

**Efeitos da Exposição Crônica a Diferentes
Concentrações de Cloreto de Mercúrio em Vasos de
Condutância e Resistência**

Bruna Fernandes Azevedo

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

**Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Março de 2016**

Efeitos da exposição crônica a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio em vasos de condutância e resistência

Bruna Fernandes Azevedo

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

Aprovada em 03 /03/2016 por:

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Orientador - UFES

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira – UFES

Prof^a. Dr^o. Fausto Edmundo Lima Pereira - UFES

NDI Prof. Dr^a. Maylla Ronacher Simões - UFES

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli - UFES

Coordenadora do PPGCF:

Prof. Dra. Alessandra Simão Padilha

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Março 2016

Azevedo, Bruna Fernandes, 1983.

Efeitos da exposição crônica a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio em vasos de condutância e resistência. [Vitória] 2016.

106p, 29,7 cm (UFES, D. SC, Ciências Fisiológicas, 2016)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Cloreto de Mercúrio 2. Efeito cardiovascular 3. Leitos vasculares

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

I INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio	25
1.1.1 História do Mercúrio	25
1.1.2 Características do metal	26
1.1.3 Formas de exposição do mercúrio	27
1.1.4 Transporte e eliminação do mercúrio	28
1.1.5 Efeitos do mercúrio sobre órgãos	28
1.1.6 Efeitos do mercúrio sobre o Sistema Cardiovascular	29
1.2 Tônus vascular e sua regulação	31
1.2.1 Óxido Nítrico	32
1.2.2 Via da Ciclooxigenase (COX)	33
1.2.3 Sistema Renina-Angiotensina	35
1.2.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	36

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais	39
3.2 Medidas de pressão arterial e peso corporal	40

3.3 Estudos das propriedades mecânicas de artérias aortas e mesentéricas de resistência	40
3.3.1 Metodologia empregada para obtenção dos anéis isolados de aorta torácica	40
3.3.1.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular	42
3.3.1.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio	43
3.3.2 Estudo da reatividade vascular em artérias mesentérica	43
3.3.2.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular	45
3.3.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio	45
3.3.3 Protocolos experimentais – reatividade vascular	46
3.3.3.1 Efeitos da baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a resposta constritora à fenilefrina em artérias aorta e mesentérica de ratos	46
3.3.3.2 Efeito do tratamento de baixa (15nM) e alta exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artéria aorta e mesentérica.	46
3.3.3.3 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento baixas (15nM) e altas (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a resposta à fenilefrina de aorta e mesentérica	47
3.3.3.4 Influência do tratamento com baixa (15nM) e alta exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio na via do óxido nítrico	48
3.3.3.5 Envolvimento de radicais livres no tratamento com baixa e (15nM) alta exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica e mesentérica	48
3.3.3.6 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre o tratamento com baixa (15nM) e alta exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica e mesentérica	49
3.3.3.7 Envolvimento dos sistema renina-angiotensina-	49

adosterona sobre o tratamento com baixa (15nM) e alta exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica e mesentérica	
3.4 Estudo da expressão de proteínas pelo método de western blot	49
3.4.1 Western Blot para detecção de COX-2 e GP91Phox, e-NOS, e-NOS fosforilada em artéria aorta	49
3.5 Expressão dos resultados e análise estatística	52
3.6 Fármacos, reagentes e anticorpos	53
IV RESULTADOS	
4.1 Peso corpóreo	55
4.2 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica	55
4.3 Experimentos com Artérias Aorta e Artéria Mesentérica	56
4.3.1 Efeito do tratamento com baixa (15nM) e alta exposição (60nM) ao mercúrio sobre a resposta vascular de anéis de aorta e artéria mesentérica de resistência ao Cloreto de Potássio (KCl)	56
4.3.2 Efeito do tratamento com baixa (15nM) e alta exposição (60nM) ao mercúrio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas	57
4.3.2.1 Resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta	57
4.3.2.2 Resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria Mesentéricas	58
4.3.3 Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao mercúrio	59
4.3.3.1 Modulação endotelial da resposta vasoconstritora à	59

fenilefrina de segmentos de artéria aorta	
4.3.3.2 Modulação endotelial da resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artérias mesentéricas	60
4.3.4 Participação do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao mercúrio	61
4.3.4.1 Participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta	62
4.3.4.2 Participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artéria mesentérica	63
4.3.5 Participação de espécies reativas de oxigênio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao mercúrio	66
4.3.5.1 Participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta	65
4.3.5.2 Participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria mesentéricas	66
4.3.6 Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-cicloxygenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao mercúrio	67
4.3.6.1 Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-cicloxygenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta	67
4.3.6.2 Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-cicloxygenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria mesentérica de resistência	69
4.3.7 Participação do sistema renina angiotensina sobre a	70

resposta contrátil a fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao mercúrio	
4.3.7.1 Participação do sistema renina angiotensina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta	70
4.3.7.2 Participação do sistema renina angiotensina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria mesentérica	71
V DISCUSSÃO	
5.1 Efeitos da alta e baixa exposição ao cloreto de mercúrio sobre o peso corporal	75
5.2 Efeitos da alta e baixa exposição ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial sistólica	76
5.3 Efeitos da alta e baixa exposição ao cloreto de mercúrio em artérias aorta e mesentérica	77
5.3.1 Efeitos da baixa e alta exposição ao cloreto de mercúrio em artérias aorta e mesentérica sobre a resposta vascular à fenilefrina e o papel do endotélio	78
5.3.2 Participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta e mesentérica	82
5.3.3 Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta e mesentérica	84
5.3.5 Participação do sistema renina angiotensina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta.	85
5.4 Sumarização dos resultados	87
VI CONCLUSÕES	88

ANEXOS

1 – Artigo Submetido à revista Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology: Chronic mercury exposure at different concentrations produces opposed vascular responses in rat aorta.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Valores do peso corporal (g) dos animais dos grupos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio	55
Tabela 2: Valores de pD_2 e resposta máxima ($R_{máx}$, % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) com ou sem endotélio na condição controle e após incubação com L-NAME, Apocinina, Indometacina, Losartan e Enalapril.	73
Tabela 3: Valores de pD_2 e resposta máxima ($R_{máx}$, % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) com ou sem endotélio na condição controle e após incubação com L-NAME, Apocinina, Indometacina e Losartan.	74

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Valores da Pressão Arterial Sistólica (PAS) obtidos por meio da pletismografia de cauda em ratos durante 30 dias de tratamento dos grupos controle, Baixa Exposição (15nM), Alta Exposição (60nM). O número de animais usados está indicado entre parênteses e os resultados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA (duas vias) seguidos por pós-teste de Bonferroni, $P < 0,05$.

56

Figura 2: Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em artérias aorta de ratos dos grupos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) foi utilizado o Teste- t não pareado. $*P < 0,05$.

57

Figura 3: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) foi utilizado o Teste- t não pareado. $*P < 0,05$.

58

Figura 4: Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) (Figura A,B,C). Em D, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em artérias aorta com e sem endotélio dos grupos experimentais. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) foi utilizado o Teste- t não pareado. $*P < 0,05$.

60

Figura 5: Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina, em artérias mesentéricas de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) (Figura A,B,C). Em D, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em artérias mesentéricas com e sem endotélio dos grupos experimentais. Os resultados (média \pm

61

erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima (R_{máx}) foi utilizado o Teste-*t* não pareado. *P<0,05.

Figura 6: Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle (A), Baixa Exposição (15nM) (B) e Alta exposição (60nM) (C). Em D diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em artérias aorta dos grupos experimentais. Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. * P < 0,05

62

Figura 7: Efeito da baixa exposição (15nM) ao mercúrio sobre expressão proteica e-NOS e a relação e-NOS/e-NOS fosforilada. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão e-NOS, a relação e-NOS/e-NOS fosforilada e da α-actina. Os resultados (média ± EPM), para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. *P<0,05.

63

Figura 8: Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle (A), Baixa Exposição (15nM) (B) e Alta Exposição (60nM) (C). Em D, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em artérias mesentérica dos grupos experimentais. Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. * P < 0,05

64

Figura 9: Efeito da inibição da NADPH oxidase com apocinina (30 µM), sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle (A), Alta Exposição (60nM) (B) e Baixa Exposição (15nM) (C). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. * P < 0,05

65

Figura 10: Efeito da alta exposição (60nM) sobre expressão proteica da subunidade gp91 phox da NADPH oxidase. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da gp91phox e da α-actina. Os resultados (média ± EPM). Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. *P<0,05.

66

Figura 11: Efeito da inibição da NADPH oxidase com apocinina (30 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle,

67

Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. * P < 0,05

Figura 12: Efeito do bloqueio da via ácido araquidônico-ciclooxigenase com indometacina (INDO, 1 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. * P < 0,05

68

Figura 13: Efeito da Alta Exposição (60nM) sobre expressão proteica da COX-2. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da COX-2 e da α-actina. Os resultados (média ± EPM). Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. *P<0,05.

69

Figura 14: Efeito do bloqueio da via ácido araquidônico-ciclooxigenase com indometacina (INDO, 1 µM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle (A), Baixa Exposição (15nM) (B) e Alta Exposição (60nM) (C). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. * P < 0,05

70

Figura 15: Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) pela incubação com Enalapril (10 mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Efeito do bloqueio do receptor AT₁ pela incubação com o antagonista Losartan (10 mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. * P < 0,05.

71

Figura 16: Efeito do bloqueio do receptor AT₁ pela incubação com o antagonista Losartan (10 mM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. * P < 0,05.

72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura I: Aorta torácica, de rato Wistar, imersa em solução fria de Krebs-Henseleit, após a remoção do tecido conectivo e adiposo, sendo dividida em segmentos de 4 mm (modificado de Fiorim, 2011).	41
Figura II: Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular <i>in vitro</i> (adaptado de Faria, 2014).	42
Figura III: Registro com curvas representativas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. Teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl. A) Período de estabilização inicial (45 min com força basal de 1,5 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) 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) Contração com fenilefrina 1 µM; J) Contração induzida pela fenilefrina; K) Adição de acetilcolina 10 µM. O tempo foi registrado em minutos, representado no eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força registrada em gramas (g), observada no eixo vertical. (adaptado de Dias, 2011).	43
Figura IV: Esquema representativo do miógrafo de arame, onde foram realizado os experimentos de reatividade vascular. (Simões, 2015).	45
Figura V Esquema geral representativo de protocolo experimental realizado em experimentos de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos wistar. ACh= acetilcolina. (Simões, 2015).	46
Figura VI: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de 30 minutos, realizou-se a curva concentração-resposta à FE (0,1 nM a 100 µM) (Angeli, 2009).	48

Figura VII: Sumariação esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. O tratamento i.m. com cloreto de mercúrio aumentou a reatividade vascular no Grupo Alta Exposição (60nM), reduziu a biodisponibilidade de NO, aumentou a atividade da NAPH oxidase, COX e do SRA em artéria aorta e mesentérica, já o grupo Baixa Exposição (15nM) teve aumento da biodisponibilidade de NO na artéria aorta, porém não teve alteração significativa em artérias mesentéricas de resistência.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem

(CH₃CH₃Hg⁺) - Dimetilmercúrio

(CH₃Hg⁺) - Metilmercúrio

(E-) - Endotélio removido mecanicamente

(E+) - Endotélio íntegro

(Hg (CNO)₂) - Fulminato de mercúrio

(Hg⁺) - Mercúrio mercurioso

(Hg⁺⁺) - Mercúrio mercúrio

(Hg⁰) - Mercúrio elementar metálico

(Hg₂Cl₂) - Cloreto mercurioso

(HgCl₂) - Cloreto de mercúrio

(HgS) - Sulfeto de mercúrio

(i.p.) - Intraperitoneal

°C – Graus celsius

µg - Micrograma

µM - Micromolar

ACh - Acetilcolina

Ang II – Angiotensina II

AT₁ - Receptores da angiotensina tipo I

AT₂ - Receptores da angiotensina tipo II

ATP – Trifosfato de adenosina

AAC - Áreas Abaixo da Curva

BH₄ – Tetrahydrobiopterina

BK_{Ca} - Canais para K⁺ de larga condutância

Ca²⁺ - Íons cálcio

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

cm - Centímetros

CMLVs - Células musculares lisas vasculares

CO₂ - Dióxido de carbono

COX - Ciclooxygenase

COX -1 - Ciclooxygenase-1

COX-1 - Isoforma da ciclooxygenase tipo 1

COX-2 - Ciclooxygenase-2

COX-2 - Isoforma da ciclooxygenase tipo 2

dAAC - Diferença da área abaixo da curva

DP - Receptor Prostaglandina D

E₄ - Receptor de prostaglandina

ECA - Enzima conversora de angiotensina

ECA II - Enzima conversora de angiotensina II

ECAI - Enzima conversora de angiotensina II

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS - Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase

EP₁ - Receptor de prostaglandina E₁

EP₂ - Receptor de prostaglandina E₂

EP₃ - Receptor de prostaglandina E₃

EPM - Erro Padrão da Média

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

FE - Fenilefrina

FMN - Flavina mononucleotídeo

FP - Receptor de prostaglandina F

GCs - guanilato ciclase solúvel

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

GPx - Glutadiona peroxidase

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂S - Sulfeto de Hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

HOCl⁻ - Ácido hipocloroso

i.m - Intramuscular

IK_{Ca} - Canais para K⁺ de intermediária condutância

iNOS - isoforma o induzível da óxido nítrico sintase.

