avaliação da resposta vasodilatadora não-dependente do endotélio

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, em anéis pré-contraídos com fenilefrina. O NPS induziu o relaxamento dos anéis isolados de aorta em todos os grupos (Figura 34). Não foi observada diferença estatística entre os grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF em relação à sensibilidade (pD<sub>2</sub>) ou à resposta máxima (Rmax) (Tabela 11).



**Figura 34.** Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.  $p > 0,05$  (ANOVA uma via).

**Tabela 12.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle,  $HgCl_2$ , INF e  $HgCl_2$ -INF.

|                   | <b>Rmax (%)</b> | <b><math>pD_2</math></b> |
|-------------------|-----------------|--------------------------|
| Controle (10)     | 101,8 ± 1,2     | 7,49 ± 0,14              |
| $HgCl_2$ (8)      | 104,9 ± 2,0     | 7,76 ± 0,10              |
| INF (8)           | 98,7 ± 0,8      | 7,62 ± 0,22              |
| $HgCl_2$ -INF (8) | 100,7 ± 1,3     | 7,40 ± 0,14              |

Os valores estão expressos em média ± EPM.

$p > 0,05$  (ANOVA uma via).

#### **4.4.6 Modulação do endotélio vascular sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta**

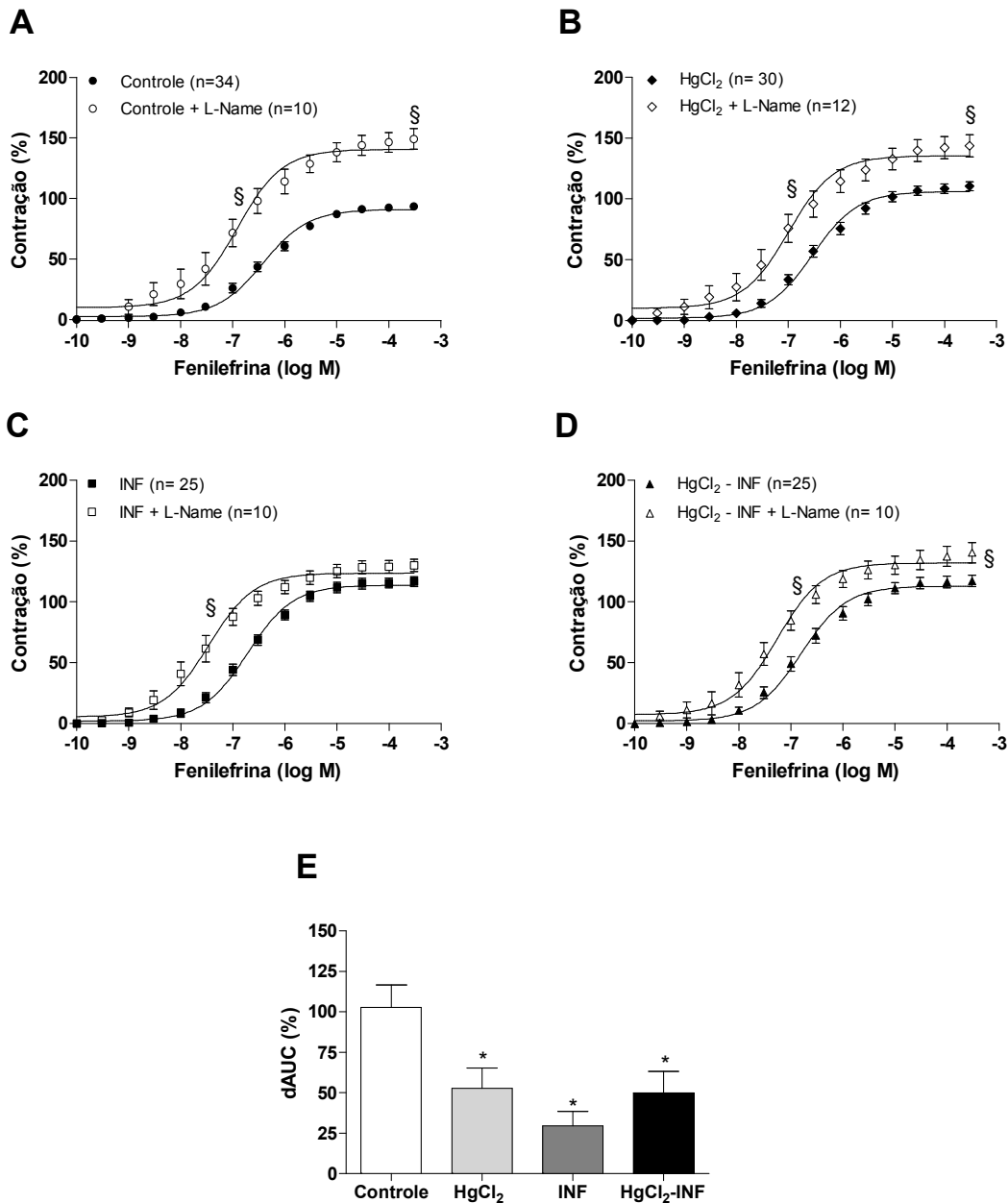
Os resultados apresentados anteriormente mostraram que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio associado ao infarto agudo do miocárdio aumenta a resposta máxima à fenilefrina. Além disso, a remoção do endotélio indica que a dupla injúria reduz a função endotelial, observado pela diferença na área abaixo da curva. Para verificar a influência dos fatores endoteliais na resposta à fenilefrina, investigamos algumas vias de agentes vasoativos derivados do endotélio.

##### *4.6.6.1 Efeito do bloqueio da via do óxido nítrico, sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina*

Para avaliar a participação do óxido nítrico, foi utilizado o inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase L-NAME (100  $\mu$ M). A adição desse inibidor aos anéis isolados de aorta provocou aumento da reatividade vascular à fenilefrina

(Rmax e pD2) nos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>-INF. No entanto, o grupo INF apresentou aumento apenas na sensibilidade (Figuras 35 A-D).

Para melhor análise do resultado, foi calculada a diferença percentual da área abaixo das curvas dos gráficos individualmente (%dAUC Controle 102,8 ± 13,8; HgCl<sub>2</sub> 52,8 ± 12,4; INF 29,5 ± 8,9; HgCl<sub>2</sub>-INF 49,9 ± 13,2, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF vs. Controle p<0,05) (Figura 35E). Logo, foi possível observar redução na biodisponibilidade de óxido nítrico nos anéis isolados de aorta de ratos dos grupos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF (Figura 35, Tabela 12).



**Figura 35.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B) HgCl<sub>2</sub>, (C) INF e (D) HgCl<sub>2</sub>-INF na presença e na ausência do fármaco L-NAME. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos na presença e ausência do fármaco L-NAME entre os grupos. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. \*p<0.05 vs Controle (ANOVA uma via).

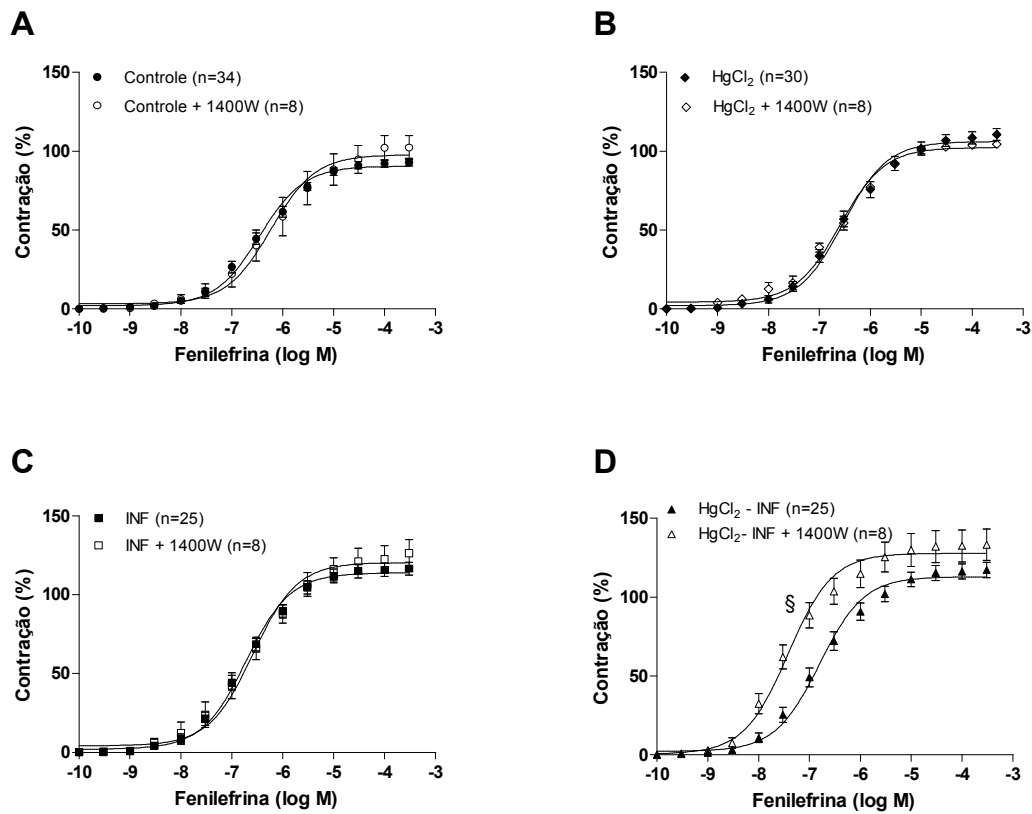
**Tabela 12.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou não do L-NAME dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

|                                      | <b>Rmax (%)</b> | <b>pD<sub>2</sub></b> |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Controle (34)                        | 92,9 ± 2,4      | 6,42 ± 0,08           |
| Controle + L-NAME (10)               | 148,9 ± 8,5§    | 7,14 ± 0,28§          |
| HgCl <sub>2</sub> (30)               | 110,6 ± 3,7     | 6,52 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> + L-NAME (12)      | 146,6 ± 9,1§    | 6,99 ± 0,17§          |
| INF (25)                             | 116,5 ± 4,1     | 6,52 ± 0,09           |
| INF + L-NAME (10)                    | 130,0 ± 5,0     | 7,56 ± 0,18§          |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (25)          | 117,2 ± 4,8     | 6,80 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> -INF + L-NAME (10) | 140,4 ± 8,3§    | 7,38 ± 0,14§          |

Os valores estão expressos como média ± EPM. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses.

§p<0,05 vs condição sem o fármaco (Teste T-Student não pareado, comparando a presença e ausência do L-NAME em cada grupo experimental).

Para avaliar a participação do óxido nítrico proveniente da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), foi utilizado o inibidor seletivo 1400W (1 µM). Apenas os animais infartados previamente submetidos à exposição crônica ao cloreto de mercúrio apresentaram alteração na sensibilidade da curva concentração-resposta a fenilefrina na presença do 1400W quando comparado a curva na condição controle (Figura 36, Tabela 13).



**Figura 36.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B)  $\text{HgCl}_2$  número de animais utilizados estão representados entre parênteses. §  $p < 0,05$  vs  $\text{HgCl}_2$ -INF + 1400W (Teste t-Student não pareado).

**Tabela 13.** Valores de resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou não do 1400W dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

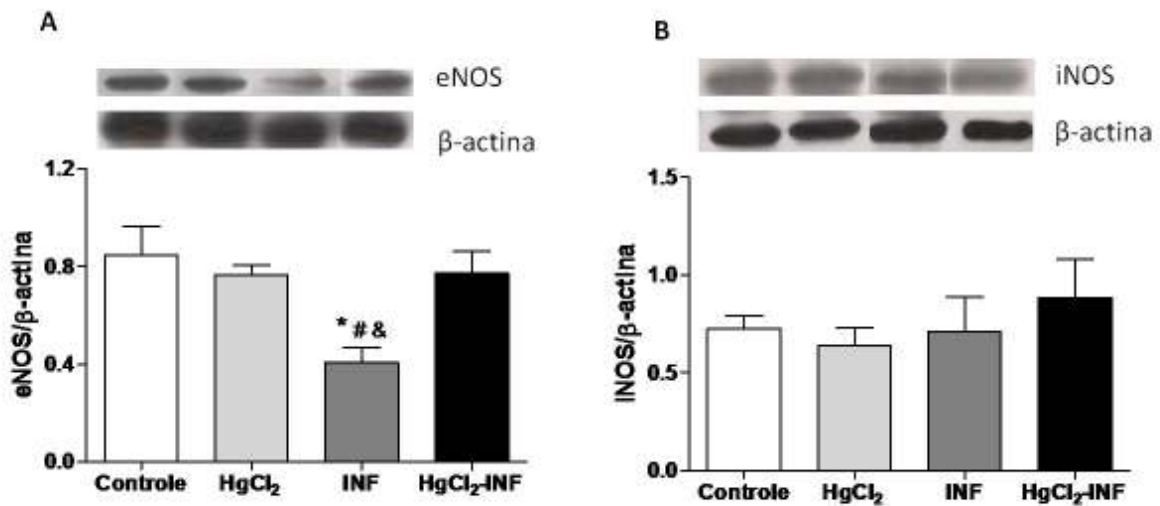
|                                    | <b>Rmax (%)</b> | <b>pD<sub>2</sub></b> |
|------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Controle (34)                      | 92,9 ± 2,4      | 6,42 ± 0,08           |
| Controle + 1400W (8)               | 102,2 ± 7,5     | 6,11 ± 0,20           |
| HgCl <sub>2</sub> (30)             | 110,6 ± 3,7     | 6,52 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> + 1400W (8)      | 104,5 ± 1,23    | 6,62 ± 0,06           |
| INF (25)                           | 116,5 ± 4,1     | 6,80 ± 0,09           |
| INF + 1400W (8)                    | 126,4 ± 8,3     | 6,67 ± 0,16           |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (25)        | 117,2 ± 4,8     | 6,80 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> -INF + 1400W (8) | 133,3 ± 10,0    | 7,40 ± 0,06§          |

Os valores estão expressos como média ± EPM. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

§p<0,05 vs condição sem o fármaco (Teste t-Student não pareado, comparando a presença e ausência do 1400W em cada grupo experimental).