IP - Receptor de prostaglandina I

K_{ATP} - Canais para K⁺ sensíveis ao ATP

KCl - Cloreto de potássio

kDa - kilodalton

PA - Pressão Arterial

PAS - Pressão Arterial Sistólica

kg - Kilograma

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico

K_{ir} - Canais para K⁺ retificador

K_v - Canais para K⁺ voltagem dependentes

L-NAME - Inibidor não-seletivo da NOS, o N-nitro-L-arginina metil éster

M - Molar

MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

mg - Miligrama

MgSO₄ - Sulfeto de magnésio

mL - Mililitro

MLCK - Cadeia leve da miosina

MLV - Músculo liso vascular

mm - Milímetro

mM - Milimolar

mmHg - Milímetros de mercúrio

mN - Milinilton

NaCl - Cloreto de sódio

NaF - Flureto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NaVO₃ - Metavanadato de sódio

ng - Nanograma

NKA - Bomba sódio-potássio ATPase

nM - Nanomolar

nNOS - isoforma neural da óxido nítrico sintase.

NO - Óxido Nítrico

NOS - Oxido nítrico sintase

O₂ - Oxigênio

O₂^{•-} - Ânion superóxido

NADPH - Adenina dinucleotídeo fosfato

OH- - Radicais hidroxila

ONOO- - Peróxido de nitrito

pD₂ - Sensibilidade

peNOS - Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada

PG - Prostaglandinas

PGD₂ - Prostaglandina D₂

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PGF₂ - Prostaglandina F₂

PGI₂ - Prostaglandina I₂

pH – Potencial de hidrogênio

PKC - Proteína quinase C

PKG - Proteína quinase G

PLB - Fosfolambam

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

R_{máx} - Resposta máxima

SDS - Dodecil Sulfato de sódio

SERCA - Retículo sarcoplasmático

-SH - Radical sulfidril

SK_{Ca} - Canais para K⁺ de baixa condutância intracelular

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

SOD-Cu/Zn; SOD1 - Superóxido dismutase cobre/zinco

SOD-EC; SOD3 - Superóxido dismutase extracelular

SOD-Mn; SOD2 - Superóxido dismutase mitocondrial

TP - Receptor de tromboxano A₂

TXA₂ - Tromboxano A₂

TXA₂ - Tromboxano A₂

RESUMO

Exposição crônica ao cloreto de mercúrio durante 30 dias, aumenta a reatividade vascular, reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), aumenta o estresse oxidativo e a produção prostanoídes vasoconstritores. No entanto, até o presente momento, não se sabe quais alterações vasculares ocorrem diante de diferentes níveis de exposição ao mercúrio em diferentes leitos vasculares. Assim, resolvemos avaliar os efeitos de alta (60nM) e baixa (15nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a reatividade vascular após 30 dias de tratamento, em artérias aorta e mesentéricas. Para isto, utilizamos ratos Wistar, machos, de três meses de idade, que receberam por 30 dias injeções intramusculares de HgCl₂ com metade e o dobro da dose utilizada para obter 29nM de cloreto de mercúrio no sangue. Esses animais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo Controle (salina), Grupo Baixa Exposição (1ª dose: 2,17 µg / kg, as doses subsequentes: 0,03 µg / kg / dia de HgCl₂) e Grupo Alta Exposição (1ª dose: 10,86 µg / kg seguido de 0,14 µg / kg / dia de HgCl₂). O Grupo Baixa Exposição (15nM) teve uma redução da resposta contrátil à fenilefrina (1 nM-100 uM), enquanto o Grupo Alta Exposição (60nM) apresentou aumento da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta isolados. Já em artéria mesentérica de resistência, a baixa exposição (15nM) não modificou a reatividade enquanto a alta exposição aumentou a reatividade à fenilefrina. Em aorta, o Grupo Baixa Exposição (15nM), apresentou sua redução da reatividade revertida pela retirada do endotélio ou inibição do óxido nítrico sintase realizada com incubação de L-NAME (100µM). Não houve alteração da reatividade após incubação com indometacina (10 µM), losartan (10 µM), enalapril (1 µM), ou apocinina (30 µM). Encontramos também maior expressão peNOS / eNOS na aorta. Por outro lado, em artérias mesentéricas de resistência, no Grupo Alta Exposição (60nM), a retirada do endotélio produziu o aumento da resposta contrátil à fenilefrina, enquanto L-NAME não teve nenhum efeito sobre essa resposta. Indometacina, losartan, enalapril, apocinina reduziram significativamente a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta e indometacina, losartan e apocinina em artéria mesentérica. Além disso, as expressões da subunidade gp91phox da NADPH oxidase e a

ciclooxigenase-2 foram aumentadas quando comparadas aos controles em aorta. Os nossos resultados indicam que o cloreto de mercúrio realiza diferentes alterações na função vascular do rato. Assim, o estresse oxidativo, desencadeado no Grupo Alta Exposição (60nM), pode ativar uma cascata inflamatória, que por sua vez, pode ativar o sistema renina angiotensina. Pela primeira vez, nós trouxemos evidências de que, mesmo em baixos níveis de exposição, o mercúrio produz efeitos tóxicos.

Palavras-chaves: cloreto de mercúrio, reatividade vascular, função endotelial, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Mercury chloride exposure for 30 days attaining blood concentration of 29nM is reported to decrease vascular nitric oxide (NO) bioavailability and to increase oxidative stress and constrictor prostanoids production. However, it is still unresolved which vascular changes occur during different levels of mercury exposure in different vascular bed. We then investigated possible concentration-dependent effect of this metal on the vascular reactivity. Three-month-old male Wistar rats received for 30 days intramuscular injections of HgCl₂ with half and double dose of that used to obtain 29nM in blood, whose were respectively named as low (1st dose: 2.17 mg/kg, subsequent doses: 0.03 mg/kg/day) and high exposures (1st dose: 10.86 mg/kg followed by 0.14 mg/kg/day). Saline was used as control. Low (15nM) and high (60nM) exposures reduced and increased, respectively, the contractile response to phenylephrine (1 nM-100µM) of isolated aortic rings. In mesenteric ring the low exposure (15nM) not modify the reactivity and high exposure (60nM) increases reactivity. In aortic the low exposure (15nM) group, this hyporesponsiveness was blunted by endothelium denudation or NO synthase inhibition with L-NAME (100µM) without changes after incubation with indomethacin (10 µM), losartan (10mM), enalapril (1 µM), or apocynin (30 µM). We also found increased phosphorylated eNOS/eNOS expression ratio in aorta. On the other hand, in the high exposure (60nM) group, endothelium denudation produced a small increase of the contractile response to phenylephrine while L-NAME had no effects on the hyperreactivity to phenylephrine. Indomethacin, losartan, enalapril, or apocynin significantly reduced the vasoconstrictor response to phenylephrine in aortic and mesenteric ring. In addition, expressions of the NADPH oxidase subunit gp91phox and cyclooxygenase-2 were increased when compared to controls in aortic. Taking together, our results indicate that mercury chloride differently changes the vascular function in the rat. Thus, high exposure (60nM) to HgCl₂ in mesenteric and aortic increase oxidative stress that might activate an inflammatory cascade, and in turn, may be activating the renin-angiotensin-aldosterone system. In addition, and for the first time, we evidence that, even at low levels of exposure in aortic, mercury produces adverse effects and as an

attempt of adaptive mechanism, NO bioavailability is increased to protect vessels against mercury toxic effects.

Keywords: Mercuric chloride, vascular reactivity, endothelial function, oxidative stress, heavy metal.

I INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio

1.1.1 História do Mercúrio

Registros pré-históricos datados de 2500 a.C já demonstravam a utilização do cinábrio (sulfeto de mercúrio), devido a sua coloração vermelho-dourada, nos desenhos das paredes das cavernas e em pinturas faciais de homens pré históricos. Posteriormente, o mercúrio passou a ser utilizado na amalgamação (queima direta de mercúrio metálico ligado ao cascalho, promovendo a separação do ouro), em fotografia e como antisséptico no tratamento da sífilis. (Hylander & Meili, 2003; Clarkson et al., 2007, Ekino et al., 2007).

As alterações resultantes da exposição ao mercúrio ganharam grande evidência na sociedade científica após os acidentes ambientais ocorridos no Japão e Iraque. Na década de 50, no Japão ocorreu um grave acidente decorrente da deposição de dejetos industriais com quantidade expressiva de mercúrio na Baía de Minamata. Esse mercúrio foi então ingerido através do consumo de peixes, desencadeando assim, sinais e sintomas como ataxia, deterioração da fala, constrição do campo visual, alterações sensoriais, surdez, cegueira, tremores, movimentos involuntários, deficiência mental, coma e morte. Recém-nascidos, cujas mães foram contaminadas pelo metal desenvolveram retardo mental, neuropatia periférica, paralisia cerebral e cegueira. Essas alterações ficaram conhecidas como Doença de Minamata ou Síndrome de Hunter-Russell (Gochfeld, 2003,Takeuchi et al., 1996).

Já no Iraque, a intoxicação do mercúrio ocorreu em 1971, quando grãos de trigo foram tratados com fungicidas contendo mercúrio orgânico. Essa intoxicação matou mais de 500 pessoas que ingeriram pão-produzido com o trigo contaminado. (Bakir et al., 1973, Takeuchi et al., 1996,Clarkson et al., 1993).

No Brasil, especialmente na região Amazônica e em Minas Gerais, há relatos de intoxicação por mercúrio através da utilização de métodos primitivos e perigosos na extração do ouro. Assim, através da amalgamação, grande

quantidade de vapor de mercúrio é eliminada e imediatamente inalada pelo garimpeiro e contaminando também o meio ambiente, deixando o solo amazônico muito rico em mercúrio (Pestana & Formoso, 2003, Passos & Mergler, 2008).

1.1.2 Características do mercúrio

O mercúrio tem como característica ser líquido e altamente maleável quando se encontra em condições normais de temperatura e pressão (Azevedo, 2003). Seu nome é derivado do latim, *hydrargyrum*, que significa prata líquida, metal ao qual se assemelha (HSDB, 2004). O mercúrio é classificado em três principais grupos: mercúrio elementar, mercúrio orgânico e inorgânico. Sendo os compostos inorgânicos também chamados de sais de mercúrio, oriundos da junção do mercúrio com o cloro, enxofre ou oxigênio. Já os compostos de mercúrio orgânicos são também chamados de organometálicos, originados da ligação covalente entre o mercúrio e o carbono (HSDB, 2004).

O mercúrio elementar metálico (Hg^0), em sua forma líquida, é pouco absorvido e representa pequeno risco à saúde. Contudo, se o mesmo estiver sob a forma de vapor de mercúrio, é rapidamente absorvido através dos pulmões, podendo levar a danos no organismo (Clarkson et al., 2007; Houston, 2007, ATSDR, 1999). Esse mercúrio, por possuir expansão volumétrica uniforme, alta tensão superficial e não possuir aderência às superfícies vítreas é utilizado em esfigmomanômetro e termômetros.

Por possuir baixa resistência elétrica e alta condutividade térmica, o mercúrio metálico é empregado em material eletro-eletrônico. Devido ao seu alto poder de oxidação, o mercúrio metálico é usado em operações eletroquímicas como na indústria de cloro e soda. Devido à facilidade de formação de amálgamas com outros metais, também é utilizado na indústria metalúrgica, na odontologia e no garimpo (Micaroni et al., 2000).

O mercúrio inorgânico pode ser encontrado em diferentes estados quando combinados com outros elementos químicos, dentre eles se destacam o cloreto de mercúrio (HgCl_2), que é altamente tóxico e corrosivo; o cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2); o sulfeto de mercúrio (HgS), que possui coloração

vermelha e devido a isso é utilizado como pigmento de tintas e o fulminato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{CNO})_2$) utilizado como detonador em explosivos (HSDB, 2004, Azevedo, 2003; ATSDR, 1999).

Já a forma orgânica do mercúrio é derivada a partir da biotransformação do mercúrio inorgânico como o íon mercúrico em metilmercúrio (CH_3Hg^+) e dimetilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_3\text{Hg}^+$) (Johnson, 2004). Alguns destes compostos também chamados de organometálicos foram usados como pesticidas e antissépticos. (WHO, 1990).

1.1.3 Formas de exposição do mercúrio

O mercúrio é considerado, hoje, um poluente ambiental de alto risco à saúde pública devido a sua elevada toxicidade e mobilidade nos ecossistemas (Davis et al., 1994; Alexandre, 2006). Sua exposição pode ocorrer através de fontes naturais e artificiais derivadas de atividades humanas. Como fontes artificiais destacam-se as queimas de combustíveis fósseis, indústrias de cloro-álcali, mineração, queima de lixo e uso do carvão e petróleo (Davidson et al., 2006; Lindberg et al., 2007; WHO, 1990).

As fontes naturais têm como principais emissores os desgastes de material geológicos, atividades vulcânicas, terremotos, erosão e também a volatilização do mercúrio presente no ambiente marítimo e na vegetação (WHO, 1990; Boening, 2000; EPA, 1997). O mercúrio emitido tanto de forma natural como decorrente de atividade humana encontra-se na forma inorgânica, principalmente como vapor metálico (Hg^0) (Hansen & Danscher, 1997).

Dentre todas as fontes naturais de emissão de mercúrio, as mais importantes são as provenientes da desgaseificação da crosta terrestre. Devido à erosão e aos ciclos geoquímicos, estima-se que mais de 5 toneladas de mercúrio são lançadas ao mar todos os anos. Com isso, a crosta terrestre torna-se uma importante fonte de contaminação dos meios aquáticos. (Nascimento & Chasin, 2001).

O ciclo do mercúrio no meio ambiente compreende a emissão, a circulação atmosférica através de seus vapores e a precipitação que ocorre com as chuvas, o que faz com que o mercúrio retorne às terras e às águas (Boening, 2000). A emissão do mercúrio constitui parte importante do ciclo deste metal na natureza e pode ocorrer de forma natural, por meio de

processos naturais ou por resultado de atividades humanas como citado acima (EPA, 1997).

1.1.4 Transporte e eliminação do mercúrio

Por possuir uma característica lipossolúvel, o mercúrio é altamente difusível, passando pelas membranas celulares, barreira hemato-encefálica e placentária até chegar aos órgãos alvo. Quando na corrente sanguínea, o metal sofre rápida oxidação nas hemácias e nos tecidos por meio da catalase e peroxidase transformando-se em mercúrio inorgânico (Hg^{++}) e mercúrio mercurioso (Hg^+) o que limita sua absorção (Asano et al., 2000; Clarkson et al., 2007). O mercúrio inorgânico tem baixa lipofilidade e com isso pouca capacidade de ultrapassar as membranas celulares (Clarkson et al., 2007).

O mercúrio oxidado une-se fortemente ao grupamento $-\text{SH}$ e como consequência, inativa enzimas por sua toxicidade, o que pode levar à lesão tecidual, além de interferir em vários processos metabólicos (Malmstrem et al., 1992; Asano et al., 2000; Gilman et al., 2007).

O metilmercúrio ingerido é quase que completamente absorvido e transportado pela corrente sanguínea (WHO, 1990). É através dela, que em cerca de seis dias, as pessoas expostas podem alcançar concentrações tóxicas no sistema nervoso central (Berlin, 1986). O metilmercúrio entra na célula em grande parte pela formação de um complexo com a L-cisteína e a homocisteína, sendo eliminado conjugado com a glutatona (Ballatori & Clarkson, 1985).

Após ser absorvido, o metal é distribuído primariamente para o sistema nervoso central e rins. Sua eliminação se dá, geralmente, pela urina e fezes (Brodkin et al., 2007).

1.1.5 Efeitos do mercúrio sobre órgãos

Diversos estudos descritos na literatura mostram as alterações decorrentes do efeito do mercúrio no sistema nervoso central (SNC). Dentre as ações do mercúrio inorgânico destacam-se: irritabilidade, fadiga, mudanças comportamentais, tremores, cefaléia, perda auditiva e cognitiva, disartria, incoordenação motora, alucinações e óbito. Estudos prévios descrevem que a exposição ao metilmercúrio na mulher grávida e na primeira infância leva a

situações como alterações no desenvolvimento do SNC do feto ou da criança (Graeme & Pollack, 1998; Nascimento & Chasin, 2001, Passos & Mergler 2008).

O mercúrio também exerce efeitos sobre os pulmões, sistema imunológico, renal e reprodutor. Além disso, a exposição ao metal possivelmente está relacionada ao aumento da incidência de câncer (Gómez et al., 2007; Zalups 2000, Martinez et.al. 2014).

O mercúrio é uma substância nefrotóxica que induz a falência renal e causa necrose tubular, principalmente dos túbulos proximais (Clarkson, 1997; Zalups, 2000) sendo as lesões renais dose-dependentes (Houser et al., 1992; Bohets et al., 1995; Burton et al., 1995).

1.1.6 Efeitos do mercúrio sobre o Sistema Cardiovascular

Durante décadas, os efeitos tóxicos do mercúrio foram associados, principalmente, ao sistema nervoso central. Todavia, este metal também produz efeitos deletérios no sistema cardiovascular (Hussain et al. 1997, Su & Chen 1979).

A cardiotoxicidade do mercúrio está amplamente descrita na literatura científica através de estudos que correlacionaram a exposição ao mercúrio com risco aumentado de hipertensão arterial, infarto do miocárdio e disfunção coronária (Rhee & Choi 1989, Guallar et al. 2002, Houston, 2007). Salonen et al. (1995) acompanharam pacientes por cerca de seis anos e encontraram uma associação entre concentrações elevadas de mercúrio em cabelos dos participantes, com um maior risco de desenvolver eventos cardiovasculares e morte.

O mecanismo através do qual o mercúrio tem efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular não está completamente elucidado, mas acredita-se que o aumento do estresse oxidativo esteja envolvido. A exposição ao metal aumenta a produção de radicais livres, e isto pode ser devido à participação de mercúrio na reação de Fenton (Valko et al., 2006) e também na redução da atividade das enzimas antioxidantes, tais como glutathione peroxidase. (Houser et al. 1992, Farina et al. 2011).

Vale ressaltar que a elevada afinidade do mercúrio com o grupo tiol pode levar à diminuição da glutathione peroxidase e da atividade de outras enzimas antioxidantes como a catalase e superóxido-dismutase. A redução dos

mecanismos antioxidante aumenta a ocorrência de peroxidação lipídica e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Magos & Clarkson 2006, Valko et al. 2006, Ganther 1980).

Alterações cardiovasculares resultantes de envenenamento com mercúrio são descritas em modelos animais, mas o mecanismo implicado nos efeitos deste metal sobre o sistema cardiovascular ainda não são totalmente compreendidos, e torna viável a possibilidade de que estes efeitos sejam dependentes da dose e do tempo de exposição.

Rossoni et al. (1999) estudaram os efeitos hemodinâmicos de uma injeção intravenosa de HgCl_2 (5mg/kg) em ratos e observaram que o mercúrio produziu alterações cardíacas e hipertensão pulmonar. Além disso, Machado et al., 2007 relatou que a exposição aguda a 680ng/kg de HgCl_2 aumentou a pressão arterial, frequência cardíaca e a reatividade vascular à fenilefrina em ratos, este aumento da reatividade parece depender de uma maior produção de radicais livres. Corações de animais expostos agudamente ao HgCl_2 , colocados no aparelho de Langendorff, mostraram redução da pressão sistólica do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca e atraso na condução atrioventricular (Massaroni et al. 1992, Massaroni et al. 1995).

Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que exposição crônica a doses baixas (29nM) de mercúrio foi capaz de aumentar a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), sem alterar a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) e frequência cardíaca; aumentou também a atividade de ATPase da miosina, reduziu a atividade da Na^+/K^+ ATPase (NKA), expressão proteica da SERCA, do fosfolambam fosforilado, além de reduzir a expressão da proteína do trocador de sódio e cálcio (NCX) (Furieri et al. 2011b).

Outros trabalhos que utilizaram o mesmo modelo de exposição crônica à baixa concentração de mercúrio também foram capazes de induzir disfunção endotelial em vasos de resistência e condutância, provavelmente devido à diminuição da biodisponibilidade de NO e ao aumento da produção de O_2^- via NADPH oxidase (Furieri et al. 2011a, Wiggers et al. 2008a). Além disso, pesquisas utilizando as mesmas concentrações de Wiggers et al. 2008a também encontraram dados capazes de reforçar a associação do mercúrio com a disfunção endotelial em artérias aorta, septais, coronárias e

mesentéricas. Sendo as principais evidências dessa disfunção à diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzida por acetilcolina (ACh) (Furieri et al. 2011a); o aumento das respostas vasoconstritoras à fenilefrina ou serotonina (Furieri et al. 2011a, Lemos et al. 2012, Peçanha et al. 2010, Wiggers et al. 2011a), o aumento da produção de ânion superóxido, além do aumento dos níveis plasmáticos malondialdeído, das expressões da NOX-1, NOX-4 (duas principais isoformas NADPH oxidase) SOD-1 e SOD -2 (Furieri et al. 2011a, Aguado et al. 2013).

Os trabalhos descritos acima mostram que o tratamento crônico com cloreto de mercúrio tem um efeito deletério importante sobre a função vascular. Estes efeitos deletérios podem ser comparados aos produzidos por fatores de risco cardiovasculares tradicionais, tais como diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia. Portanto, o mercúrio pode ser considerado um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares.

Pelo acima exposto, fica evidente que a intoxicação pelo mercúrio acomete diversos sistemas do nosso organismo. O presente trabalho, no entanto, foca sua atenção nas repercussões no sistema cardiovascular. Para melhor situarmos nosso objeto de estudo, faremos a seguir uma breve revisão tônus vascular e sua regulação.

1.2 Tônus vascular e sua regulação

O tônus vascular influencia diretamente no controle da pressão arterial, uma vez que a contração do coração gera um fluxo sanguíneo das artérias de grande calibre e baixa resistência para arteríolas de pequeno calibre e alta resistência. Esse controle só é possível porque as artérias são compostas basicamente por três camadas estruturais: A camada de células mais interna, também chamada de túnica íntima, é composta por células endoteliais, membrana basal contendo tecido conjuntivo, células subendoteliais e esporádicas células musculares lisas vasculares (CMLVs). A camada média, também chamada de túnica média, composta de um arranjo de células musculares lisas embebidas em matriz extracelular rica em colágeno, elastina, fibrinas e proteoglicanos. Já a camada mais externa, também chamada de

túnica adventícia, rica em colágeno e elastina, além de pequenos vasos e terminações nervosas (Mellander et al. 1989, Hillebrands, et al., 2001).

O fluxo sanguíneo é dependente da contração do músculo liso vascular presente principalmente na túnica média das arteríolas, onde a elevação desses tônus reduz o diâmetro do vaso e conseqüentemente aumenta a resistência vascular (Bevan & Laher, 1991).

Quando o tônus vascular não está adequado ocorrem alterações circulatórias que levam à incapacidade de se manter o fluxo sanguíneo necessário para suprir as necessidades metabólicas. Por isso, devemos manter um equilíbrio entre as substâncias vasoativas circulantes e locais capazes de influenciar esse tônus. (Mellander, 1989; Feigl, 1989). Sendo assim, faremos uma breve revisão sobre essas substâncias vasoativas e os locais aonde as mesmas são produzidas.

O endotélio atua como barreira semipermeável entre o sangue e a musculatura lisa vascular (Ross, 1995). Exerce função parácrina no controle das estruturas e função dos vasos, e por isso influencia diretamente a homeostase. O endotélio atua na modulação e regulação de várias funções fisiológicas, tais como: inflamação, agregação plaquetária, fibrinólise, angiogênese e mecanorecepção (Jaffe, 1985; Vane et al., 1990; Ramos, 1992). Além disso, o mesmo mantém o equilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstrictores que atuam no vaso regulando o tônus vascular, também exerce efeito sobre a inibição, promoção da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (Félétou, 2009).

O músculo liso vascular (MLV) por sua vez é o principal responsável pelo controle da resistência periférica total. Por isso, é de suma importância à regulação do seu tônus, e esta é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais. A modificação do tônus da musculatura lisa vascular pode se dá por modificações estruturais ou do balanço de fatores vasodilatadores e vasoconstrictores produzidos, principalmente pelo endotélio vascular (Deussen et al., 2006).

1.2.1 Óxido Nítrico

Desde 1980, já se sabia através dos estudos de Furchgott e Zawadzki que o endotélio liberava um fator capaz de relaxar a musculatura lisa vascular, sem saber que fator era esse, os mesmos foram chamados de EDHF. Em 1984, Furchgott e Zawadzki demonstraram que o EDHF era um gás que se difunde facilmente pelas membranas celulares promovendo vasodilatação (Moncada et al., 1991; Heller et al., 1999). Posteriormente, esse fator foi identificado como sendo óxido nítrico (Myers et al. 1989, Ignarro et al. 1987). Hoje, dentre os componentes vasodilatadores do endotélio, o NO é um dos mais importantes participantes, sendo um componente fundamental na manutenção da homeostase dos vasos, incluindo a modulação do tônus vascular através do seu potente efeito vasodilatador.

A produção do óxido nítrico depende de vários fatores, sendo um deles a presença de uma enzima dimérica que contém grupamentos que necessitam de oxigênio, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavinamononucleotídeo) e BH4 (tetrahidrobiopterina) (Stuehr et al., 1991; Hevel et al., 1991; Michel & Vanhoutte., 2010).

Existem três isoformas da NO sintase: duas constitutivas, presentes em células endoteliais (eNOS) e em células neuronais (nNOS), que têm sua ativação dependente do complexo cálcio-calmodulina, e a iNOS, que não está presente constitutivamente, mas que pode ser induzida por estímulos imunológicos, por ser expressa em macrófagos e células endoteliais. (Forstermann et al., 1994).

Os mecanismos capazes de ativar a eNOS são: um aumento na concentração intracelular de íons cálcio (Ca^{2+}) induzido por agonistas como a acetilcolina, catecolaminas, ATP, substância P, Ang II, estímulos físicos, como a força de cisalhamento (*shear stress*) ou por mecanismos dependentes da tirosina quinase (Palmer et al. 1988, Mayer & Andrew 1998). Após ativação dessa enzima, a eNOS catalisa a oxidação da L-arginina, e com isso, biossíntese do óxido nítrico, o NO vascular produzido se difunde na musculatura vascular, ativa guanilato ciclase solúvel (GCs), promove aumento da concentração intracelular de GMPc (3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, e

assim, promovendo o relaxamento vascular. Ao mesmo tempo, a PKG via canais para K^+ dependentes de Ca^{2+} e voltagem, hiperpolariza a membrana plasmática promovendo relaxamento. Além de ativar os canais para K^+ dependentes de Ca^{2+} a PKG realiza a fosforilação do fosfolambam (PLB), e quando fosforilado o fosfolambam deixa de inibir a SERCA, aumentando a recaptação de cálcio promovendo relaxamento vascular.