As expressões protéicas das isoformas endotelial e induzível da NOS (eNOS e iNOS, respectivamente) foram detectadas através da técnica de Western Blot em segmentos aórticos de ratos dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Somente os animais do grupo INF apresentaram redução na expressão protéica da isoforma eNOS quando comparados aos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>-INF (Figura 37A). Entretanto, nenhuma diferença estatística na expressão protéica da isoforma iNOS foi observada entre os grupos avaliados (Figura 37B).



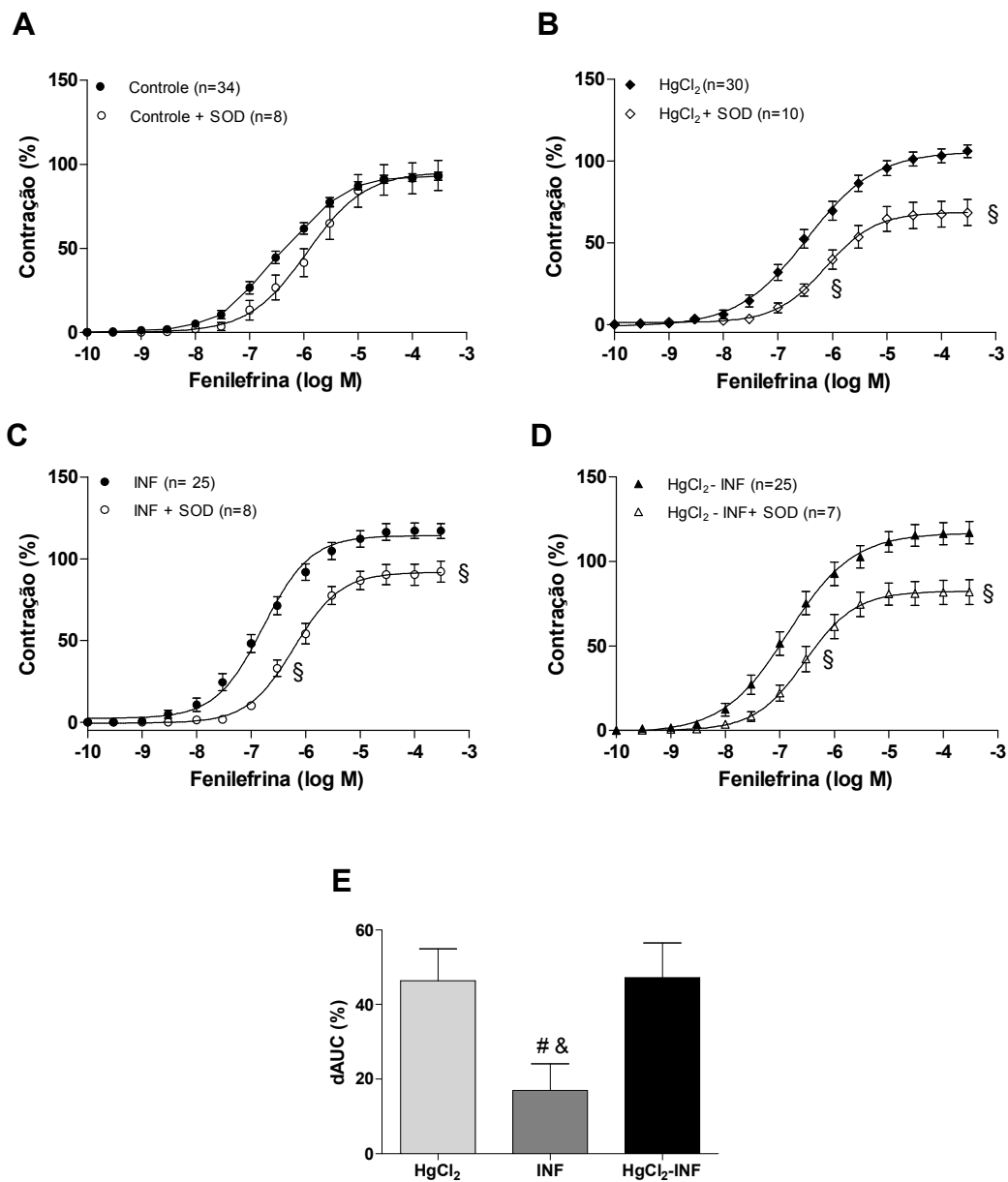


**Figura 37.** Resultados da expressão protéica das isoformas endotelial e induzível da óxido nítrico sintase (eNOS e iNOS, respectivamente), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta abdominal dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM e como relação entre a densidade das bandas da eNOS, iNOS e da  $\beta$ -actina. Controle, HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>-INF vs. INF  $p < 0,05$ . O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

#### 4.6.6.2 Envolvimento de radicais livres na sobre a resposta contrátil à fenilefrina em anéis isolados de aorta

Sabe-se que a biodisponibilidade de óxido nítrico pode ser reduzida por espécies reativas de oxigênio, aumentando assim a contração vascular. Diante disso, investigamos a influência das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil à fenilefrina. A exposição dos anéis de aorta à enzima superóxido dismutase (SOD, 150 U/ml) não modificou a reatividade à fenilefrina em anéis do grupo Controle. Porém, nos grupos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF, a remoção enzimática do ânion superóxido reduziu a resposta máxima e a sensibilidade à fenilefrina (Figura 38 Tabela 14), sendo que nos grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>-INF essa redução foi mais evidente, como observado pela análise da %dAUC (HgCl<sub>2</sub> 46,4  $\pm$  8,5; INF 16,9  $\pm$  7,2; HgCl<sub>2</sub>-INF 47,2  $\pm$  9,2) (Figura 38E). Esses resultados sugerem aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nos grupos

HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Entretanto, no grupo INF essa produção foi menor do que nos grupos HgCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>-INF.



**Figura 38.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B) HgCl<sub>2</sub>, (C) INF e (D) HgCl<sub>2</sub>-INF na presença e na ausência do fármaco SOD. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. #p<0.05 vs HgCl<sub>2</sub> e &p<0,05 vs HgCl<sub>2</sub>-INF. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos na presença e ausência da enzima SOD entre os grupos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. (ANOVA uma via).

**Tabela 14.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou ausência da enzima SOD dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

|                                  | Rmax (%)    | pD <sub>2</sub> |
|----------------------------------|-------------|-----------------|
| Controle (34)                    | 92,9 ± 2,4  | 6,42 ± 0,08     |
| Controle + SOD (8)               | 90,0 ± 7,6  | 5,91 ± 0,07     |
| HgCl <sub>2</sub> (30)           | 110,6 ± 3,7 | 6,52 ± 0,09     |
| HgCl <sub>2</sub> + SOD (10)     | 68,3 ± 7,9§ | 6,15 ± 0,09§    |
| INF (25)                         | 116,5 ± 8,4 | 6,67 ± 0,09     |
| INF + SOD (8)                    | 92,2 ± 6,4§ | 6,20 ± 0,07§    |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (25)      | 117,2 ± 4,8 | 6,80 ± 0,09     |
| HgCl <sub>2</sub> -INF + SOD (7) | 81,9 ± 7,3§ | 6,49 ± 0,11§    |

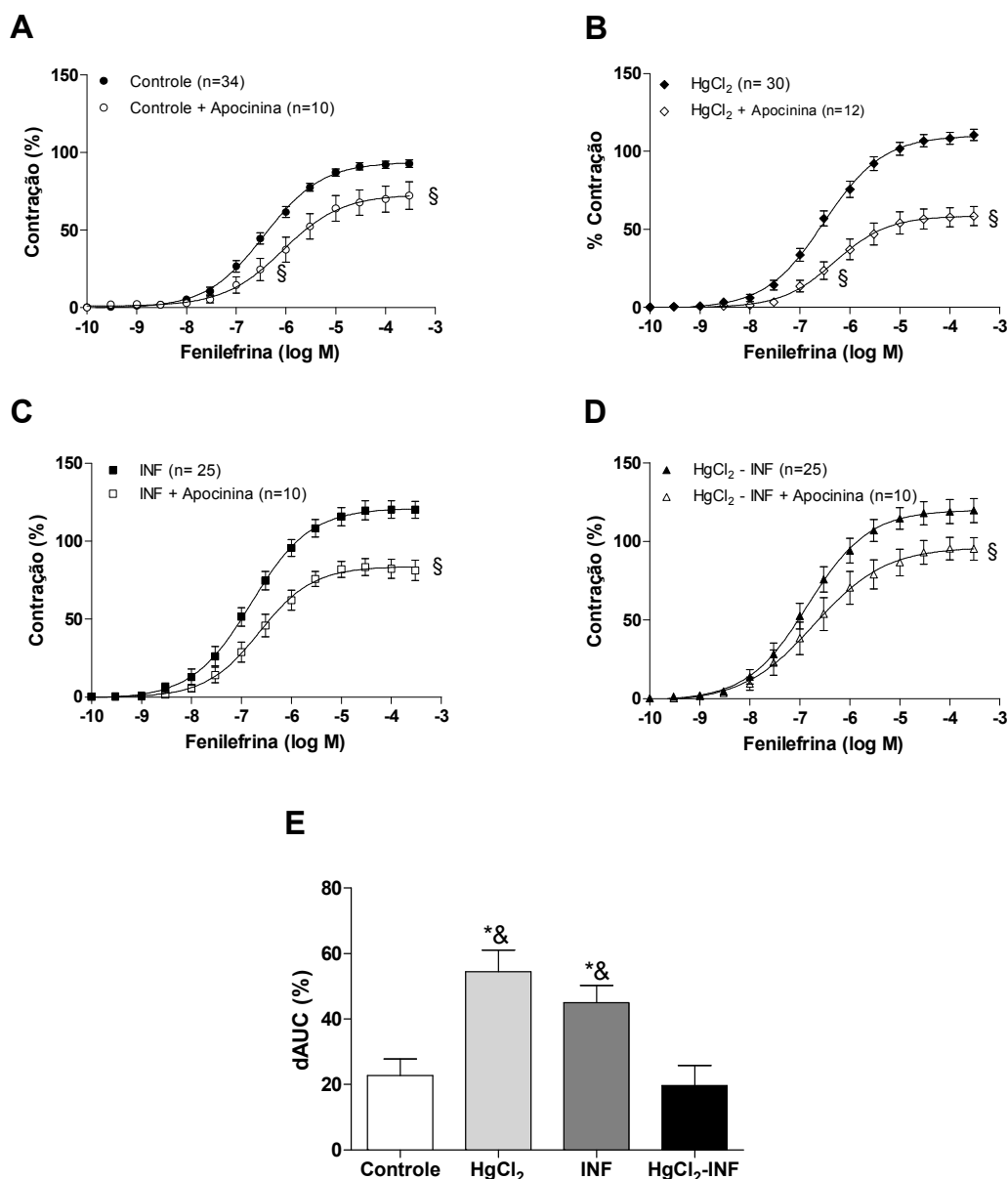
Os valores estão expressos como média ± EPM. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

§p<0,05 vs condição sem o fármaco (Teste t-Student não pareado, comparando na presença e ausência da SOD de cada grupo experimental).

A NADPH oxidase é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio do organismo. Para analisar a influência da NADPH oxidase na resposta contrátil à fenilefrina, utilizamos a apocinina (0,3 µM), inibidor não-seletivo da NADPH oxidase. A administração da apocinina reduziu a R<sub>máx</sub> das curvas de fenilefrina em todos os grupos avaliados (Figura 39 e Tabela 15) e reduziu a pD<sub>2</sub> nos grupos Controle e HgCl<sub>2</sub> (Tabela 15).