A PKG também promove a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLCK) diminuindo sua sensibilidade ao Ca^{2+} levando ao relaxamento vascular (Marín & Rodríguez-Martinez, 1995; Lincoln et al., 2001). O NO também pode reagir com radicais livres derivados do oxigênio, especialmente os ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), perder sua atividade vasodilatadora e ainda produzir substâncias citotóxicas, como o peróxido nitrito ($ONOO^-$) e radicais hidroxila (OH^-) (Padmaja & Huie, 1993; Stoclet et al., 1999). Contribuindo com os mecanismos fisiopatológicos relacionados à hipertensão (Kerr et al., 1999; Chatterjee & Catravas, 2008).

1.2.2 Via da Ciclooxygenase (COX)

A via da COX envolve prostanóides vasoconstrictores e vasodilatadores que estão diretamente relacionados ao controle do tônus e da reatividade vascular (Davidge, 2001; Adeagbo et al., 2005; Alvarez et al., 2005). A ciclooxigenase se apresenta através de duas isoformas, denominadas ciclooxigenase-1 (COX -1) e 2 (COX-2).

A COX-1 é uma isoforma constitutiva, expressa em muitos tecidos, sintetiza prostaglandinas que tem como função a manutenção das funções fisiológicas (Smith et al., 1996).

A isoforma induzida, também chamada de COX-2 é uma isoforma ativada por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores miogênicos e endotoxinas. Sua expressão está relacionada principalmente aos processos inflamatórios (Wu, 1995, Antman et al., 2005; Félétou, 2010).

A função da COX é converter o ácido araquidônico em prostaglandina H_2 , que por ação de sintases específicas, é convertida em prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina I_2 (PGI_2), prostaglandina F_2 (PGF_2), prostaglandina D_2 (PGD_2) ou TXA_2 (Mardini & FitzGerald, 2001).

Após sua síntese, os prostanóides são liberados e irão se acoplar aos receptores de proteínas G, tais como EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, IP, FP, DP e TP, para exercer seus efeitos sobre o leito vascular. Dentre esses, existem os receptores EP₂, EP₄, IP e DP, que quando ativados pelos prostanóides, estimulam a adenilato ciclase, promovendo aumento do AMPc e com isso o relaxamento do músculo liso vascular. Por outro lado, os receptores EP₁, EP₃, FP e TP quando ativados promovem a contração do músculo liso vascular por distintos mecanismos (Funk, 2001; Wright et al., 2001). O receptor TP (do TXA₂) também pode ser estimulado pelos prostanóides PGE₂, PGI₂ e PGF₂ (Williams et al., 1994).

1.2.3 Sistema Renina-Angiotensina

Outro sistema muito importante no controle do homeostase é o sistema renina angiotensina (Geisterferet al., 1988; Metha & Griendling, 2007). O substrato do sistema renina angiotensina é o angiotensinogênio. O fígado libera o angiotensinogênio na circulação e por ação da renina, assim, o mesmo é clivado em um decapeptídeo chamado angiotensina I. A angiotensina I sofre a ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA I), que é expressa principalmente nas células endoteliais do pulmão, e é transformado em angiotensina II um octapeptídeo. A angiotensina II atua diretamente sobre receptores específicos localizados nas células do músculo liso vascular ou atua através da liberação de aldosterona pela estimulação do córtex supra-renal (Deschepper et al. 1994, Quinn & Williams, 1988; Hackenthal et al., 1990; Deschepper, 1994; Hall, 2003; Persson et al., 2004).

Além da ECA I, foi identificada posteriormente outra enzima participante deste sistema, uma carboxipeptidase, denominada enzima conversora da angiotensina II (ECA II). Essa cliva tanto a angiotensina I como a angiotensina II em um metabólito chamado angiotensina 1-7 que tem propriedades vasodilatadoras, ou seja, as duas ECA atuam no controle dos níveis de angiotensina II (Crackower et al., 2002; Danilczyk & Penninger, 2006).

A Angiotensina II, após se ligar ao receptor AT₁, ativa proteínas G. A angiotensina II também atua na geração de espécies reativas de oxigênio por

meio da ativação da NADPH oxidase. Além disso, ativa a PKC e a MAPK que estão implicadas na hipertrofia e no crescimento celular (Suzuki et al., 2005).

Além de tudo já descrito, a angiotensina II também estimula a liberação de prostaglandinas em células do músculo liso através da ativação da fosfolipase A₂ (Freeman et al., 1998), regulando a produção de prostanóides e a expressão da COX-2 em células do músculo liso vascular (Ohnaka et al., 2000; Hu et al., 2002, Alvarez et al., 2007, Beltrán et al., 2009).

1.2. 4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são oriundas do oxigênio, que podem tanto retirar elétrons, doar elétrons ou reagir com outras moléculas. Estas partículas possuem uma instabilidade muito grande, com isso uma grande capacidade reativa. (Griendling & Ushio-Fukai, 2000; Harrison & Gongora, 2009).

As EROs tem um papel essencial na sinalização e na regulação celular, sinalizando por exemplo mudanças de transcrição gênica e síntese de proteínas (Touyz & Schiffrin, 2000). A principal fonte geradora de EROs são as mitocôndrias (Cai & Harrinson, 2000). A mitocôndrias precisam estar com sua produção de EROs e sua eliminação em equilíbrio, pois um desequilíbrio desse sistema altera a parede vascular através do estresse oxidativo (Griendling, et al., 2000, Griendling, et al. 2003).

Dentre a EROs mais importantes para a regulação do tônus vascular, temos o ânion superóxido (O_2^-), formado pela redução univalente do oxigênio (Taniyama & Griendling, 2003; Touyz & Schiffrin, 2004; Harrison & Gongora, 2009). O O_2^- pode promover alterações na função vascular agindo diretamente no vaso ou pode estimular a produção de outras espécies reativas, como quando ocorre sua reação com o NO, a qual leva à produção de substâncias citotóxicas como o peroxinitrito ($ONOO^-$) e radicais hidroxila (OH^*) (Miller et al., 1998; Beal, 2002; Griedling & FitzGerald, 2003; Taniyama & Griendling, 2003; Cai, 2005).

O O_2^- quando dismutado pela superóxido dismutase (SOD), produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual após ação da catalase e glutadiona peroxidase(GPx) é convertido em H_2O (Griedling & FitzGerald, 2003,

Taniyama & Griendling, 2003) . O H_2O_2 pode exercer as seguintes funções: atuar como segundo mensageiro, levando ao crescimento do músculo liso vascular, migração celular, apoptose e respostas inflamatórias, ser metabolizado pelas mieloperoxidases e formar o ácido hipocloroso ($HOCl$) ou reagir com metais de transição formando o radical hidroxila ($OH\cdot$). (Griendling & FitzGerald, 2003; Cai, 2005; Harrison & Gongora, 2009)

A principal fonte de EROs no endotélio até hoje descrita parece ser oriundas da NADPH oxidase. Estas enzimas são compostas pelo citocromo b558 com suas duas subunidades, uma maior denominada gp91phox e outra menor a cp22phox, além das subunidades citosólicas regulatórias p67phox, p40phox, p47phox e da proteína de baixo peso molecular rac-1 (Griendling, et al., 2000; Hamilton et al., 2002). A subunidades gp91phox fazem parte da família da NOX da NADPH, essa família é composta de NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX 5, DUOX1 e DUOX2. Sendo que a NOX 4 é mais expressa em células endoteliais (Koh et al., 2009). A subunidade p22phox é a principal na geração vascular de ânions superóxido (McIntyre et al., 1999). As EROs derivadas da NOX podem ser produzidos em resposta à Angiotensina II (Cai, 2005; Koh et al., 2009).

A atuação da NADPH oxidase nos vasos é regulada pelas citocinas, hormônios, forças mecânicas, angiotensina II, trombina, fator agregação plaquetária, fator crescimento tumoral (TNF- α) e pelos metabólitos do ácido araquidônico (Cai et al., 2000; Griendling et al., 2000).

Outras enzimas como a Xantina oxidase, que utilizam a xantina, hipoxantina ou NADH podem formar EROs. (Cai et al., 2000). A NOS e suas isoformas também podem atuar na formação EROs através do desacoplamento da mesma na ausência ou na redução do substrato L-arginina ou do co-fator BH_4 (McIntyre et al., 1999; Taniyama & Griendling, 2003).

Para tentare manter o equilíbrio entre a produção e degradação da EROs, nosso organismo produz enzimas antioxidantes vasculares, como a catalase, a glutathionaperoxidase (GPX), a tiorredoxinaredutase e as superóxido dismutases (SODs). A glutathiona peroxidase e a catalase atuam degradando o peróxido de hidrogênio. A catalase transforma a H_2O_2 em H_2O e O_2 . A glutathiona peroxidase transforma o H_2O_2 em água (Griendling et.al.,

2000). Já a superóxido dismutase (SOD) cataliza a reação do $O_2^{\cdot-}$ com um elétron e dois prótons formando o H_2O_2 . Essa última possui três isoformas, a SOD cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1), SOD mitocondrial (Mn SOD; SOD2) e a SOD extracelular (ECSOD; SOD3). A ECSOD é uma glicoproteína, produzida em fibroblastos e células gliais, sendo a isoforma mais encontrada em vasos (McIntyre et al., 1999).

Caso ocorra um aumento das EROs, muitas funções do endotélio e do músculo liso vascular são afetadas. No endotélio vascular, podemos ter diminuição da biodisponibilidade de NO, apoptose, aumento adesão de monócitos e angiogênese. No MLV, as alterações causadas por esses radicais livres são: crescimento celular, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e aumento do tônus muscular (Taniyama & Griendling, 2003). Todas estas características contribuem para a fisiopatologia da hipertensão arterial (Griendling et al., 1994; Kerr et al., 1999; Cruzado et al., 2005; Touyz & Schinfrin, 2004).

Buscando contribuir com um melhor entendimento das ações do mercúrio, desenvolvemos uma pesquisa que visa investigar os mecanismos pelos quais este metal exerce efeito sobre vasos de condutância e resistência, e observamos diferente comportamento dos vasos quando expostos a diferentes concentrações de mercúrio, além de demonstrarmos que em baixas concentrações o mercúrio já é capaz de alterar a função endotelial, fato este muito relevante como dado para estudo dos possíveis quadros clínicos resultantes da exposição dos pacientes a diferentes doses deste metal.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- 1- Administrar 15nM de cloreto de mercúrio durante 30 dias e estudar os seus efeitos na reatividade vascular após 30 dias de tratamento sobre artérias aorta e mesentéricas.
- 2- Administrar 60nM de cloreto de mercúrio durante 30 dias e estudar os seus efeitos na reatividade vascular após 30 dias de tratamento sobre artérias aorta e mesentéricas.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar, semanalmente, o peso corporal e a pressão arterial dos animais.
- 2- Avaliar, pela técnica de Mulvany, a reatividade vascular nas artérias mesentéricas dos animais tratados com diferentes concentrações de mercúrio.
- 3- Avaliar, através do aparato de anéis de aorta, a reatividade vascular nas artérias aorta dos animais tratados com diferentes concentrações de mercúrio.
- 4- Analisar, por medidas bioquímicas, o efeito do tratamento com mercúrio no incremento do estresse oxidativo, através da mensuração da expressão proteica da NADPH oxidase, ciclooxigenase (COX-2) e da relação peNOS/eNOS.

III MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais experimentais

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

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 019/12).

Para a realização dos protocolos de reatividade vascular, os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos: Controle, Alta Exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio e Baixa Exposição (15nM) ao cloreto de mercúrio. Os ratos do grupo Controle receberam injeções intramusculares (*i.m*) de solução salina NaCl - 0,9% por 30 dias. No grupo Alta Exposição (60nM), os ratos receberam, pelo mesmo período, injeções *i.m* de cloreto de mercúrio, com a finalidade de obter uma concentração plasmática final de cerca de 60 nM, sendo a primeira dose de 10,86 µg/kg e as doses subsequentes de 0,14 µg/kg/dia. No grupo Baixa Exposição (15nM), os ratos receberam, pelo mesmo período, injeções *i.m* de cloreto de mercúrio com a finalidade de obter uma concentração plasmática final de cerca de 15 nM, sendo a primeira dose de 2,17 µg/kg e as doses subsequentes de 0,035 µg/kg/dia.

Todo tratamento foi realizado com injeções intramusculares (*i.m.*) na face interna das patas traseiras de todos os grupos. Ao final do tratamento, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (Amental[®]) na dose de 50 mg/kg intraperitoneal, e, em seguida, eutanaziados e exanguinados. A aorta torácica e as mesentéricas de resistência foram cuidadosamente dissecadas e o tecido adiposo e conjuntivo foram removidos. A aorta foi dividida em segmentos cilíndricos de 4 mm

de comprimento e as mesentéricas em segmentos cilíndricos com 2 mm de comprimento.

3.2 Medida da pressão arterial e peso corporal

Ao decorrer do tratamento, os valores de pressão arterial e peso corporal foram verificados semanalmente. Os ratos foram pesados para avaliação do ganho ponderal e ajuste do tratamento.

A pressão arterial sistólica foi determinada, por pletismografia de cauda (IITC Life Science non-invasible blood pressure, versão 1.35) conforme descrito por Grizzo & Cordelline 2008, sendo essa uma maneira indireta de verificação da mesma. Para evitar erros de medida e análise os ratos foram submetidos a uma semana de ambientação, respeitando-se o período de aquecimento em estufa e número de medidas.

3.3 Estudo das propriedades mecânicas de artérias aortas e mesentéricas de resistência

3.3.1 Metodologia empregada para obtenção dos anéis isolados de aorta torácica

Após 30 dias de tratamento, a aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa, imediatamente, em uma placa de Petri, contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,17; NaHCO_3 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica (5% de CO_2 e 95% de O_2). Esta solução foi mantida com pH 7,4. Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento (Figura I).

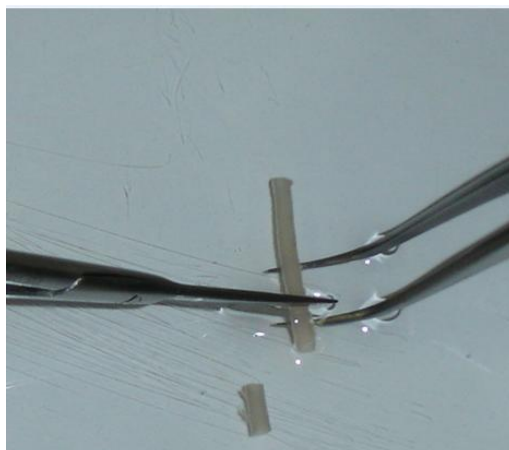


Figura I: Aorta torácica, de rato Wistar, imersa em solução fria de Krebs-Henseleit, após a remoção do tecido conectivo e adiposo, sendo dividida em segmentos de 4 mm (modificado de Fiorim, 2011).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos, ficando paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força, conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA) e este a um computador (Figura II). Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 grama, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização.

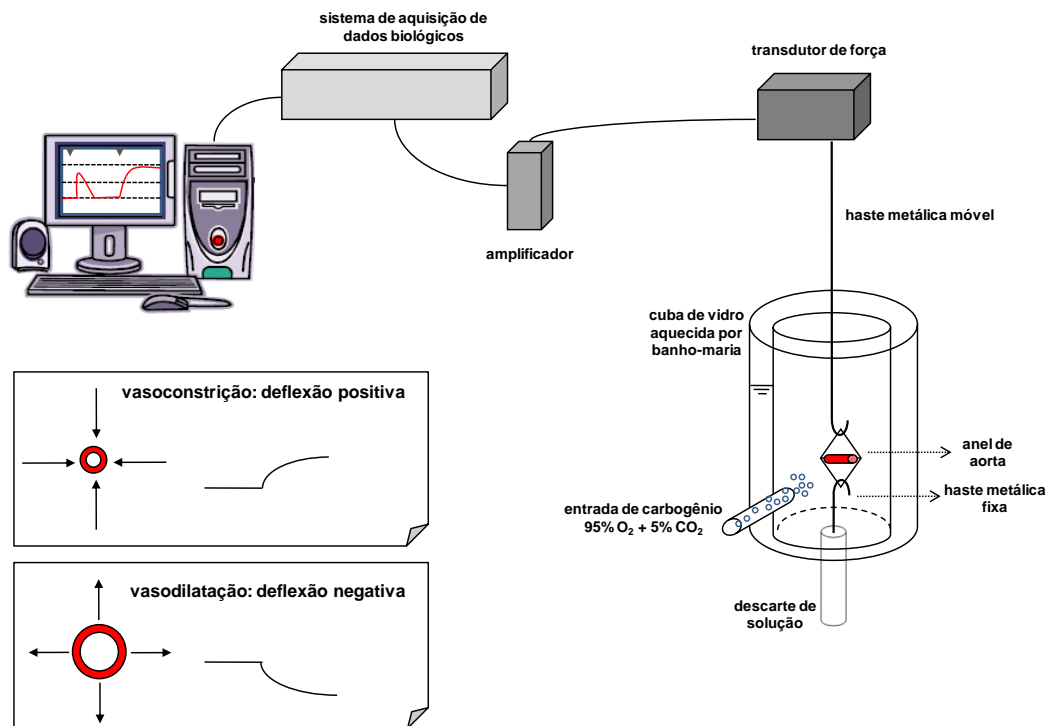


Figura II: Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro* (adaptado de Faria, 2014).

3.3.1.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular em aorta

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho solução de cloreto de potássio (KCl) 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular, induzida por despolarização (Figura III B, C). Após atingirem uma variação de 1 grama de força a partir do valor basal, estes anéis foram lavados, no mínimo, três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar à tensão de repouso. Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura III D), uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de aproximadamente 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura III E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (0,9 a 1,3 gramas) e, depois de 30 minutos (Figura III G, H), esses anéis foram submetidos à uma avaliação da integridade funcional do endotélio.

3.3.1.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio em aorta

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido por acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 1 μM . Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (10 μM) foi adicionada ao banho (Figura III I, J, L), logo, os anéis que relaxaram menos que 80% do platô foram descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10%.

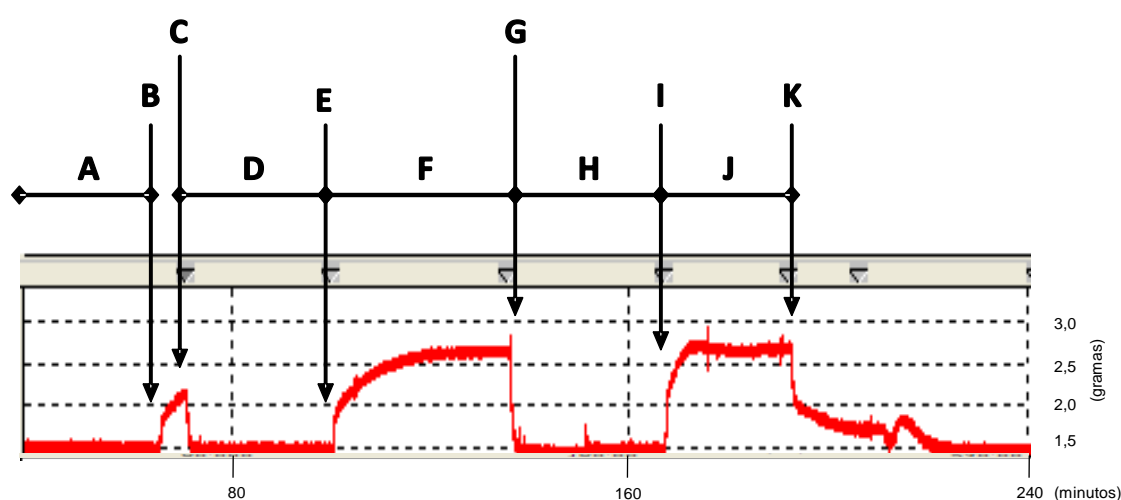


Figura III: Registro com curvas representativas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. Teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl. A) Período de estabilização inicial (45 min com força basal de 1,5 gramas); B) Adição de 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) 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) Contração com fenilefrina 1 μM ; J) Contração induzida pela fenilefrina; K) Adição de acetilcolina 10 μM . O tempo foi registrado em minutos, representado no eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força registrada em gramas (g), observada no eixo vertical (adaptado de Dias, 2011).

3.3.2 Estudo da reatividade vascular em artérias mesentérica

A análise da reatividade das artérias mesentéricas de ratos foi realizada de acordo com o método descrito por MULVANY & HALPERN (1977). O mesentériodos animais foram removidos e mantido em solução de Krebs-Henseleit (em mmol/L: 115

NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄.7H₂O, 2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 11,1 glicose e 0,01 EDTA) a 4°C e pH 7.4 durante o procedimento de dissecação. O terceiro ramo da artéria mesentérica foi isolado com o auxílio de um microscópio de dissecação e cortados em segmentos de aproximadamente 2 mm de longitude, mantidos a 4° C. Após preencher as câmaras do miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) com Krebs-Henseleit, dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias para medida de força isométrica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de força isométrica e o outro fio conectado a um micromanipulador que permitia o estiramento das artérias. Este miógrafo estava conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e a um computador (PC Pentium) (Figura IV).

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

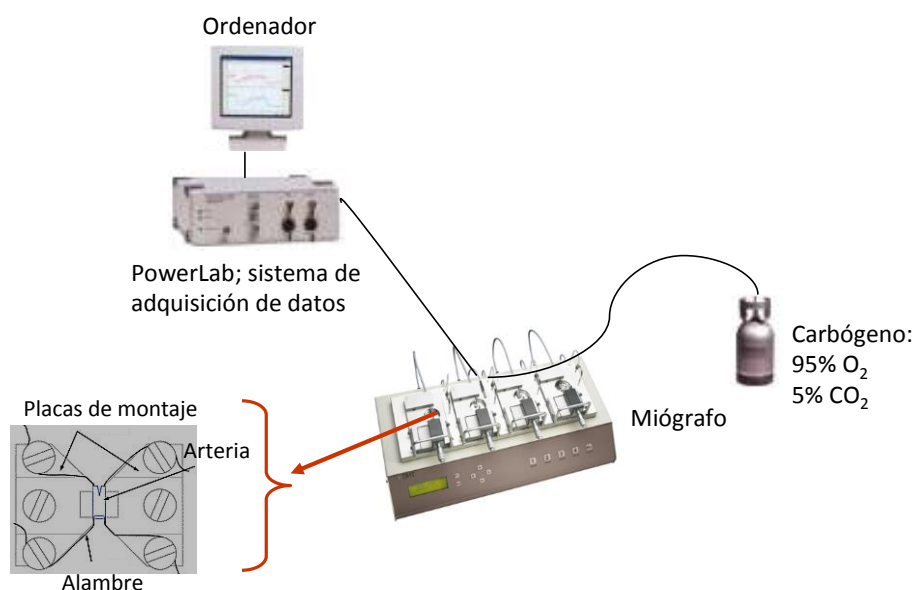


Figura IV: Esquema representativo do miógrafo de arame, onde foram realizados os experimentos de reatividade vascular. (Simões, 2015)

3.3.2.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular em artéria mesentérica de resistência

Após estabilização em sua tensão de estiramento ideal, os segmentos de artérias mesentéricas foram expostos a uma solução com concentração alta de potássio (120 mmol/L), a composição é similar ao Krebs-Henseleit, no entanto, o NaCl foi substituído por KCl em concentração equimolar para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos. A solução foi novamente trocada para solução de Krebs-Henseleit normal, e após o retorno à sua tensão basal, determinou-se a presença do endotélio.

3.3.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio em artéria mesentérica de resistência

Para comprovar a integridade endotelial, as artérias foram pré-contraindadas com uma concentração de fenilefrina (FE) (1 μ M), suficiente para produzir 50% da contração produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 120 mM, posteriormente, o relaxamento vascular foi obtido por exposição a 10 μ M de acetilcolina (ACh). Somente foram utilizadas nesse estudo as artérias com relaxamento superior a 80 % da contração induzida pela FE. Os anéis sem endotélio

relaxaram no máximo 10%. Os anéis foram lavados três vezes, em seguida, houve um período de estabilização de 30 minutos, mantendo a tensão basal (Figura V).

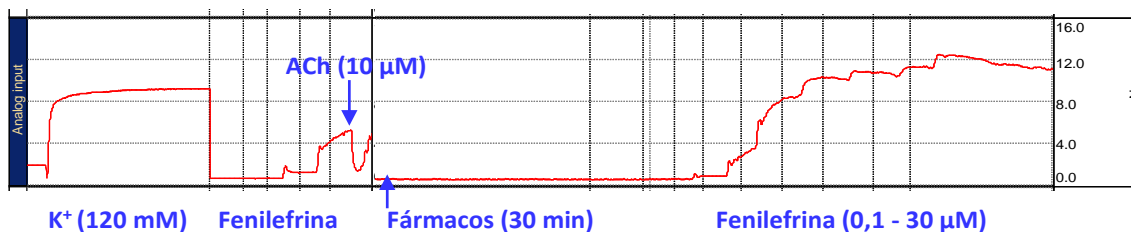


Figura V: Esquema geral representativo de protocolo experimental realizado em experimentos de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos wistar. *ACh*= acetilcolina. (Simões, 2015)

Os protocolos descritos a seguir foram realizados nos dois leitos vasculares: aorta e mesentérica.

3.3.3 Protocolos Experimentais – Reatividade Vascular

3.3.3.1 Efeitos da baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a resposta constritora à fenilefrina em artérias aorta e mesentérica de ratos

Após 30 minutos de estabilização, para investigar o efeito do tratamento com o baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina, na concentração de 0,1 nM a 100 µM em artéria aorta e em artéria mesentérica, de maneira cumulativa nos três grupos estudados (Figura VI). O efeito do mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina foi calculado como percentual de resposta ao KCl (75 mM, 120 mM), que foi considerada 100 % da resposta contrátil.