Para melhor visualização da magnitude dessa resposta, calculamos a porcentagem da diferença da área abaixo das curvas dos gráficos individualmente (HgCl<sub>2</sub> 46,4 ± 8,5; INF 16,9 ± 7,2; HgCl<sub>2</sub>-INF 47,2 ± 9,2, p < 0.05, ANOVA uma via) (Figura 39E). Dessa forma, observa-se que a redução da reatividade à fenilefrina

após a adição da apocinina ocorreu em maior magnitude nos anéis dos grupos  $\text{HgCl}_2$  e INF quando comparados aos grupos Controle e  $\text{HgCl}_2$ -INF. Com esses resultados, pode-se sugerir que a NADPH oxidase não é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio no grupo de animais infartados que foram previamente submetidos a exposição crônica ao cloreto de mercúrio.



**Figura 39.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B)  $\text{HgCl}_2$ , (C) INF e (D)  $\text{HgCl}_2$ -INF na presença e na ausência do fármaco apocinina. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. \* $p < 0.05$  vs Controle e & $p < 0,05$  vs  $\text{HgCl}_2$ -INF. (E) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos na presença e ausência

do fármaco apocinina entre os grupos. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. (ANOVA uma via).

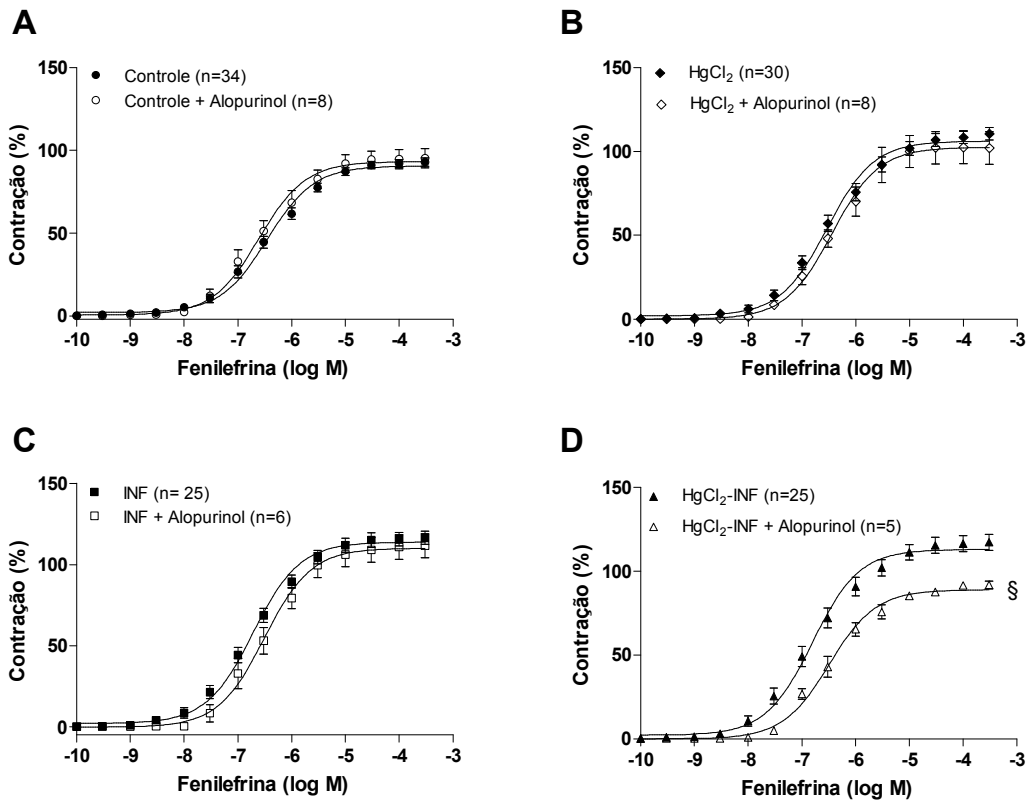
**Tabela 15.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou ausência do fármaco apocinina dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

|   | Rmax (%)    | $pD_2$       |
|---|-------------|--------------|
| Controle (34)                           | 92,9 ± 2,4  | 6,42 ± 0,08  |
| Controle + Apocinina (10)               | 68,3 ± 8,9§ | 5,96 ± 0,18§ |
| HgCl <sub>2</sub> (30)                  | 110,6 ± 3,7 | 6,52 ± 0,09  |
| HgCl <sub>2</sub> + Apocinina (12)      | 58,5 ± 6,0§ | 6,16 ± 0,15§ |
| INF (25)                                | 116,5 ± 8,4 | 6,67 ± 0,09  |
| INF + Apocinina (10)                    | 81,2 ± 6,4§ | 6,64 ± 0,14  |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (25)             | 117,2 ± 4,8 | 6,80 ± 0,09  |
| HgCl <sub>2</sub> -INF + Apocinina (10) | 95,2 ± 7,2§ | 6,64 ± 0,20  |

Os valores estão expressos como média ± EPM. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

§ $p < 0,05$  vs condição sem o fármaco (Teste t-Student não pareado, comparando a presença e ausência da apocinina para cada grupo experimental).

Outra importante fonte vascular de produção das espécies reativas de oxigênio, principalmente após o infarto do miocárdio, é a xantina oxidase. Para analisar a influência da xantina oxidase na resposta contrátil à fenilefrina, foi utilizado o alopurinol (100  $\mu$ M), inibidor seletivo da xantina oxidase. Apenas o grupo HgCl<sub>2</sub>-INF apresentou alteração na curva de fenilefrina na presença desse fármaco, ocasionando redução na resposta máxima (Figura 40, Tabela 16).



**Figura 40.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B)  $\text{HgCl}_2$ , (C) INF e (D)  $\text{HgCl}_2$ -INF na presença e na ausência do fármaco allopurinol. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. \* $p < 0,05$  vs  $\text{HgCl}_2$ -INF + Allopurinol (Teste t-Student não pareado).

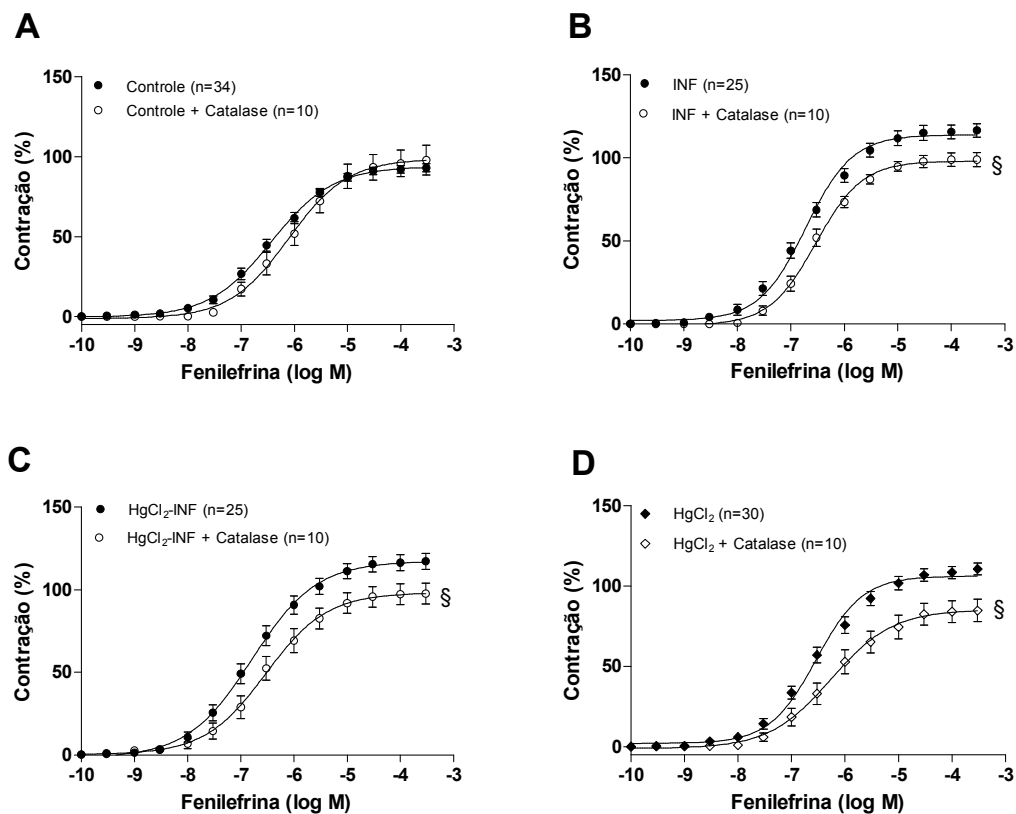
**Tabela 16.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou ausência do fármaco alopurinol dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

|   | <b>Rmax (%)</b> | <b>pD<sub>2</sub></b> |
|---|-----------------|-----------------------|
| Controle (34)                           | 92,9 ± 2,4      | 6,42 ± 0,08           |
| Controle + Alopurinol (8)               | 95,2 ± 5,8      | 6,57 ± 0,12           |
| HgCl <sub>2</sub> (30)                  | 110,6 ± 3,7     | 6,52 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> + Alopurinol (8)      | 102,1 ± 9,8     | 6,49 ± 0,11           |
| INF (25)                                | 116,5 ± 8,4     | 6,67 ± 0,09           |
| INF + Alopurinol (6)                    | 111,7 ± 7,5     | 6,50 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (25)             | 117,2 ± 4,8     | 6,80 ± 0,09           |
| HgCl <sub>2</sub> -INF + Alopurinol (5) | 91,9 ± 2,3§     | 6,48 ± 0,09           |

Os valores estão expressos como média ± EPM. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

§p<0,05 vs. condição sem o fármaco (Teste t-Student não pareado, comparando a presença e ausência do alopurinol para cada grupo experimental).

A participação do peróxido de hidrogênio na reatividade à fenilefrina foi avaliada através da administração da enzima catalase (1000 U/ml), responsável por catalisar a reação do peróxido de hidrogênio formando oxigênio e água. A adição da catalase não modificou a resposta contrátil à fenilefrina de anéis provenientes de ratos do grupo Controle. Entretanto, a remoção catalítica do peróxido de hidrogênio reduziu significativamente a resposta máxima à fenilefrina em anéis dos grupos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF (Figura 41, Tabela 17). Sendo assim, a produção de ânion superóxido pela catalase encontra-se semelhante nos animais dos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.



**Figura 41.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos (A) Controle, (B) HgCl<sub>2</sub>, (C) INF e (D) HgCl<sub>2</sub>-INF na presença e na ausência da enzima catalase. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses. §p<0,05 vs. condição sem o fármaco (Teste t-Student não pareado, comparando a presença e ausência da catalase em cada grupo experimental).



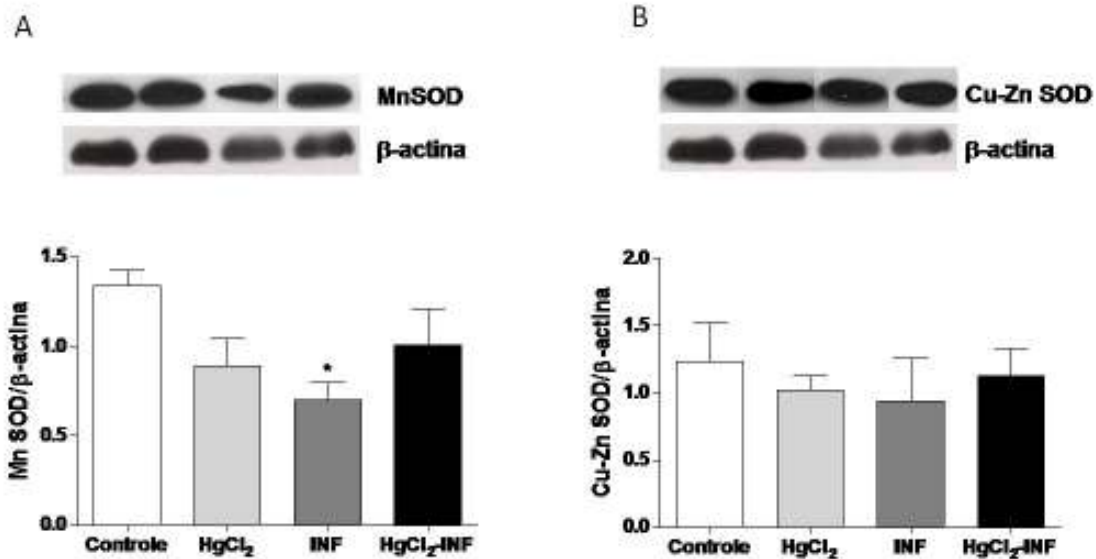
**Tabela 17.** Valores de resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta na presença ou ausência da enzima catalase dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF.

|  | Rmax (%)     | pD <sub>2</sub> |
|--|--------------|-----------------|
| Controle (34)                          | 92,9 ± 2,4   | 6,42 ± 0,08     |
| Controle + Catalase (10)               | 98,8 ± 9,3   | 5,99 ± 0,16     |
| HgCl <sub>2</sub> (30)                 | 110,6 ± 3,7  | 6,52 ± 0,09     |
| HgCl <sub>2</sub> + Catalase (8)       | 102,1 ± 9,8§ | 6,49 ± 0,11     |
| INF (25)                               | 116,5 ± 8,4  | 6,67 ± 0,09     |
| INF + Catalase (10)                    | 98,9 ± 4,2§  | 6,54 ± 0,07     |
| HgCl <sub>2</sub> -INF (25)            | 117,2 ± 4,8  | 6,80 ± 0,09     |
| HgCl <sub>2</sub> -INF + Catalase (10) | 97,6 ± 7,3§  | 6,54 ± 0,15     |

Os valores estão expressos como média ± EPM. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

§p<0,05 vs. condição sem o fármaco (Teste t-Student não pareado, comparando a presença e ausência da Catalase em cada grupo experimental).

Com o objetivo de investigar a participação da capacidade antioxidante, as expressões protéicas das isoformas manganês e cobre/zinco da SOD (Mn SOD e Cu/Zn SOD, respectivamente) foram quantificadas através da técnica de Western Blot em segmentos aórticos de ratos dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os animais do grupo INF apresentaram redução na expressão protéica da isoforma MnSOD quando comparados ao grupo Controle (Figura 42A). Entretanto, nenhuma diferença estatística na expressão protéica da isoforma Cu/Zn SOD foi observada entre os grupos avaliados (Figura 42B).



**Figura 42.** Resultados da expressão protéica das isoformas manganês e cobre/zinco da SOD (MnSOD e Cu-Zn SOD, respectivamente), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta dos grupos Controle, HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF. Os resultados estão expressos como média ± EPM, como relação entre a densidade das bandas da Mn SOD, Cu/Zn SOD e da β-actina. \*p<0,05. O número de animais utilizados estão representados entre parênteses.

## **DISCUSSÃO**

---

## 5 Discussão

### 5.1 ASPECTOS GERAIS

Recentes estudos demonstraram que o risco para o infarto do miocárdio encontra-se aumentado em pacientes que apresentem sinais de metais pesados em amostras de cabelo e urina (Salonen et al., 1995). Entretanto, até o presente momento, este é o primeiro trabalho com o desenho experimental destinado a descrever os mecanismos cardiovasculares envolvidos na associação entre o infarto agudo do miocárdio e a exposição crônica ao cloreto de mercúrio.

Inicialmente caracterizamos o nosso modelo experimental, com a avaliação dos parâmetros ponderais e hemodinâmicos de cada grupo experimental. Nossos resultados indicam que os animais submetidos à injúria do infarto do miocárdio apresentaram os clássicos sinais de insuficiência cardíaca. Entretanto a prévia intoxicação com o cloreto de mercúrio não foi capaz de adicionar danos aos parâmetros ponderais e hemodinâmicos já ocasionados pelo infarto do miocárdio. Adicionalmente, o cloreto de mercúrio isoladamente não alterou nenhum desses parâmetros avaliados.

No âmbito cardíaco, nossos resultados indicam que o infarto do miocárdio quando associado à exposição crônica ao cloreto de mercúrio promoveu menor dano a função contrátil desenvolvida por tiras isoladas de VD quando comparado ao infarto sozinho e isso pode ser explicado devido ao aumento do influxo de cálcio transsarcolemal. Além disso, confirmando os resultados funcionais obtidos, foi observado o aumento dos níveis protéicos do NCX e redução da SERCA2a em VD de ratos submetidos a exposição crônica ao cloreto de mercúrio e ao infarto agudo do miocárdio.

Por outro lado, o presente estudo também demonstrou que a associação entre o infarto agudo do miocárdio e a exposição crônica à baixas doses de cloreto de mercúrio causa disfunção endotelial em anéis isolados de aorta de ratos. Essa disfunção endotelial foi caracterizada pela redução na biodisponibilidade de NO, provavelmente relacionado ao aumento da produção de EROS, principalmente proveniente da xantina oxidase. Esses resultados podem ser conectados ao aumento de reatividade vascular à fenilefrina, o que reflete na redução da modulação endotelial, observada após a remoção do endotélio vascular e da administração de L-NAME.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS MODELOS UTILIZADOS

Para avaliar os efeitos cardiovasculares da associação entre o infarto do miocárdio e a exposição crônica ao cloreto de mercúrio, o presente estudo utilizou quatro grupos experimentais, sendo eles: Controle, grupo exposto ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), grupo infarto agudo do miocárdio (INF) e o grupo submetido as duas injúrias ( $\text{HgCl}_2$ -INF).

Nossos resultados confirmam que a exposição crônica, durante quatro semanas, à baixas doses de cloreto de mercúrio não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros ponderais avaliados, mesmo quando submetidos a cirurgia fictícia da indução do infarto do miocárdio ao final da terceira semana de exposição ao metal. Estudo prévio, utilizando o mesmo modelo de exposição ao cloreto de mercúrio, realizado por Furieri et al. (2011) também não observou nenhuma alteração ponderal ao final das quatro semanas de exposição ao cloreto de mercúrio (Furieri et al, 2011a).

Por outro lado, a indução do infarto agudo do miocárdio gerou alterações significativas entre os parâmetros ponderais avaliados. Ao final da terceira

semana de exposição, foi possível observar o ganho de peso normal e similar entre os grupos estudados. Entretanto, após uma semana da indução do infarto do miocárdio, ou seja, ao final das quatro semanas de experimento foi observado redução do peso corporal de ambos os grupos infartados (INF e HgCl<sub>2</sub>-INF). Ainda, foi observado aumento da razão do peso do VD pelo peso corporal, o que indica o desenvolvimento de hipertrofia de VD nos animais de ambos os grupos infartados. Além disso, esses mesmos animais apresentaram aumento na razão do peso dos pulmões pelo peso corporal, sugerindo a instalação de edema pulmonar.

Essas alterações ponderais, observadas no presente estudo, são classicamente encontradas em animais que apresentam sinais de insuficiência cardíaca. Estudo desenvolvido por Faria et al. (2011) afirma que a redução do peso corporal, avaliado durante os sete primeiros dias após a injúria do infarto do miocárdio, é um confiável marcador de caracterização do desenvolvimento da insuficiência cardíaca em ratos (Faria et al., 2011). Adicionalmente, em avaliação realizada por diferentes períodos após o infarto do miocárdio, foi possível observar redução do peso corporal final (Ono et al., 1998; Sartório et al., 2005), hipertrofia de VD (Pfeffer et al., 1979; Resende et al., 2006; Giuberti et al., 2007; Stefanon et al. 2013) e aumento da razão peso do pulmão sobre peso corporal (Jasmin et al., 2003; Giuberti et al., 2007) em ratos. Estima-se que essas alterações decorram do processo de remodelamento ventricular que acomete o miocárdio após a injúria isquêmica.

O complexo processo do remodelamento ventricular é ativado com o objetivo de manter preservada a função cardíaca. Apesar de seus mecanismos ainda não terem sido completamente elucidados, acredita-se que ele envolve a hipertrofia dos cardiomiócitos, apoptose e fibrose da matriz extracelular, além de

ativação de diversos fatores da cascata inflamatória (Mill et al, 2011, Ertl & Frantz, 2005). Em conjunto, essas alterações podem ocasionar danos ao sistema cardiovascular, fato que contribui para instalação da insuficiência cardíaca.

Ainda no âmbito ponderal, a razão do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal se manteve semelhante entre os grupos avaliados. Estima-se que mesmo com a perda de tecido após injúria do infarto do miocárdio, referente a área de formação da cicatriz, o tecido remanescente do ventrículo esquerdo se hipertrofia (Mill et al., 1990; Stefanon et al. 1994; Resende et al., 2006; Giuberti et al., 2007, Faria et al., 2011; Stefanon et al., 2013). Em suma, várias alterações nos parâmetros ponderais foram observadas após a indução do infarto do miocárdio, entretanto a prévia exposição ao cloreto de mercúrio não foi capaz de adicionar maiores danos além dos já causados pela injúria do infarto do miocárdio.

Quatro semanas de exposição à baixas doses de cloreto de mercúrio não modificou nenhum dos parâmetros hemodinâmicos avaliados nesse estudo. Corroborando nossos resultados, trabalhos anteriores também não observaram nenhuma alteração das funções hemodinâmicas em ratos submetidos às mesmas concentrações e período de exposição ao cloreto de mercúrio, exceto pela presença de discreto aumento na pressão diastólica final de ventrículo esquerdo, mas ainda dentro da faixa de normalidade para os valores padrões (Wiggers et al., 2008; Furieri et al., 2011a).

Em contrapartida, alterações hemodinâmicas foram encontradas em ambos os grupos submetidos ao infarto agudo do miocárdio. Observamos redução significativa da pressão arterial sistólica, diastólica e conseqüentemente da pressão arterial média. Além disso, ao avaliarmos a função hemodinâmica do

ventrículo esquerdo, constatamos redução das  $dP/dt+$  e  $dP/dt-$  e aumento da pressão diastólica final. Esses eventos já estão amplamente estabelecidos na literatura como sendo decorrentes da perda de massa contrátil e disfunção do miocárdio remanescente (Pfeffer et al., 1979; Pfeffer et al., 1985; Anversa et al., 1985; Giuberti et al., 2007; Sartório et al., 2007). Esse aumento de pressão diastólica observado ao final do enchimento ventricular já foi extensamente observado na literatura (Pfeffer et al., 1979; Pfeffer et al., 1985; Resende et al., 2006; Giuberti et al., 2007; Stefanon et al., 2009; Faria et al., 2011) e está intimamente relacionado às alterações observadas nos parâmetros ponderais, como congestão pulmonar e consequente hipertrofia do VD (Pfeffer et al., 1979; Pfeffer et al., 1985). Desta forma, este aumento na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo pode desencadear também um processo de remodelamento pulmonar causado pelo acúmulo de sangue na câmara cardíaca que de forma retrógrada atinge o pulmão. Este fato impõe ao VD a necessidade de aumentar a força contrátil para manter o débito sanguíneo pulmonar adequado, desencadeando a hipertrofia ventricular direita (Jasmin et al., 2003; Jasmin et al., 2004). De fato, como observamos no presente estudo, os animais submetidos à injúria do infarto do miocárdio apresentaram prejuízo da função hemodinâmica da câmara direita, caracterizada pelo aumento da PDFVD e redução das  $dP/dt+$  e  $dP/dt-$ , caracterizando assim um quadro grave de insuficiência cardíaca. Embora importantes estudos clínicos também mostrarem que a disfunção ventricular direita é preditora de pior prognóstico clínico em humanos com insuficiência cardíaca (Polak et al., 1983; Anavekar et al., 2008), poucos estudos foram delineados com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos envolvidos em tiras isoladas de VD após a injúria do infarto do miocárdio sozinho, ou quando associado a co-morbidades.



Outro importante fator relacionado ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca após o infarto do miocárdio é o tamanho da área de cicatriz. Estima-se, que quanto maior for a extensão da área de cicatriz, maior será a chance da progressão para a insuficiência cardíaca (Pfeffer et al., 1979; Faria et al., 2011). Entretanto, no nosso estudo, os animais de ambos os grupos submetidos à injúria do infarto do miocárdio apresentaram o mesmo tamanho na área de cicatriz, eliminando assim, um possível complicador no julgamento dos nossos resultados.

Em suma, à exposição crônica ao cloreto de mercúrio não foi capaz de adicionar danos aos parâmetros ponderais e hemodinâmicos já causados pela injúria do infarto do miocárdio. Contudo, as consequências entre a associação do infarto agudo do miocárdio e a exposição crônica ao cloreto de mercúrio permanece duvidosa. Em recente estudo, trabalhadores do sistema de saúde dos EUA foram avaliados quanto às concentrações de mercúrio e o aparecimento de doenças cardiovasculares. Nesse estudo, nenhuma associação entre os níveis de mercúrio presentes em amostras de unha e o desenvolvimento da doença arterial coronariana, acidente vascular encefálico e doenças cardiovasculares foi observado (Mozaffarian et al., 2011). Por outro lado, Guallar et al. (2002), em importante estudo caso-controle, observaram associação gradual e independente dos níveis de mercúrio presentes na unha e o risco de infarto do miocárdio. Além disso, outro estudo evidenciou significativa relação entre a concentração de mercúrio encontrada no cabelo e na urina de 24 horas como causador de eventos cardiovasculares, mesmo que os níveis de mercúrio ainda fossem considerados sub-tóxicos (Salonen et al., 1995). Nesse contexto, torna-se claro que à exposição a metais pesados é um fator de risco importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Uma vez que o infarto agudo do miocárdio pode ocorrer em pacientes expostos ao cloreto de mercúrio, o desenho experimental do

nosso estudo também buscou avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na associação dessas duas injúrias, nos âmbitos cardíaco e vascular.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA DE RATOS INFARTADOS PREVIAMENTE EXPOSTOS AO CLORETO DE MERCÚRIO

No âmbito cardíaco, a exposição crônica à baixas doses de cloreto de mercúrio não foi capaz de alterar os parâmetros de contratilidade miocárdica avaliados em tiras isoladas de VD de ratos. Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados no trabalho de Furieri e colaboradores (2011), que estudou os efeitos do cloreto de mercúrio em músculos papilares isolados. Entretanto, vale ressaltar que o objetivo do nosso estudo foi avaliar a associação entre a exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio com o infarto agudo do miocárdio, visto que até o presente momento, nenhum estudo foi desenvolvido com o objetivo de descrever os mecanismos decorrentes das alterações induzidas pela associação dessas duas injúrias.