3.3.3.2 Efeito do tratamento de baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artéria aorta e mesentérica

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio, em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais, anéis de aorta e mesentéricas com endotélio íntegro (E^+) e sem endotélio (E^-). Em

aortas, as células endoteliais foram removidas mecanicamente, através do uso de fio polido e rígido de aço inoxidável antes da adaptação dos anéis de aorta ao aparato experimental. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados suavemente na parede interna do anel, ocasionando lesão do endotélio. Já em artérias mesentéricas, o endotélio foi removido após fricção com crina de cavalo. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10 μM induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina. Consideramos como anéis sem endotélio, quando os mesmos apresentavam relaxamento inferior a 10%, calculado em relação ao máximo de contracção à fenilefrina, como já descrito. Em seguida, a preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas de concentrações-resposta à fenilefrina, na concentração de 0,1 nM a 100 μM em artéria aorta e artéria mesentérica, de maneira cumulativa nos três grupos estudados.

3.3.3.3 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento baixas (15nM) e altas (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a resposta à fenilefrina de aorta e mesentérica

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da mesma forma. Com o propósito de avaliar a via pela qual o tratamento com baixas (15nM) e altas (60nM) doses de cloreto de mercúrio modifica a reatividade vascular, alguns fármacos foram utilizados. Após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado foi incubado também por 30 minutos, e logo após foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (Figura VI).

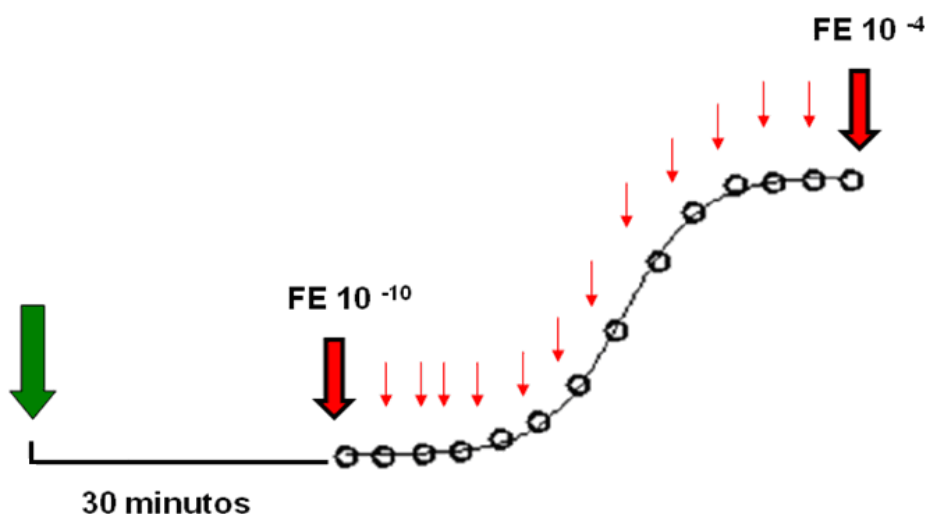


Figura VI: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de 30 minutos, realizou-se a curva concentração-resposta à FE (0,1 nM a 100 μ M) (Angeli, 2009).

3.3.3.4 Influência do tratamento com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio na via do óxido nítrico

Para avaliar se o tratamento com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio altera a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta e mesentérica foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M). Para estimar a biodisponibilidade de NO, foi calculada a diferença das áreas abaixo da curva de fenilefrina em ratos tratados ou não tratados com baixas e altas doses de cloreto de mercúrio, associada ao L-NAME (100 μ M) em relação à situação controle.

3.3.3.5 Envolvimento de radicais livres no tratamento com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica e mesentérica

Para verificar o envolvimento de EROs no efeito provocado pela baixa e alta exposição ao cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina, uma vez que a produção de espécies reativas altera a reatividade vascular, principalmente por reduzir a biodisponibilidade de NO, foram utilizados: a apocinina (Apo, 30 μ M), um

inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, uma das principais enzimas formadoras de radicais livres.

3.3.3.6 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre o tratamento com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica e mesentérica

Com o intuito de investigar a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, os anéis isolados de aorta e mesentéricas foram incubados com indometacina (10 μ M), um inibidor inespecífico da ciclooxigenase (COX).

3.3.3.7 Envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona sobre o tratamento com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio na resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica e mesentérica

Com a finalidade de investigar a participação dos sistema renina-angiotensina-aldosterona na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, os anéis isolados de aorta foram incubados com losartan (10 μ M), antagonista do receptor AT₁, e enalapril (1 μ M), inibidor da enzima conversora de angiotensina. Já as mesentéricas foram incubadas somente com losartan (10 μ M), antagonista do receptor AT₁.

3.4 Estudo da expressão de proteínas pelo método de “Western blot”

3.4.1 Western Blot para detecção de COX-2, gp91phox, e-NOS, e-NOS fosforilada em artéria aorta

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a expressão proteica em artéria aorta torácica. Foram medidas a expressão proteica da subunidade gp91phox da NADPH oxidase e a expressão proteica da ciclooxigenase-2 (COX-2), em aorta de ratos tratados com altas doses de cloreto de mercúrio. Já em ratos tratados com baixas doses de cloreto de mercúrio, foi realizada a expressão proteica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da óxido nítrico sintase endotelial fosforilada em resíduos de serina 1177 (peNOS)

Segmentos de aorta torácica foram utilizados como amostra para ambos os grupos. Os segmentos foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até o momento em que foram utilizados. A extração de proteínas foi precedida com a homogeneização das amostras, em temperatura de 4°C , com tampão de homogeneização contendo: Tris - HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO_3 (1 mM); SDS, 1%; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM, pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); inibidor de protease.

Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheir-Hinz, GmbH22331, Alemanha) a 4°C com 6.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, foi feita a quantificação das proteínas pelo método Lowry (Peterson, 1971). Determinou-se a densidade óptica medindo a absorbância em um espectrofotômetro multi-canal a $\lambda = 750 \text{ nm}$ (Cary, Varian). Para a quantificação, foi realizada uma diluição da amostra (1:25) em seguida, foram aliqüotados os volumes para uma carga de $50 \mu\text{g}$ de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT $39 \mu\text{M}$; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e Azul de bromofenol 0,5 %) e após centrifugação foram mantidas à temperatura de 95°C , durante 4 minutos.

As amostras foram aplicadas (carregadas) em gel SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida 40%, Tris HCl 1,5 M [pH = 8,8], SDS 10%, persulfato amônico (APS) 10% e Temed) previamente imersos em uma cuba contendo tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %), sendo submetidas à eletroforese, aplicando corrente constante de 80 V (PowerPacTM HC, BioRad, Singapura) durante aproximadamente 2 horas. Isto promoveu a separação das proteínas no gel.

Ao término da eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK) previamente ativada com água durante 20 segundos. Para tal transferência, foi realizado o método de transferência líquida, na qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche em suporte Holder Cassete e acoplados a uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% e Metanol 20%) a 8°C com corrente de 60 V por 2 horas.

Ao fim da transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 a 0,1 %, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, sob agitação constante, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários para a COX-2 (2,5 µg/mL anticorpo monoclonal; Cayman Chemical, Ann Arbor, Mi, USA), gp91phox (1:1000, anticorpo monoclonal; BD transduction laboratories, San Jose, CA, USA), Oxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (1:1000, anticorpo monoclonal; BD transduction laboratories, San Jose, CA, USA), Oxido nítrico sintase endotelial fosfotilada em resíduos de serina 1177 (peNOS) (1:1000, anticorpo monoclonal; BD transduction laboratories, San Jose, CA, USA) e α -actina (1:5000; anticorpo monoclonal; Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA) diluídos em solução a 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5). Essa incubação com os anticorpos primários ocorreu durante toda a noite, a 4°C, por agitação mecânica.

Após o período de incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas por 30 minutos com uma solução TBS-T para remoção do excesso dos anticorpos primários, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 10 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário, imunoglobulina IgG anti-camundongo para COX-2, gp91phox, alfa-actina, eNOS e peNOS (1:5000; anticorpo monoclonal; GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), durante 60 minutos.

Após a incubação, com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a solução TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) (as soluções foram trocadas a cada 5 minutos no TBS-T e a cada 10 minutos no TBS).

As proteínas correspondentes a COX-2, gp91-phox, eNOS, peNOS e α -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência, por meio da exposição da membrana durante 5 minutos a um sistema de detecção (ECL Plus, AmershamTM, GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, AmershamTM, UK), sendo as bandas impregnadas posteriormente reveladas. A análise densitométrica foi utilizada para

quantificar as bandas das proteínas e, para isso, os filmes com as bandas proteicas impregnadas foram escaneadas. O programa ImageJ foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

3.5 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados estão espessos como média \pm erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

A resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina foi normalizada em função da resposta máxima de contração induzida por 75 mM de KCl em aorta e 120 mM de KCl em mesentérica, que foi considerada como 100% da resposta contrátil do músculo. A partir deste valor, as respostas contráteis à fenilefrina foram normalizadas. Para cada curva concentração-resposta a fenilefrina foram calculados os valores de pD_2 ($\log EC_{50}$) e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$). Para isso, foi realizada uma análise de regressão não linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta a esses agonistas, utilizando o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A.).

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

A expressão proteica de eNOS, peNOS, COX-2, gp91-phox foram expressas pela relação entre a densidade óptica de cada proteína em relação à α -actina.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste t , pareado e/ ou não pareado, e análise de variância (ANOVA), duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentava significância estatística, o teste *post-hoc* de Bonferroni foi realizado (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A.). Os resultados foram considerados significantes para valores de $P < 0,05$.

3.6 Fármacos, reagentes e anticorpos

- Cloreto de mercúrio (Sigma)
- Acrilamida (N, N`-Metilenbisacrilamida 40 % Solução 37, 5:1): BioRad
- Ácido acético glacial (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido bórico (Sigma)
- Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma)
- Acido hidroxietilpiperazina etanosulfônico (HEPES) (Sigma)
- Ácido orto-fosforico (Merck)
- Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma)
- Anticorpo monoclonal produzido em coelho para anti-COX-2 (Cayman Chemical)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para α -actina (Sigma)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para gp91(phox) (Sigma)
- Anticorpo secundário monoclonal conjugado com peroxidase de rabanete IgG anti-camundongo (Stressgen Bioreagents)
- Apocinina ((4´-Hidroxi-3´-metoxiacetofenona)) (Sigma)
- Bicarbonato de Sódio (Merck)
- Buffer Salino Fosfato (PBS) con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Invitrogen-Gibco)
- - Carbogênio (95 % de O_2 e 5 % de CO_2) (White Martins)
- Cloreto de Cálcio Dihidratado (Merck)
- Cloreto de magnésio (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma)
- Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF, Inibidor de Protease) (Sigma)
- Fosfato de Potássio Monobásico (Merck)
- Fosfato diácido de sódio (NaH_2PO_4) (VETEC)
- Glicerol (Sigma)
- Glicina (Sigma)
- Glicose (VETEC)
- Hidóxido de sódio (Sigma)
- Hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) (Sigma)
- Indometacina (ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1-H-indol-3-acético)

- Inibidores de fosfatases (Sigma)
- Inibidor de protease (Cocktail for General Use) (Sigma)
- Leite desnatado em pó (Nestlé)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio heptahidratado) (Merck)
- N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- NAD(P)H (β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido, sal tetrasódica)
- N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham Life Science)
- SDS (dodecil sulfato sódico) (Sigma-Aldrich)
- Solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) com Ca^{2+} e com Mg^{2+} (Invitrogen-Gibco)
- Solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) sem Ca^{2+} e sem Mg^{2+} (Invitrogen-Gibco)
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado (Merck)
- SYLGARD (Silicone elastómero) (Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA)
- Temed (tetrametiletlenodiamina) (Sigma)
- Tris (hidroximetil)-aminomenato (Tris) (Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)
- Tween 20 (polioxietileno sorbitano 20) (Sigma)

IV RESULTADOS

4.1 Peso corporal

O tratamento com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio não alterou o peso corporal dos ratos, uma vez que os grupos Controle, Baixa (15nM) e Alta (60nM) Exposição ao mercúrio, apresentaram peso semelhante no início e ao término do tratamento, como representado na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores do peso corporal (g) dos animais dos grupos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio.

Peso corporal			
Grupo	N	Início tratamento (g)	Final tratamento (g)
Controle	9	276±6,6	378±9,7
Alta Exposição	8	243±2,0	346±9,9
Baixa Exposição	9	269±5,2	378±6,7

4.2 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial sistólica dos animais foi avaliada uma vez por semana durante 30 dias em todos os grupos. Antes de iniciar (Controle: $106 \pm 2,43$ mmHg, Baixa Exposição: $109 \pm 2,0$ mmHg e Alta Exposição: $108 \pm 2,0$ mmHg) e após os 30 dias de tratamento (Controle: $114 \pm 2,4$ mmHg, Baixa Exposição: $115 \pm 1,7$ mmHg e Alta Exposição: $111 \pm 2,3$ mmHg) (Figura 1) os três grupos apresentaram valores pressóricos semelhantes.