A disfunção cardíaca que acompanha o infarto do miocárdio é caracterizada por alterações nos efeitos lusitrópico e inotrópico do coração (Mill et al., 2011; Stefanon et al., 2013). Entretanto, no presente estudo, o infarto do miocárdio não alterou alguns dos parâmetros de contração basal avaliados, como a força máxima desenvolvida e o tempo de ativação em tiras isoladas do VD. Corroborando com nossos resultados, Araújo (2010) também não observou alteração na força máxima desenvolvida por tiras isoladas de VD de ratos sete dias após o infarto do miocárdio (Araújo, 2010). Por outro lado, visto que o tempo de relaxamento pode ser outro importante indicativo do prejuízo contrátil, esse parâmetro foi avaliado no presente estudo. Como esperado, no grupo INF o tempo despendido para atingir 90% do relaxamento máximo encontra-se

aumentado. Estima-se que essa alteração cardíaca esteja associada ao prejuízo da função do retículo sarcoplasmático, do influxo de cálcio transsarcolemal e do prejuízo funcional das proteínas regulatórias da dinâmica do cálcio (Mill et al., 2011; Stefanon et al., 2013). De fato, nos animais do grupo INF, o aumento no tempo despendido durante o relaxamento foi acompanhado de prejuízo na função do retículo sarcoplasmático, de redução no influxo de cálcio transsarcolemal e de redução da força desenvolvida durante o pico e o platô da manobra experimental do tétano. O que pode explicar os nossos achados, é que na insuficiência cardíaca, a densidade dos canais para cálcio tipo L aparece inalterada ou reduzida o que pode resultar no prejuízo do influxo de cálcio e conseqüentemente prejuízo na liberação do cálcio estocado no retículo sarcoplasmático (Yano, 2005).

Por outro lado, o presente estudo demonstrou que animais submetidos ao infarto do miocárdio após exposição crônica ao cloreto de mercúrio não modificaram os parâmetros de contração basal, por exemplo, o pico de força isométrica, o tempo necessário para atingir 90% do relaxamento máximo e os índices de  $dP/dt+$  e  $dP/dt-$  de tiras de VD. Adicionalmente, nossos resultados sugerem a permanência, mesmo que em menor parte, da funcionalidade do retículo sarcoplasmático em tiras de VD no grupo  $HgCl_2$ -INF quando comparado ao grupo Controle. Uma plausível explicação da similaridade de força desenvolvida, em condições basais, foi o aumento do influxo de cálcio transsarcolemal no grupo de animais infartados que foram previamente submetidos à exposição crônica ao cloreto de mercúrio. Outra possível justificativa para estes resultados, foi o comportamento da força tetânica desenvolvida por esses animais, após o bloqueio da atividade do retículo sarcoplasmático pelo uso da cafeína. De fato, tanto o pico como o platô de contração foram mantidos nos

animais infartados que foram previamente submetidos a exposição crônica ao cloreto de mercúrio. Considerando que em cada condição experimental acima descrita, as contrações são dependentes do influxo de cálcio transsarcolemal e da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, pode-se sugerir que ocorre o aumento na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio no grupo  $\text{HgCl}_2\text{-INF}$ , uma vez que o influxo de cálcio transsarcolemal encontra-se aumentado e a tensão tetânica está normalizada.

Certamente, a exposição crônica à baixas doses de cloreto de mercúrio não é protetora contra o infarto do miocárdio, pois vários são os indicadores de que a exposição ao mercúrio está associado ao aumento de doenças cardiovasculares (Houston 2011; Furieri et al., 2011a; Salonen et al., 1995). Por exemplo, em altas concentrações, o mercúrio reduz a tensão tetânica desenvolvida, a atividade da ATPase miosínica e induz inotropismo negativo no ventrículo esquerdo de ratos (Oliveira et al., 1994, Moreira et al., 2003). Adicionalmente, em baixas concentrações o mercúrio também induz inotropismo negativo no ventrículo esquerdo de ratos, além de reduzir a resposta  $\beta$ -adrenérgica em corações perfundidos isoladamente (Furieri et al., 2011a). Entretanto, nossos resultados sugerem que animais infartados cronicamente expostos ao cloreto de mercúrio, quando avaliados sete dias após o evento isquêmico, não apresentaram no VD prejuízo da função lusitrópica,  $dF/dt$ -, função do retículo sarcoplasmático, redução do influxo de cálcio transsarcolemal e a baixa sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio.

Os possíveis mecanismos que podem explicar os nossos achados, estão relacionados às alterações dos níveis protéicos do NCX, SERCA2a e PLB (Bers, 2013). Prévios estudos experimentais mostraram que a exposição crônica à baixas doses de cloreto de mercúrio reduz a expressão protéica da SERCA2a e

do NCX e aumenta a expressão protéica da PLB e pPLB<sup>Ser16</sup> em amostras obtidas do coração total (Furieri et al., 2011a). Nossos achados apresentaram parcial similaridade, visto que os níveis protéicos da SERCA2a e pPLB<sup>Ser16</sup> também encontram-se aumentados. Entretanto, nenhuma alteração nos níveis protéicos do PLB e do NCX foram observadas. Os diferentes tecidos de amostras utilizadas nos distintos estudos, poderiam explicar porque os níveis protéicos do PLB e do NCX não alteraram no presente estudo, uma vez que utilizamos amostras provenientes apenas do VD ao invés de amostra do coração total. Embora os níveis protéicos da SERCA2a e pPLB<sup>Ser16</sup> estejam aumentados, a atividade mecânica das tiras isoladas de VD encontram-se preservadas mesmo após a exposição crônica ao cloreto de mercúrio.

Vários estudos sugerem que a recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático encontra-se prejudicado em corações de pacientes com insuficiência cardíaca e isso tem sido atribuído a vários mecanismos, como a redução da expressão e atividade da SERCA2a e no aumento da atividade inibitória do PLB (Moreira et al., 2003; Yano et al., 2005). Como esperado, nos animais do grupo INF foi observado a redução da expressão protéica da SERCA2a e aumento dos níveis protéicos da PLB. Portanto, em conjunto, esses resultados poderiam explicar o prejuízo encontrado na função do retículo sarcoplasmático do grupo INF, resultando no aumento despendido na recaptação do cálcio, com conseqüente prejuízo na função lusitrópica, na qual pode ser associado ao prejuízo observado na  $dF/dt$ -. Por outro lado, a exposição ao cloreto de mercúrio associado ao infarto do miocárdio também reduziu a expressão protéica da SERCA2a mas não modificou a expressão da PLB. Esses resultados corroboram com os dados funcionais encontrados, como menor dano funcional do retículo sarcoplasmático e normalização da função lusitrópica quando comparado

aos animais INF. Além disso, o aumento na expressão protéica do NCX pode explicar porque o tempo despendido para atingir 90% do relaxamento máximo encontra-se normal, mesmo na presença de maior influxo de cálcio transarcolemal.

Adicionalmente, o miocárdio insuficiente é marcado por liberações espontâneas de cálcio do retículo sarcoplasmático que ocasionam o aumento da variabilidade de contração dos sarcomêros, no qual contribui para a redução dos efeitos inotrópicos presentes na insuficiência cardíaca (Orchard et al., 1983). De fato, nós observamos redução na função  $\beta$ -adrenérgica em ambos os grupos submetidos ao infarto do miocárdio (INF e  $HgCl_2$ -INF), no qual refletiu na redução da resposta inotrópica após o estímulo adrenérgico induzido pela administração do isoproterenol.

Em suma, no âmbito cardíaco, nossos resultados indicam que a exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio amenizam o prejuízo na função do retículo sarcoplasmático e no influxo de cálcio transarcolemal como observado após sete dias do infarto do miocárdio, provavelmente por agir na expressão protéica do PLB, SERCA2a e NCX, em tiras isoladas de VD de ratos.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR DE RATOS INFARTADOS PREVIAMENTE EXPOSTOS AO CLORETO DE MERCÚRIO

A severidade da disfunção endotelial tem sido usada como preditora para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a doença vascular periférica, acidente vascular encefálico e insuficiência cardíaca (Vanhoutte et al., 2009; Rajendran et al., 2013). Após o infarto do miocárdio o desenvolvimento da insuficiência cardíaca pode ser consequência do negativo remodelamento ventricular (Mill et al., 2011) e como também da instalação da disfunção endotelial

apresentada por esses pacientes (Bauersachs & Widder, 2008; Vanhoutte et al., 2009). Por outro lado, estudos sugerem que indivíduos com altos níveis de mercúrio na urina, cabelo e unha do pé tem o risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Salonen et al. 1995; Houston MC, et al., 2007; Park et al., 2013), notavelmente a disfunção endotelial (Wiggers et al., 2008b, Furieri et al., 2011b).

Apesar dessas evidências, as consequências do envolvimento da associação entre o infarto agudo do miocárdio e a exposição crônica à baixas doses de cloreto de mercúrio, no âmbito vascular, ainda permanece duvidosa. Bautista et al. (2009) não encontrou nenhuma associação entre a presença de mercúrio e alterações na manobra de dilatação mediada por fluxo em humanos. Entretanto, diversos estudos experimentais mostraram o efeito direto da exposição aguda ou crônica ao mercúrio e o aparecimento de disfunção endotelial, sendo esta caracterizada pela redução na biodisponibilidade do NO e aumento na produção das EROS (Wiggers et al. 2008b, Furieri et al., 2011, Lemos et al., 2012).

No presente estudo, nós observamos que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio associado ao infarto agudo do miocárdio promoveu o aumento da reatividade vascular à fenilefrina similar ao encontrado nos grupos INF e HgCl<sub>2</sub> em anéis isolados de aorta. Esses resultados podem ser explicados pela redução na modulação endotelial na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, pois quando comparamos a %dAUC de anéis com e sem endotélio vascular dos grupos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF eles apresentaram menor %dAUC em relação aos animais do grupo Controle.

Sabendo que alterações na biodisponibilidade de NO podem caracterizar o quadro de disfunção endotelial, sua função foi abordada com maior riqueza de detalhes. Tendo em vista que um dos principais fatores liberados pelo endotélio vascular é o NO (Furchgott e Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987), suas ações são amplamente descritas na literatura. Dentre elas, destacam-se, seu importante papel na manutenção da integridade endotelial ao regular o tônus vascular, por pronunciada ação vasodilatadora, além da sua capacidade de inibir a agregação plaquetária (Radomski et al., 1991; Freedman et al., 1999), adesão leucocitária à parede vascular (Kubes et al., 1991; Lefer et al., 1999) e a proliferação das células musculares lisas (Garg & Hassid, 1989). A produção de NO é estimulada por diversos fatores químicos, como catecolaminas, serotonina, bradicinina e histamina; e forças mecânicas, como o estresse de cisalhamento. O NO é sintetizado nas células endoteliais quando o aminoácido L-arginina é convertido a L-citrulina e NO, ao ter seu grupamento guanidino oxidado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês “nitric oxide synthase”) (Palmer et al., 1987; Palmer & Moncada, 1991). Essa reação envolve co-fatores como, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida – NADPH), a tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina adenina mononucleotídeo (FMN) (Palmer et al., 1987; Angus & Cocks, 1989; Palmer & Moncada, 1991; Busse et al., 1994).

Atualmente, três isoformas da NOS estão bem descritas. A NOS endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS) são isoformas constitutivamente expressas e dependentes da formação do complexo cálcio-calmodulina para serem ativadas. E a terceira isoforma é a induzível (iNOS) sendo expressa em condições adversas, como em processos inflamatórios, sendo independente do aumento



das concentrações intracelulares de cálcio (Palmer & Moncada, 1991; Xie et al., 1992; Förstemann et al., 1993, Förstemann et al., 1994).

Uma vez sintetizado e liberado pelas células endoteliais, o NO exerce sua função vasodilatadora ao se difundir facilmente para as células do músculo liso vascular (MLV). O relaxamento é mediado pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel que hidrolisa a moléculas 5'- trifosfato de guanosina (GTP) em 3'5' – monofosfato cíclico de guanosina (GMP<sub>c</sub>). O aumento da concentração do GMP<sub>c</sub> ativa a proteína quinase G (PKG), sendo responsável pela fosforilação de diversas proteínas, levando ao relaxamento do MLV por redução da concentração intracelular de cálcio (Ignarro & Kadowitz, 1985; Rapoport & Murod, 1993).

Baseado nisso, a influência do NO sobre a resposta contrátil à fenilefrina foi avaliada através da incubação de um inibidor não-seletivo da NOS, L-NAME (100 mM) em todos os grupos experimentais. A incubação com L-NAME promoveu redução na %dAUC nos grupos HgCl<sub>2</sub>, INF e HgCl<sub>2</sub>-INF quando comparados ao grupo Controle. Com isso, sugerimos que o aumento da reatividade vascular à fenilefrina e a redução da modulação endotelial no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF podem ser consequências da redução na biodisponibilidade do NO observada nesses animais. De acordo com nossos resultados, como previamente descrito, a exposição crônica ao cloreto de mercúrio aumenta a reatividade vascular a fenilefrina, provavelmente como resultado da redução na biodisponibilidade do NO em anéis isolados de aorta e coronária de ratos (Wiggers et al, 2008b; Furieri et al., 2011b; Rizzetti et al, 2013). Por outro lado, o infarto agudo do miocárdio causa a disfunção endotelial, caracterizada pelo aumento da reatividade vascular à fenilefrina e redução na expressão protéica da eNOS (Comini et al., 1996; Schafer et al., 2003). Sabe-se que o principal regulador fisiológico da expressão protéica da eNOS *in vivo* é o estresse de

cisalhamento (do inglês, *shear stress*) (Li et al., 2002; Harisson et al., 2006) e que a insuficiência ventricular esquerda reduz o fluxo sanguíneo nas artérias de condutância e resistência, o que resulta na redução do estresse de cisalhamento, ou seja, estudos estimam que na insuficiência cardíaca esse regulador esteja prejudicado e conseqüentemente reduz a expressão protéica da eNOS (Harisson et al., 2006). Como foi claramente observado no presente estudo nos animais do grupo INF. Entretanto, no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF a redução na biodisponibilidade do NO não foi acompanhada pela redução na expressão protéica da eNOS, sugerindo outro mecanismo responsável pela redução da biodisponibilidade do NO nesse grupo.

Como exposto anteriormente, a produção de NO também pode ser modulada pela iNOS, a isoforma induzível da NOS, frequentemente ativada após injúrias como a que acontece na fase inflamatória após o infarto agudo do miocárdio (Neumann et al., 1995; Deten et al., 2002, Sartório et al., 2005). Com isso, para verificar se a iNOS poderia estar envolvida na redução da biodisponibilidade do NO, nós administramos o inibidor farmacológico da iNOS aos anéis isolados de aorta. O inibidor da iNOS, 1400W, não alterou a reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta submetidos a exposição crônica ao cloreto de mercúrio ou infarto do miocárdio, separadamente. Entretanto, após a administração do 1400W, os animais submetidos à associação entre a exposição à baixas doses de cloreto de mercúrio e à injúria do infarto do miocárdio apresentaram produção de NO derivado da iNOS, apesar de nenhuma alteração na expressão protéica da iNOS ter sido observada em nenhum dos grupos avaliados. Sendo assim, a produção do NO via iNOS pode ser responsável por restaurar o relaxamento dependente do endotélio nos animais do grupo HgCl<sub>2</sub>-INF. Entretanto, apesar desses resultados, a injúria do infarto do miocárdio

quando associado a exposição crônica ao cloreto de mercúrio causarem disfunção vascular por aumentar a resposta contrátil a fenilefrina e por reduzir a biodisponibilidade de NO. Interessantemente, nossos resultados observaram redução na vasodilatação induzida pela ACh nos grupos HgCl<sub>2</sub> e INF, mas não nos animais que foram submetidos a exposição crônica ao cloreto de mercúrio quando associado à injúria do infarto do miocárdio (HgCl<sub>2</sub>-INF). Com isso, nós podemos sugerir que a atividade da iNOS encontra-se aumentada nesse grupo de animais. De fato, o aumento na atividade da iNOS pode ser observada na fase aguda após o infarto do miocárdio (Sartório et al., 2005).

Outro importante mecanismo que pode contrabalancear a produção de NO é a formação de EROs (Förstermann, 2010). As EROs são metabólitos do oxigênio que, por apresentarem um ou mais elétrons desemparelhados, são altamente instáveis e reativos (Förstermann, 2010; Harrison & Gongorra, 2009; Beckman & Koppenol, 1996). Estima-se que as EROs formadas em excesso reagem com o NO, alterando a sinalização fisiológica e levando a produção de substâncias tóxicas reativas. As principais EROs são o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), o peroxinitrito (OONO<sup>•</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é formado pela redução univalente do oxigênio molecular e pode ser reduzido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> pela SOD, mas sua reação com o NO ocorre mais rapidamente levando à produção de OONO<sup>•</sup> e à redução da vasodilatação dependente do endotélio (Beckman & Koppenol, 1996; Montezano & Touyz, 2011). Já o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é mais estável, pode ser hidrolisado pela catalase ou glutathione peroxidase, porém pode levar à formação de outros radicais mais instáveis como OH<sup>•</sup> (Towyz & Schffrin, 2000).

Para verificar a nossa hipótese das EROs estarem ativadas no nosso modelo experimental, a SOD, enzima com papel antioxidante, e a catalase,

enzima antioxidante do  $H_2O_2$  foram utilizadas nos anéis isolados de aorta de todos os grupos experimentais. Ambas as enzimas reduziram a resposta máxima produzida pela fenilefrina no grupo  $HgCl_2$ -INF, sugerindo que a associação entre essas duas injúrias induzem o processo do estresse oxidativo, no qual provavelmente resulta na redução da biodisponibilidade do NO. Ainda, quando a injúria do infarto do miocárdio está associada a exposição crônica ao cloreto de mercúrio produz mais EROs que a injúria do infarto sozinha. Em conjunto, esses resultados confirmam que a redução da biodisponibilidade do NO após o infarto do miocárdio é devido à redução na expressão protéica da eNOS e, em menor parte, à produção da EROs. Embora, esse mecanismo parece não ocorrer nos animais  $HgCl_2$ -INF.

A NAD(P)H oxidase é descrita como a principal fonte de EROs na parede vascular de aorta capaz de prejudicar a função endotelial em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (Hare & Stamler, 2005) e também em exposição ao cloreto de mercúrio (Wiggers et al., 2008b; Furieri et al., 2011b). Nesse contexto, para verificar se a NAD(P)H medeia a formação das EROs, nós usamos seu inibidor não específico, a apocinina. A exposição a apocinina promoveu redução na resposta vasoconstritora a fenilefrina em anéis isolados de aorta dos animais  $HgCl_2$ -INF. Entretanto, essa resposta foi similar da encontrada nos animais Controle, sugerindo que o estresse oxidativo observado no grupo  $HgCl_2$ -INF não foi proveniente da NAD(P)H oxidase. Esse resultado aumenta a idéia de que outra fonte produtora de EROS está fazendo esse papel no grupo  $HgCl_2$ -INF.

Outra importante fonte de EROs vascular é a xantina oxidase (Landmesser et al., 2002, George and Struthers, 2009). A xantina oxidase rapidamente doa elétrons para o oxigênio molecular, produzindo  $O^{2-}$  e  $H_2O_2$  (George and Struthers, 2009). O aumento da atividade da xantina oxidase foi observada após a injúria do

infarto do miocárdio e quando esses pacientes eram tratados com alopurinol foi observado a redução da incidência de apoptose em áreas não-isquêmicas (Xiao et al., 2009). Além disso, o aumento da atividade da xantina oxidase no endotélio vascular tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (Landmesser et al, 2002). Com o objetivo de investigar essa via, nós bloqueamos a xantina oxidase com o alopurinol (100  $\mu$ M). Nenhuma alteração na reatividade vascular à fenilefrina foi observada após a administração do alopurinol em anéis provenientes dos grupos  $HgCl_2$  e INF. Estudos clínicos sugerem que a produção de EROs através da xantina oxidase ocorra apenas na fase crônica da insuficiência cardíaca (Grimaldi-Besouda et al., 2014; Landmesser et al, 2002). De fato, nossos resultados obtidos de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio não apresentaram alteração na reatividade vascular após administração do alopurinol, sugerindo que a xantina oxidase não participe da formação de EROs nesse grupo de animais. Por outro lado, Mondal & Mitra (1996) observaram que o mercúrio em altas doses pode inativar a xantina oxidase ao se ligar aos grupamentos SH dessa enzima. Todavia, no presente estudo o grupo  $HgCl_2$  foi submetido a crônica exposição a baixas doses de cloreto de mercúrio, que provavelmente não foi suficiente para inativar a xantina oxidase. Entretanto, a associação entre o infarto agudo do miocárdio e a exposição crônica ao cloreto de mercúrio reduziu a reatividade vascular a fenilefrina após a administração do alopurinol. Diante desses resultados, nós descrevemos no presente trabalho que a ativação aguda das EROs via xantina oxidase modula a disfunção endotelial encontrada em anéis isolados de aorta de animais que sofreram o infarto do miocárdio associado a prévia exposição ao cloreto de mercúrio. Sendo assim, a xantina oxidase é fonte produtora de EROs apenas no grupo  $HgCl_2$ -INF.

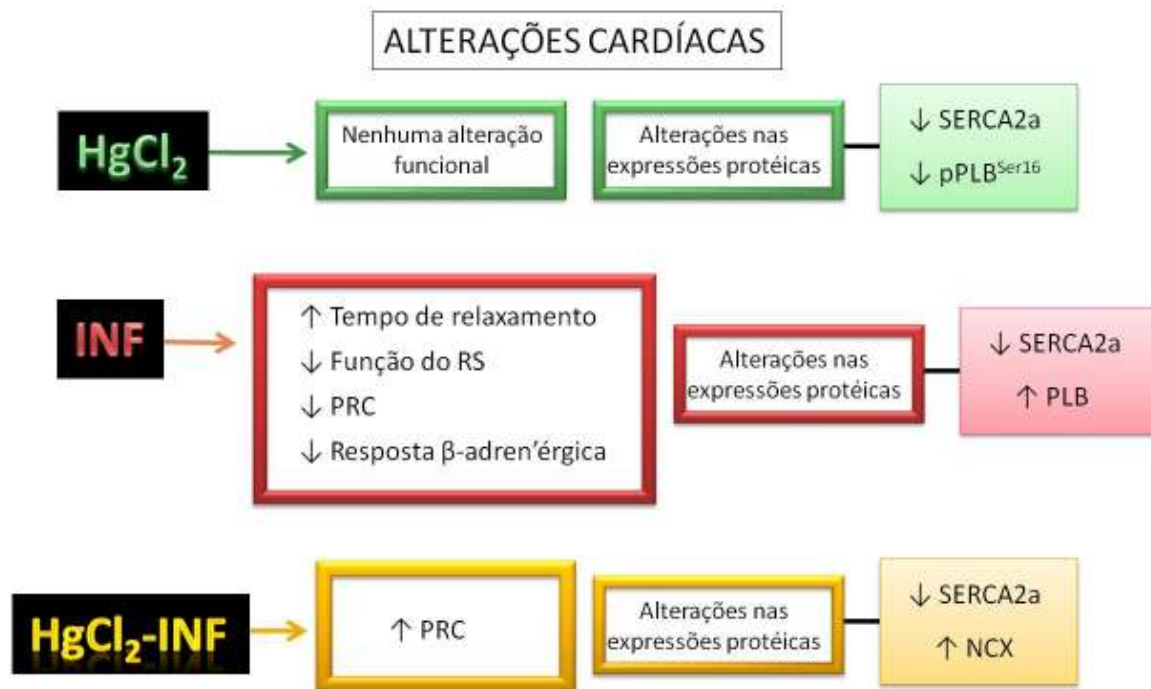
Adicionalmente, a instalação da disfunção endotelial também é marcada pela redução da produção endógena de agentes antioxidantes (Cai & Harrison, 2000; Bauersachs & Widder, 2008). Deste modo, os animais submetidos ao infarto do miocárdio apresentaram redução na expressão protéica da Mn SOD em anéis isolados de aorta, fato este, que pode contribuir para a disfunção endotelial observada no grupo INF. Entretanto, os animais expostos cronicamente ao cloreto de mercúrio que sofreram o infarto do miocárdio mantiveram a expressão protéica da Mn SOD inalterada, fato este que não foi suficiente para prevenir a disfunção endotelial causada pela produção das EROs observada no grupo HgCl<sub>2</sub>-INF.

Em suma, no âmbito vascular, nossos dados indicam que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio associado à injúria do infarto do miocárdio causam disfunção endotelial. Além disso, nós encontramos que essa disfunção é causada pelo aumento das EROs principalmente proveniente da xantina oxidase, que reduz a biodisponibilidade do NO.