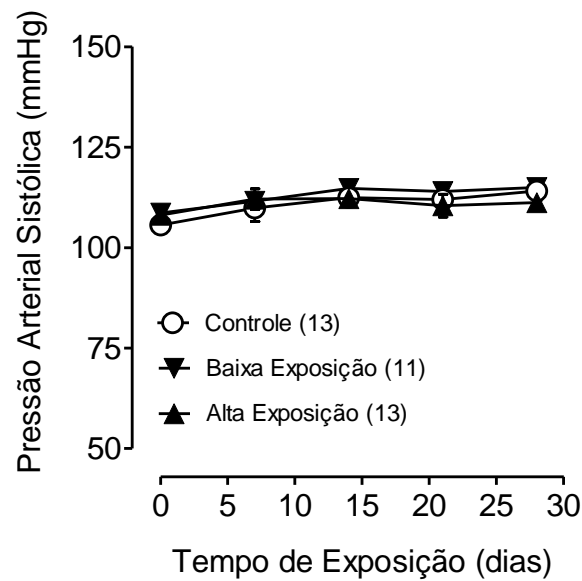


Figura 1: Valores da Pressão Arterial Sistólica (PAS) obtidos por meio da pletismografia de cauda em ratos durante 30 dias de tratamento dos grupos Controle, Baixa Exposição (15nM), Alta Exposição (60nM). O número de animais usados está indicado entre parênteses e os resultados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA (duas vias) seguidos por pós-teste de Bonferroni, $P < 0,05$.

4.3 Experimentos com Artérias Aorta e Artéria Mesentérica

4.3.1 Efeito do tratamento com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao mercúrio sobre a resposta vascular de anéis de aorta e artéria mesentérica de resistência ao Cloreto de Potássio (KCl)

Os valores de contração induzida por 75 mM de KCl foram de similar magnitude nos segmentos anéis de aorta nos grupos Controle ($2,51 \pm 0,16$ mN/mm), Baixa Exposição ($2,58 \pm 0,2$ mN/mm) e Alta Exposição ($2,67 \pm 0,23$) (teste $t - P > 0,05$), bem como a contração induzida por 120mM de KCl foram de similar magnitude em segmentos de artéria mesentérica nos grupos Controle ($3,87 \pm 0,24$ mN/mm), Baixa Exposição ($3,98 \pm 0,68$ mN/mm) e Alta Exposição ($3,84 \pm 0,42$) (teste $t - P > 0,05$).

4.3.2 Efeito do tratamento com baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao mercúrio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas.

4.3.2.1 Resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta

A administração de fenilefrina aumentou de maneira concentração-dependente o tônus basal dos anéis de artérias aorta isoladas de animais Controle e tratados com Baixa (15nM) e Alta (60nM) Exposição ao mercúrio (Figura 2). No entanto, o grupo Baixa (15nM) Exposição apresenta redução da reatividade à fenilefrina quando comparado ao Controle (Figura 2A) (R_{max} Controle: $94,51 \pm 5,54$, Baixa Exposição: $74,95 \pm 8,08$) enquanto o Grupo Alta Exposição (60nM) apresenta aumento da reatividade à fenilefrina quando comparado ao Controle (Figura 2B) (R_{max} Controle: $94,51 \pm 5,54$; Alta Exposição: $132 \pm 3,72$).

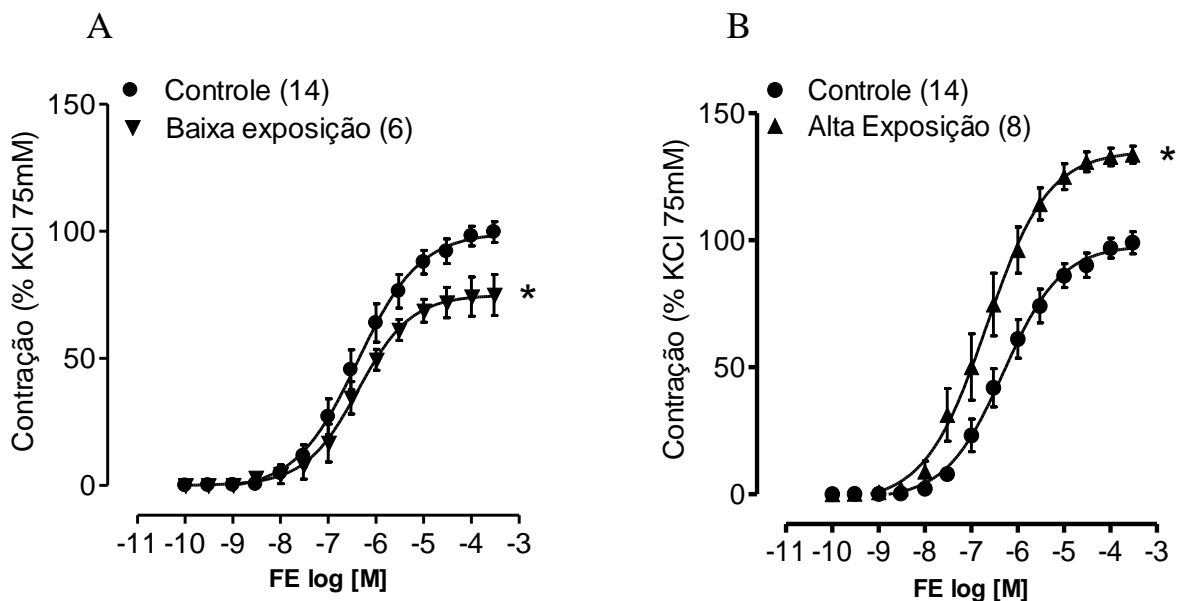


Figura 2: Resposta contrátil induzida por fenilefrina, em artérias aorta de ratos dos grupos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) foi utilizado o Teste-*t* não pareado. * $P < 0,05$.

4.3.2.2 Resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria Mesentéricas

A administração de fenilefrina aumentou de maneira concentração-dependente o tônus basal dos anéis de artérias mesentéricas de animais Controle, Baixa (15nM) e Alta Exposição (60nM) (Figura 3). No entanto, o Grupo Baixa Exposição (15nM) não teve alteração da reatividade à fenilefrina quando comparada ao Controle (Figura 3A) (R_{max} Controle: $100 \pm 14,2$; Baixa Exposição: $102 \pm 9,5$), enquanto o grupo Alta Exposição (60nM) apresenta aumento da reatividade à fenilefrina quando comparado ao Controle (Figura 3B) (R_{max} Controle: $100 \pm 14,2$, Alta Exposição: $122 \pm 18,5$).

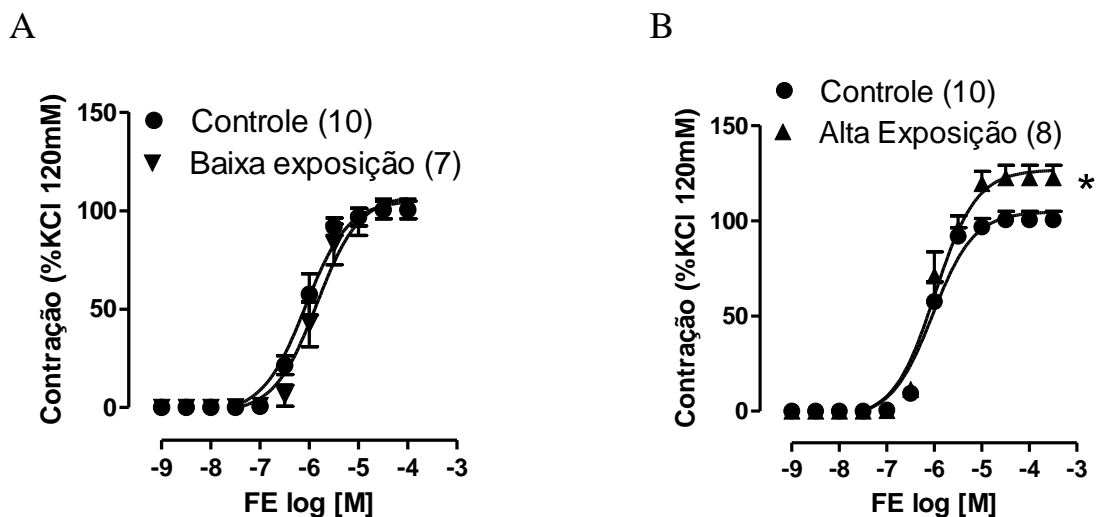


Figura 3: Resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) foi utilizado o Teste-*t* não pareado. * $P < 0,05$.

4.3.3 Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas de ratos tratados com baixa e alta exposição ao mercúrio

4.3.3.1 Modulação endotelial da resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de aorta

Após a remoção mecânica do endotélio, observamos o aumento significativo da sensibilidade (pD_2) e da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) à fenilefrina em segmentos da aorta torácica nos grupos Controle e Baixa Exposição (15nM) (Figura 4A-B) (R_{max} Controle: $94,51 \pm 5,5$; E-: $141 \pm 14,4$; Baixa Exposição: $74,9 \pm 8,0$, E-: $158 \pm 3,9$), (pD_2 Controle: $6,38 \pm 0,9$ E-: $7,10 \pm 0,05$; Baixa Exposição: $6,45 \pm 0,23$, E-: $7,20 \pm 0,13$), assim como aumento da resposta máxima no grupo Alta Exposição (60nM) (Figura 4C) (R_{max} Alta exposição: $132 \pm 3,72$; E-: $153 \pm 6,7$). A magnitude deste efeito, entre os grupos experimentais, foi comparada utilizando a dAAC, onde observamos efeito de maior magnitude nos animais do grupo Baixa Exposição (15nM) e de menor magnitude no grupo Alta Exposição (60nM) quando comparados ao grupo Controle (Figura 4D). Estes resultados sugerem que o tratamento crônico com baixa exposição (15nM) ao mercúrio leva a um desequilíbrio dos fatores endoteliais, vista através da redução da reatividade encontrada na Figura 1A e alta exposição (60nM) ao mercúrio reduz a modulação endotelial na resposta vascular à fenilefrina, como evidenciado pelos valores de dAAC em aorta de ratos tratados (Figura 4D).

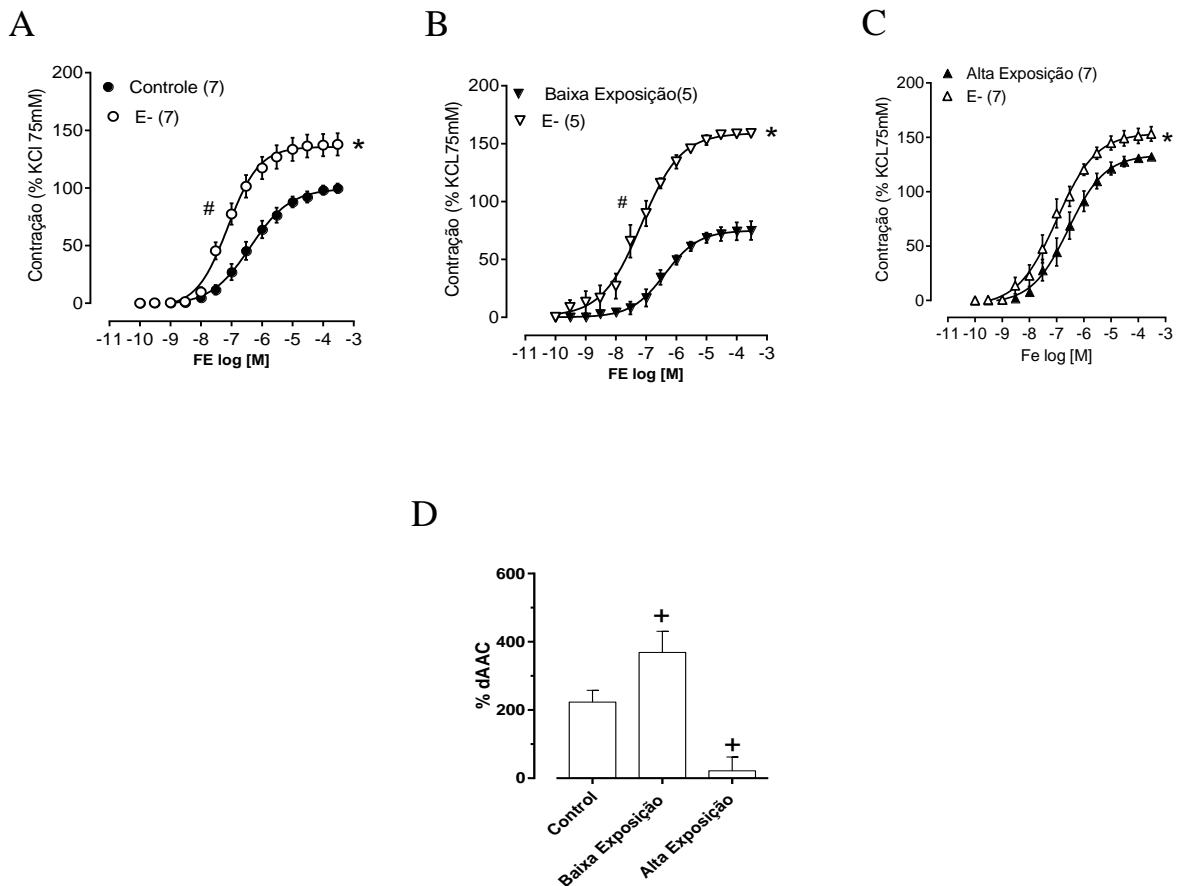


Figura 4: Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) (Figura A,B,C). Em D, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em artérias aorta com e sem endotélio dos grupos experimentais. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) foi utilizado o Teste- t não pareado. * $P < 0,05$.