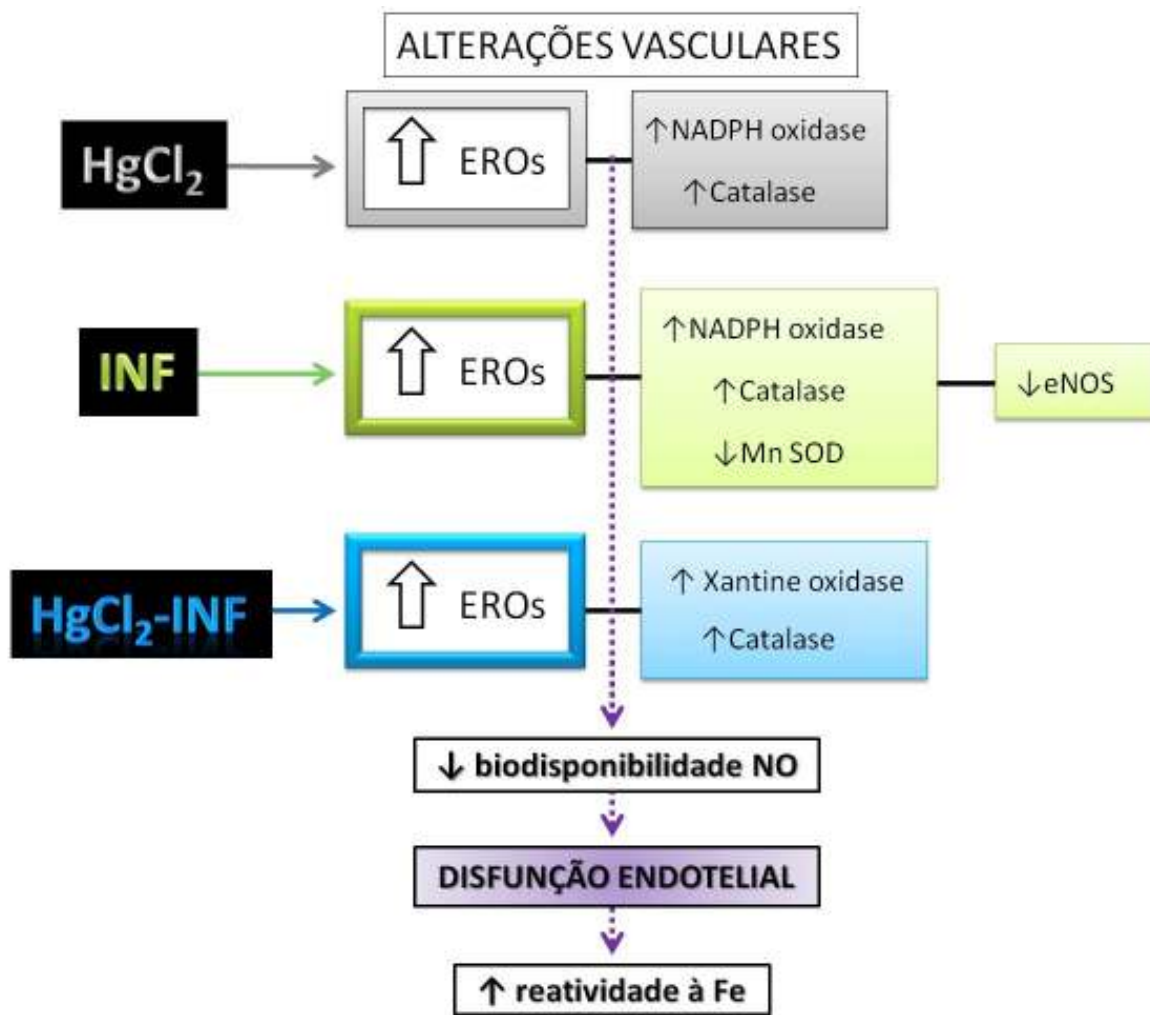
# **SUMÁRIO DOS RESULTADOS**

---

## 6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS







## **CONCLUSÃO**

---

## 7 CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos concluir que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio não foi capaz de adicionar danos aos parâmetros ponderais e hemodinâmicos já causados pela injúria do infarto do miocárdio. Entretanto, no âmbito cardíaco, a exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio ameniza o prejuízo na função do retículo sarcoplasmático e no influxo de cálcio transarcolemal como observado após sete dias do infarto do miocárdio, provavelmente por agir na expressão protéica do PLB, SERCA2a e NCX, em tiras isoladas de VD de ratos. Por outro lado, no âmbito vascular, a exposição crônica ao cloreto de mercúrio associado à injúria do infarto do miocárdio causa disfunção endotelial, causada principalmente pelo aumento das EROs, notavelmente proveniente da xantina oxidase, que reduzem a biodisponibilidade do NO nesses animais.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahlers BA, Song J., Wang J., Zhang XQ, Carl LL, Tadros GM, Rothblum LI, Cheung JY. Effects of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase overexpression in postinfarction rat myocytes. *J Appl Physiol* 2005; 98: 2169-2176.

Anavekar NS, Skali H, Bourgoun M, Ghali JK, Kober L, Maggioni AP, McMurray JJ, Velazquez E, Califf R, Pfeffer MA, Solomon SD. Usefulness of right ventricular fractional area change to predict death, heart failure, and stroke following myocardial infarction (from the VALIANT ECHO Study). *Am J Cardiol* 2008; 101: 607-612.

American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics – 2012 Update. Dallas, TX: American Heart Association; 2012.

Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Afzal HY, Keltai M, Diaz R, Rangarajan S, Yusuf S. Risk factors for myocardial infarction in woman and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J* 2008; 29: 932–940.

Anavekar NS, Skali H, Bourgoun M, Ghali JK, Kober L, et al. (2008) Usefulness of right ventricular fractional area change to predict death, heart failure, and stroke following myocardial infarction (from the VALIANT ECHO Study). *Am J Cardiol* 101: 607-612.

Angeli JK, Cruz Pereira CA, Faria Tde O, Stefanon I, Padilha AS, Vassallo DV. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 838-848.

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

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

Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. II. Tissue morphometry. *Am J Physiol* 1985; 248: H883-H889.

Anversa P, Sonnenblick EH. Ischemic cardiomyopathy: pathophysiologic mechanisms. *Prog Cardiovasc Dis* 1990; 33: 49-70.

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

Bax JJ, Marwick TH, Molhoek SG, Bleeker GB, van Erven L, Boersma E, Steendijk P, van der Wall EE, Schalij MJ. Left ventricular dyssynchrony predicts benefit of cardiac resynchronization therapy in patients with end-stage heart failure before pacemaker implantation. *Am J Cardiol*. 2003; 92: 1238-1240.

Bauersachs J, Schäfer A. Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2: 115-124.

Bauersachs J, Widder JD. Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmac Rep* 2008; 60: 119-126.

Bautista LE, Stein JH, Morgan BJ, Stanton N, Young T, Nieto FJ. WMJ. Association of blood and hair mercury with blood pressure and vascular reactivity. 2009; 108: 250-252.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-c1437.

Bers DM, Eisner DA, Valvidia H.H. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> and heart failure: roles of diastolic leak and Ca<sup>2+</sup> transport. *Circ Res* 2003; 93: 487-490.

Bers DM, Harris SP. Translational medicine: to the rescue of the failing heart. *Nature* 2011; 473:36-39.

Bers DM. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. 2014; 76: 107-27.

Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Albuquerque D, Rodrigues Dde A, Mesquita ET, Vilas-Boas F, Cruz F, Ramires F, Villacorta H Jr, Souza Neto JD, Rossi Neto JM, Moura LZ, Beck-da-Silva L, Moreira LF, Rohde LE, Montera MW, Simões MV, Moreira Mda C, Clausell N, Bestetti R, Mourilhe-Rocha R, Mangini S, Rassi S, Ayub-Ferreira SM, Martins SM, Bordignon S, Issa VS. Updating of the Brazilian guideline for chronic heart failure - 2012. *Arq Bras Cardiol* 2012; 98: 1-33.

Braunwald E. Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 2013; 1:1-20.

Brunder, DG; Dettbarn, C; Palade, P. Heavy metal-induced Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum. *J Biomol Chem*. v. 263, p. 18785-18792, 1988.

Busse R, Fleming I, Hecker M. Control of nitric oxide and prostacyclin syntheses in endothelial cells. *Arzneimittelforschung*. 1994; 44: 392–396.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. *Circulation Research*. 2000; 87: 840-844

Cleland JGF, Torabi A, Khan NK. Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. *Heart* 2005; 91: 7-13.

Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnoletti L, Pepi P, Ceconi C et al.: Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28, 2241–2248.

Couchonnal LF, Anderson ME. The Role of Calmodulin Kinase II in Myocardial Physiology and Disease. *Physiology* 2008; 23: 151-159.

da Cunha, V; Souza, HP; Rossoni, LV; França, AS; VASSALLO, DV. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. *Archives of environmental contamination and toxicology*. v. 39(1), p. 124-130, 2000.

de Fatima Marinho de Souza M, Gawryszewski VP, Orduñez P, Sanhueza A, Espinal MA. Cardiovascular disease mortality in the Americas: current trends and disparities. *Heart*. 2012; 98:1207-1212.

de Groote P, Millaire A, Foucher-Hossein C, et al. Right ventricular ejection fraction is an independent predictor of survival in patients with moderate heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:948-954.

Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats*. *Cardiovasc Res*, 2002; 55: 329–340.

Drexler H, Hayoz D, Munzel T, Horning B, Just H, Brunner HR, Zelis R. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1992; 69: 1596-1601.

Di Salvo TG, Mathier M, Semigran MJ, Dec GW. Preserved right ventricular ejection fraction predicts exercise capacity and survival in advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:1143-1153.



Dórea, J.G.; Marquesm R.C.; Brandão, K.G. Neonate exposure to thimerosal mercury from hepatitis B vaccines. *Am J Perinatol* 2009; 26: 523-527.

Dórea JG. Low-dose mercury exposure in early life: relevance of thimerosal to fetuses, newborns and infants. *Curr Med Chem* 2013; 20: 4060-4069.

Dórea JG, Farina M, Rocha JB. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol* 2013; 33: 700-711.

Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 22-32.

Eto, K. Minamata disease. *Neuropathology* 2000; 20: 14-19.

Eto, K. Minamata disease: a neuropathological viewpoint. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 2006; 108: 10-23.

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

Faria Tde O, Baldo MP, Simões MR, Pereira RB, Mill JG, Vassallo DV, Stefanon I. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development. *Arch Med Res* 2010; 42: 274-280.

Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. 2010; 459: 923-939.

Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5: 338-349.

Förstemann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schawarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121–1131.

Förstemann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eu Heart J* 1993; 14: 10–15.

Frank KF, Bölk B, Erdmann E, Schwinger RHG. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovascular Res* 2003; 57: 20-27.

Freedman JE, Sauter R, Barttinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 1999; 84: 1416–1421.

Frolich JC, Förstermann U, Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Advanced Prostaglandin. Tromboxane and Leukotriene Research* 1989; 19: 211-215

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

Furieri, LB; Fioresi, M; Junior, RF; Bartolomé, MV; 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. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011a; 255: 193-199.

Furieri LB, Galán M, Avendaño MS, García-Redondo AB, Aguado A, Martínez, S; Cachofeiro, V; Bartolomé, MV; Alonso, MJ; Vassallo, DV; Salaices, M. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of

mercury is dependent on reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* 2011b; 162: 1819-1831.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic, guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774–1777.

Giuberti K, Pereira RB, Bianchi PR, Paigel AS, Vassallo DV, Stefanon I. Influence of Ovariectomy in the Right Ventricular Contractility in Heart Failure Rats. *Arch Med Res* 2007; 38: 170-175.

Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997; 18: 3264-3265.

Groote P, Millaire A, Foucher-Hossein C, Nogue O, Marchandise X, Ducloux G, Labanche JM. Right Ventricular Ejection Fraction Is an Independent Predictor of Survival in Patients With Moderate Heart Failure. *FACC JACC* 1998; 32: 948-54.

Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 26: 854-857.

Guallar E, Sanz-Gallardo MI, van't Veer P, Bode P, Aro A, et al. Heavy Metals and Myocardial Infarction Study Group. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002; 347: 1747-1754.

Gutierrez, LL; Mazzotti, NG; Araújo, AS; Klipel, RB; Fernandes, TR; Llesuy, SF; Belló-Klein, A. Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. *Braz J Medical Biol Res* 2006; 39, 767-772.

Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 1987; 61: 70-76.

Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 2005;115: 509-517.

Hacon, SS; Rochedo, ERR; Campos, RC; Lacerda, LD. Mercury exposure through fish consumption in the urban area of Alta Floresta in the Amazon Basin. *J Geocheml Explor* 1997; 58: 209-216.

Hacon, S; Yokoo, E; Valente, J; Campos, RC; da Silva, VA; de Menezes, AC; de Moraes, LP; Ignoti, E. Exposure to mercury in pregnant women from Alta Floresta-Amazon basin, Brazil. *Environ Res* 2000; 84. 204-210.

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

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

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. *Environ Res* 2008; 107: 69-78.

Harrinson DG, Gongora MC. Oxidative stress and hyperension. *The Medical Clinicals of North America*. 2009; 93: 621-635.

Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C: Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*, 2006, 259, 351–363.

Houser SR., Piacentino III V, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1595-1607.

Houston, MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med* 2007; 13: 128-133.

Houston MC. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2011; 13: 621-627.

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

Jasmin JF, Calderone A, Leung TK, Villeneuve L, Dupuis J. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 621-631.

Jasmin JF, Mercier I, Hnasko R, Cheung MWC, Tanowitz HB, Dupuis J, Lisanti MP. Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 747-755.

Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. Method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 1954; 140: 675-682.

Katz SD, Biasucci L, Sabba C, Strom JA, Jondeau G, Galvao M, Solomon S, Nikolic SD, Forman R, Lejemtel TH. Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 918-925.

Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, Hudaihed A, Yasskiy A. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005; 111: 310-314.

Kesteloot H, Sans S, Kromhout D. Evolution of all-causes and cardiovascular mortality in the age-group 75-84 years in Europe during the period 1970-1996; a comparison with worldwide changes. *Eur Heart J* 2002; 23: 384-398.

Kerr S, Brosnan J, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: Role of endothelium. *Hypertension* 1999; 33: 1353-1358.

Kim YW, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. 2014; 123: 625-631.

Klosinska M, Rudzinski T, Grzelak P, Stefanczyk L, Drozd J, Krzeminska-Pakula M. Endothelium-dependent and -independent vasodilation is more attenuated in ischaemic than in non-ischaemic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 765-770.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric Oxide: An endogenous modulator of leucocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655.

Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, Yusuf S, for the INTERHEART Investigators in Latin America. Risk factors for acute myocardial

infarction in Latin America. The INTERHEART Latin American Study. *Circulation* 2007; 115: 1067-1074.

Lederer WJ, Bers DM, Eisner DA. Calcium signaling in heart: multiscale, diverse, rapid, local, and remarkable. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 58: 3-4.

Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 1999; 276: H1943–H1950.

Lemos NB, Angeli JK, Faria Tde O, Ribeiro Junior RF, Vassallo DV, Padilha AS, Stefanon I. Low mercury concentration produces vasoconstriction, decreases nitric oxide bioavailability and increases oxidative stress in rat conductance artery. *PLoS One* 2012; 7: e49005.

Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*, 2002; 7:132–147.

Marques R, Mendes M, Leite MG, Barbosa EC. Custos da cadeia de procedimentos no tratamento do infarto agudo do miocárdio aos hospitais brasileiros de excelências e especializada *Rev Assoc Med Bras* 2012; 58: 104-11.

McKelvey W, Gwynn RC, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, et al. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1435-1441

Mill JG, Stefanon I, Leite CM; Vassalo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 748–753.

Mill JG, Novaes MA, Galon M, Nogueira JB, Vassallo DV. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 387-394.

Mill JG, Stefanon I, dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 890-898.

Ministério da Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil 2011-2012. Brasília; 2011.

Ministério da Saúde, Secretaria Executiva. DATASUS. Informações de saúde. Morbidade e informações epidemiológicas. Disponível em: [www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203](http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203).

Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2012; 110: 87-94.

Mondal MS, Mitra S The inhibition of bovine xanthine oxidase activity by Hg<sup>2+</sup> and other metal ions. *J Inorg Biochem*. 1996; 62: 271-279.

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

Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*. 1977; 11: 323-44.



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

Mozaffarian D, Shi P, Morris JS, Spiegelman D, Grandjean P, et al. (2011) Mercury exposure and risk of cardiovascular disease in two U.S. cohorts. *N Engl J Med* 364: 1116-1125.

Najafi F, Jamrozik K, Dobson AJ. Understanding the 'epidemic of heart failure': a systematic review of trends in determinants of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 5: 472–479.

Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*, 1995; 15;92(4):748-55.

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

Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998; 98: 149-156.

Orchard C, Brette F. T-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 237-244.

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

Palmer RM e Moncada S. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol* 1991; 15: 16–19.

Park SK, Lee S, Basu N, Franzblau A. Associations of blood and urinary mercury with hypertension in U.S. adults: the NHANES 2003-2006. *Environ Res* 2013; 123: 25-32.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503- 512.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72 (2): 406–412.

Piegas LS, Feitosa G, Mattos LA, Nicolau JC, Rossi Neto JM, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93: e179-e264.

Polak JF, Holman BL, Wynne J, Colucci WS. Right ventricular ejection fraction: an indicator of increased mortality in patients with congestive heart failure associated with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1983; 2:217-224.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12:87–88.

Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013; 9:1057-1069.

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

Resende MM, Kauser K, Mill JG. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Sci* 2006; 78: 3066–3073.

Rey FE e Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2002; 22: 1962-1971.

Rizzetti DA, Torres JG, Escobar AG, Peçanha FM, Santos FW, Puntel RL, Alonso MJ, Briones AM, Salaiques M, Vassallo DV, Wiggers GA. Apocynin prevents vascular effects caused by chronic exposure to low concentrations of mercury. *Plos One*. 2013; 8:e55806.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 1986; 250: 815-821

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

Sartório CL, Pinto VD, Cutini GJS, Vassallo DV, Stefanon I. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on the rat tail vascular bed reactivity three days after myocardium infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 321-326.

Sartório CL, Fraccarollo D, Galuppo P, Leutke M, Ertl G, Stefanon I, Bauersachs J. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension* 2007; 50: 919–925.

Sena CM, Pereira AM, Seíça R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 2216-2231.

Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, Tasc P, Ertla G, Bauersachs J. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovascular Research*, 2003; 58: 655–662.

Shechter M, Matetzky S, Arad M, Feinberg MS, Freimark D. Vascular endothelial function predicts mortality risk in patients with advanced ischaemic chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.*, 2009, 11:588-93.

Sikkel MB, Hayward C, MacLeod KT, Harding SE, Lyon AR. SERCA2a gene therapy in heart failure: an anti-arrhythmic positive inotrope. *Br J Pharmacol* 2014;171: 38-54.

Skeegs LT, The existence of two forms of hyperensin. *J Exp Med*1954; 100: 363.

Stefanon I, Auxiliadora-Martins M, Vassallo DV, Mill JG. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 2667-2679

Stefanon I, Cade JR, Fernandes AA, Ribeiro Junior RF, Targueta GP, Mill JG, Vassallo DV. Ventricular performance and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. *Braz J Med Biol Res* 2009 ;42 : 902-911.

Stefanon I, Valero-Muñoz M, Fernandes AA, Ribeiro RF Jr, Rodríguez C, Miana M, Martínez-González J, Spalenza JS, Lahera V, Vassallo PF, Cachofeiro V. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. *PLoS One* 2013; 8:e64986.

Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys.*

*J* 1992; 62: 497-517.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species and Hypertension: A complex association. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008; 10: 1041-1044.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 196:193-222.

Vassallo DV, Simões MR, Furieri LB, Fioresi M, Fiorim J, et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 939-946.

Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2008; 118: 2057–2062.

Velazquez EJ, Francis GS, Armstrong PW, Aylward PE, Diaz R, O'Connor CM, White HD, Henis M, Rittenhouse LM, Kilaru R, van Gilst W, Ertl G, Maggioni AP, Spac J, Weaver WD, Rouleau JL, McMurray JJV, Pfeffer MA, Califf RM. An international perspective on heart failure and left ventricular systolic dysfunction complicating myocardial infarction: the VALIANT registry. *Eur Heart J* 2004; 25: 1911-1919.

Xiao J, She Q, Wang Y, Luo K, Yin Y, et al. Effect of allopurinol on cardiomyocyte apoptosis in rats after myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 20-27.

Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Murnford RA, Swiderek KM, Lee TD, Dining A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225–228.

Walker LA, Buttrick PM. The right ventricle: biologic insights and response to disease updated. *Curr Cardiol Rev* 2013; 9: 73-81.

Weseler, AR; Bast A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatment. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12: 154-161.

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

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

Yanagisawa M, Kurihara S, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature* 1988; 322: 411-415.

Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M (2005) Altered intracellular  $Ca^{2+}$  handling in heart failure. *J Clin Invest* 115: 556-564.

Zornoff LA, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: Concepts and Clinical Implications. *Arq Bras Cardiol* 2009; 92: 150-164.

Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93:434-440.

**ANEXO**

---



# Chronic Exposure to Low Doses of HgCl<sub>2</sub> Avoids Calcium Handling Impairment in the Right Ventricle after Myocardial Infarction in Rats

Thais de Oliveira Faria<sup>1</sup>, Gustavo Pinto Costa<sup>1</sup>, Camila Cruz Pereira Almenara<sup>1</sup>, Jhuli Keli Angeli<sup>1</sup>, Dalton Valentim Vassallo<sup>1,2</sup>, Ivanita Stefanon<sup>1</sup>, Paula Frizera Vassallo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil, <sup>2</sup> Escola de Ensino Superior da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, IMSCAV, Vitória, Brasil

## Abstract

Right ventricle systolic dysfunction is a major risk factor for death and heart failure after myocardial infarction (MI). Heavy metal exposure has been associated with the development of several cardiovascular diseases, such as MI. The aim of this study was to investigate whether chronic exposure to low doses of mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>) enhances the functional deterioration of right ventricle strips after MI. Male Wistar rats were divided into four groups: Control (vehicle); HgCl<sub>2</sub> (exposure during 4 weeks—1st dose 4.6 µg/kg, subsequent dose 0.07 µg/kg/day, i.m. to cover daily loss); MI surgery induced and HgCl<sub>2</sub>-MI groups. One week after MI, the morphological and hemodynamic measurements and isometric tension of right ventricle strips were investigated. The chronic HgCl<sub>2</sub> exposure did not worsen the injury compared with MI alone in the morphological or hemodynamic parameters evaluated. At basal conditions, despite similar maximum isometric force at L-max, relaxation time was increased in the MI group but unaffected in the HgCl<sub>2</sub>-MI compared to the Control group. Impairment of the sarcoplasmic reticulum (SR) function and reduction in the sarcolemmal calcium influx were observed in MI group associated with SERCA2a reduction and increased PLB protein expression. Induction of MI in chronic HgCl<sub>2</sub> exposed rats did not cause any alteration in the developed force at L-max, lusitropic function or -dF/dt except for a tendency of a reduction SR function. These findings could be partially explained by the normalization in the sarcolemmal calcium influx and the increase in NCX protein expression observed only in this group. These results suggest that chronic exposure to low doses of HgCl<sub>2</sub> prevents the impaired SR function and the reduced sarcolemmal calcium influx observed in MI likely by acting on NCX, PLB and SERCA2a protein expression.

**Citation:** Faria TO, Costa GP, Almenara CCP, Angeli JK, Vassallo DV, et al. (2014) Chronic Exposure to Low Doses of HgCl<sub>2</sub> Avoids Calcium Handling Impairment in the Right Ventricle after Myocardial Infarction in Rats. PLoS ONE 9(4): e95639. doi:10.1371/journal.pone.0095639

**Editor:** Michael Sater, Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), GERMANY

**Received:** January 20, 2014; **Accepted:** March 27, 2014; **Published:** April 10, 2014

**Copyright:** © 2014 Faria et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by grants from No. 5465435/2011-FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo), No. 4051/935/2009-PRONEX - FAPES/CONIC (FAPES/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* [Email: paularvassallo@ufes.br](mailto:paularvassallo@ufes.br)

## Introduction

Myocardial Infarction (MI) is currently the leading cause of morbidity and mortality worldwide, costing the public health system millions every year [1]. The common causes of MI include hypertension [2], atherosclerosis [3], diabetes [4] and a sedentary lifestyle [5].

It is well known that chronic MI can lead to heart failure (HF) [6,7]. Indeed, after a few hours post-MI, the ischemic process in the myocardium begins to cause deleterious effects on the contractile function of the heart [8]. In addition, in isolated heart models, acute MI impaired both the force development and the contractile index [9]. Furthermore, left myocardial dysfunction is associated with an impairment in calcium handling, suggested by a reduction in SERCA and PLB proteins and a decrease in sodium/calcium exchange (NCX) activity [10,11]. Importantly, right ventricle dysfunction has been considered as an independent predictor of mortality and also predicts the development of HF in patients with left ventricle dysfunction [12]. Therefore, it is very important to study the alterations in right ventricular function

after acute left ventricle MI to elucidate the mechanisms involved in this process.

Currently, heavy metal exposure has also been associated with the development of cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension, coronary artery disease and MI [13,14,15,16]. Additionally, acute mercury intoxication can produce pulmonary hypertension [17] and impaired vascular-pulmonary function in rats [18,19]. Moreover, chronic low doses of mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>) also have an deleterious effect on coronary artery function by producing an increasing resistance to blood flow that might cause contraction and relaxation impairment under vascular overload conditions [20]. In the isolated, perfused heart, chronic exposure to mercury induces alterations in calcium handling mechanisms, such as a reduction in NCX and SERCA expression and the induction of negative inotropic effect [21].

Furthermore, there was an association between the amount of mercury in hair and the risk of MI in humans [22]. Although there is a possibility that MI could occur in individuals exposed to HgCl<sub>2</sub>, the underlying mechanisms involved in MI and low doses of