4.3.3.2 Modulação endotelial da resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artérias mesentéricas

Após a remoção mecânica do endotélio, observamos o aumento significativo da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) à fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas nos grupos Controle e Baixa Exposição (15nM) (Figura 5A-B) (R_{max} Controle: $100 \pm 14,2$, E: $119 \pm 19,67$ Baixa Exposição: $102 \pm 9,5$, E-: $126 \pm 6,45$), assim como não alterou o da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) no grupo Alta Exposição (60nM) (Figura 5C) (R_{max} Controle: $100 \pm 14,2$; E-: $119 \pm 19,67$; Alta Exposição: $122 \pm 18,5$; E-: $125 \pm 24,71$).

A magnitude deste efeito entre os grupos experimentais foi comparada utilizando-se a dAAC e, não foi observado diferença quando comparamos os grupo baixa com o grupo Controle (Figura 5D). No entanto, o grupo Alta Exposição (60nM) apresentou menor magnitude que o grupo Controle. Estes resultados sugerem que a exposição crônica a altas doses de mercúrio reduz a modulação endotelial como evidenciado pelos valores de dAAC em aorta de ratos tratados.

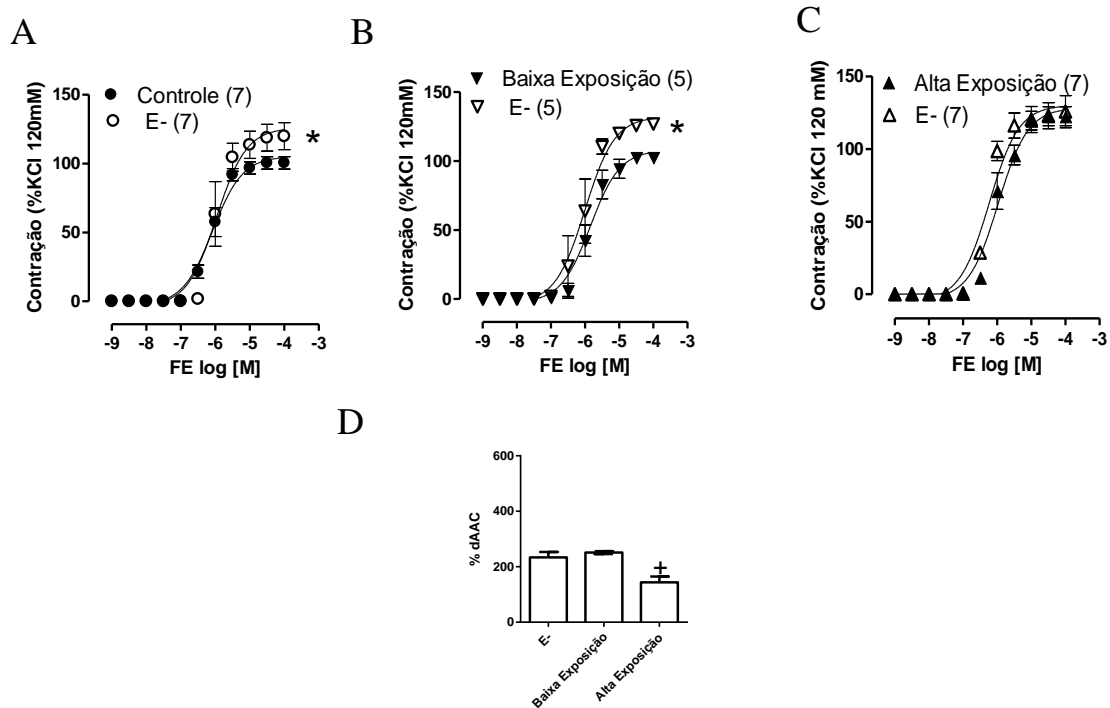


Figura 5: Efeito da remoção mecânica do endotélio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina, em artérias mesentéricas de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) (Figura A,B,C). Em D, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em artérias mesentéricas com e sem endotélio dos grupos experimentais. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. Para análise comparativa da resposta máxima (R_{máx}) foi utilizado o Teste-*t* não pareado. ^{#**}P<0,05.

4.3.4 Participação do óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com baixa (15nM) e alta exposição (60nM) ao mercúrio

4.3.4.1 Participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta

Ao constatarmos a influência de fatores endoteliais na resposta contrátil à fenilefrina, resolvemos investigar a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artérias aorta, para isso mantivemos o endotélio intacto e pré-incubamos com um inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico, o L-NAME (100 μ M). O L-NAME induziu o aumento da sensibilidade e da resposta máxima à fenilefrina nas artérias aorta isoladas de animais Controle e Baixa Exposição (15nM) (Figura 6A,B) (R_{max} Controle 94,51 \pm 5,5, L-NAME:129 \pm 11,5; Baixa Exposição: 74,95 \pm 8,8, L-NAME: 194 \pm 36,3; PD2 Controle: 6,32 \pm 0,22; L-NAME: 6,82 \pm 0,18; Baixa Exposição: 6,45 \pm 0,23, L-NAME: 7,48 \pm 0,22) já o grupo Alta Exposição (60nM) não houve alteração na sensibilidade e na resposta máxima (Figura 6C) (R_{max} Alta Exposição: 132 \pm 3,7; L-NAME: 140 \pm 9,50; PD2 Alta Exposição: 6,73 \pm 0,21, L-NAME: 7,24 \pm 0,17). Como evidenciado pelos valores de dAAC (Figura 6D), o efeito da inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME foi maior no Grupo Baixa Exposição (15nM) quando comparado ao Controle. Esses resultados sugerem um aumento da síntese de óxido nítrico no grupo Baixa Exposição (15nM) e um prejuízo da via do óxido nítrico (NO) sobre a resposta contrátil à fenilefrina no grupo Alta Exposição (60nM).

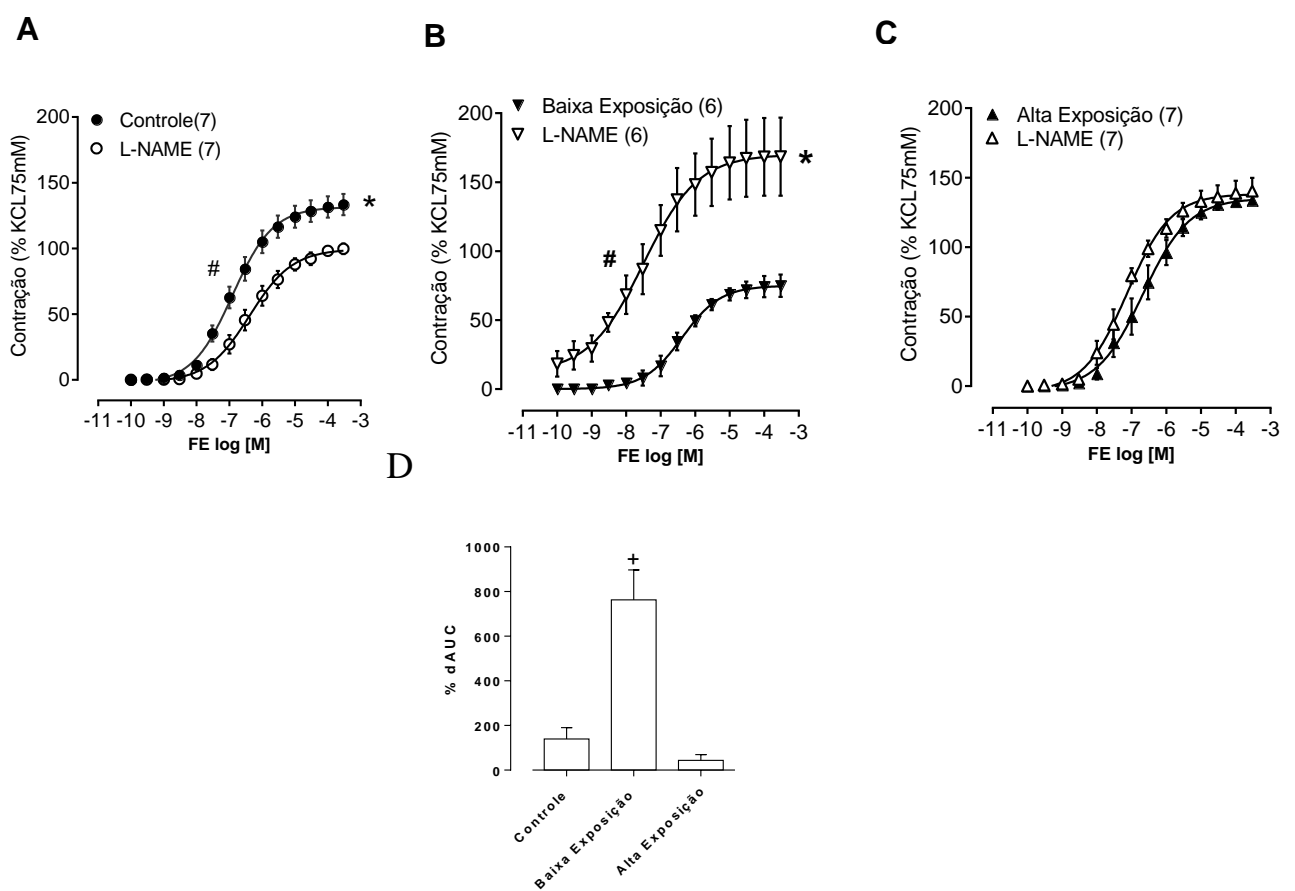


Figura 6: Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle (A), Baixa Exposição (15nM) (B) e Alta exposição (60nM) (C). Em D diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em artérias aorta dos grupos experimentais. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. * P < 0,05.

Para corroborar com os resultados acima que mostram um aumento do NO no grupo Baixa Exposição (15nM), nós analisamos a expressão proteica da eNOS e a relação eNOS/eNOS fosforilada no grupo Baixa Exposição (15nM). Como podemos observar, apesar de termos menor quantidade de eNOS no grupo baixa exposição, ela está mais funcional, como mostra a relação eNOS/eNOS fosforilada (Figura 7).

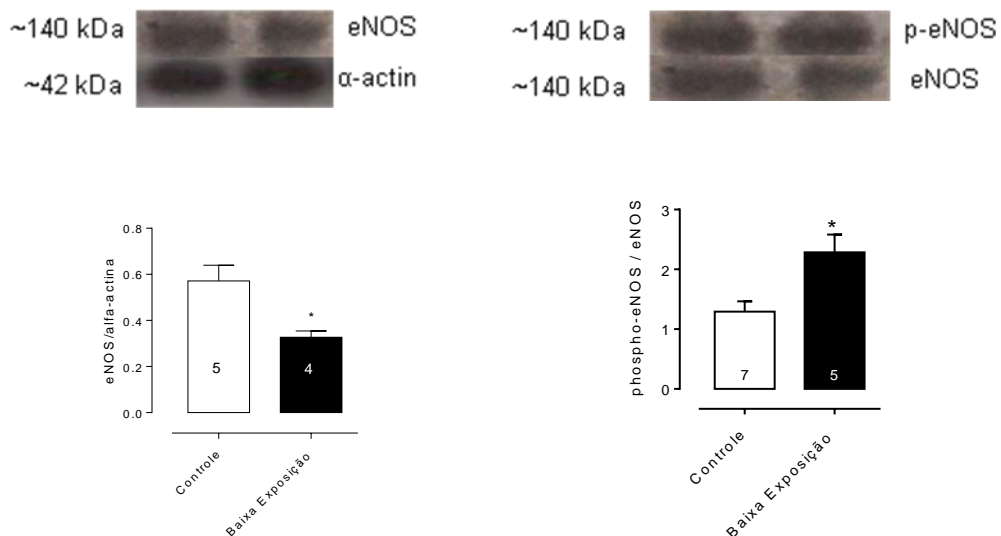


Figura 7: Efeito da baixa exposição (15nM) ao mercúrio sobre expressão proteica eNOS e a relação eNOS/eNOS fosforilada. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão eNOS, a relação eNOS/eNOS fosforilada e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM), para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. *P<0,05.

4.3.4.2 Participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artéria mesentérica

Assim como na artéria aorta, ao constatarmos a influência de fatores endoteliais na resposta contrátil à fenilefrina, resolvemos investigar a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artérias mesentéricas, para isso, mantivemos o endotélio intacto e pré-incubamos com um inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico, o L-NAME (100 μ M). O L-NAME induziu o aumento da resposta máxima à fenilefrina nas artérias mesentéricas isoladas de animais do grupo Controle e Baixa Exposição (15nM) (Figura 8 A-B) (R_{max} Controle $100,44 \pm 14,2$; L-NAME: $114,93 \pm 13,62$; Baixa Exposição: $102,42 \pm 9,5$; L-NAME: $115,02 \pm 5,37$). No grupo Alta Exposição (60nM) não houve alteração (Figura 8C) (R_{max} Alta Exposição: $122,53 \pm 18,5$, L-NAME: $112,97 \pm 4,05$). Os valores da dAAC (Figura 8D) mostram que o efeito da inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME foi maior no grupo Baixa Exposição (15nM) quando comparado ao Controle e menor no grupo Alta Exposição (60nM) quando comprado ao Controle, sugerindo que o tratamento com alta exposição ao mercúrio promoveu prejuízo da via do óxido nítrico (NO) sobre a resposta contrátil à fenilefrina.

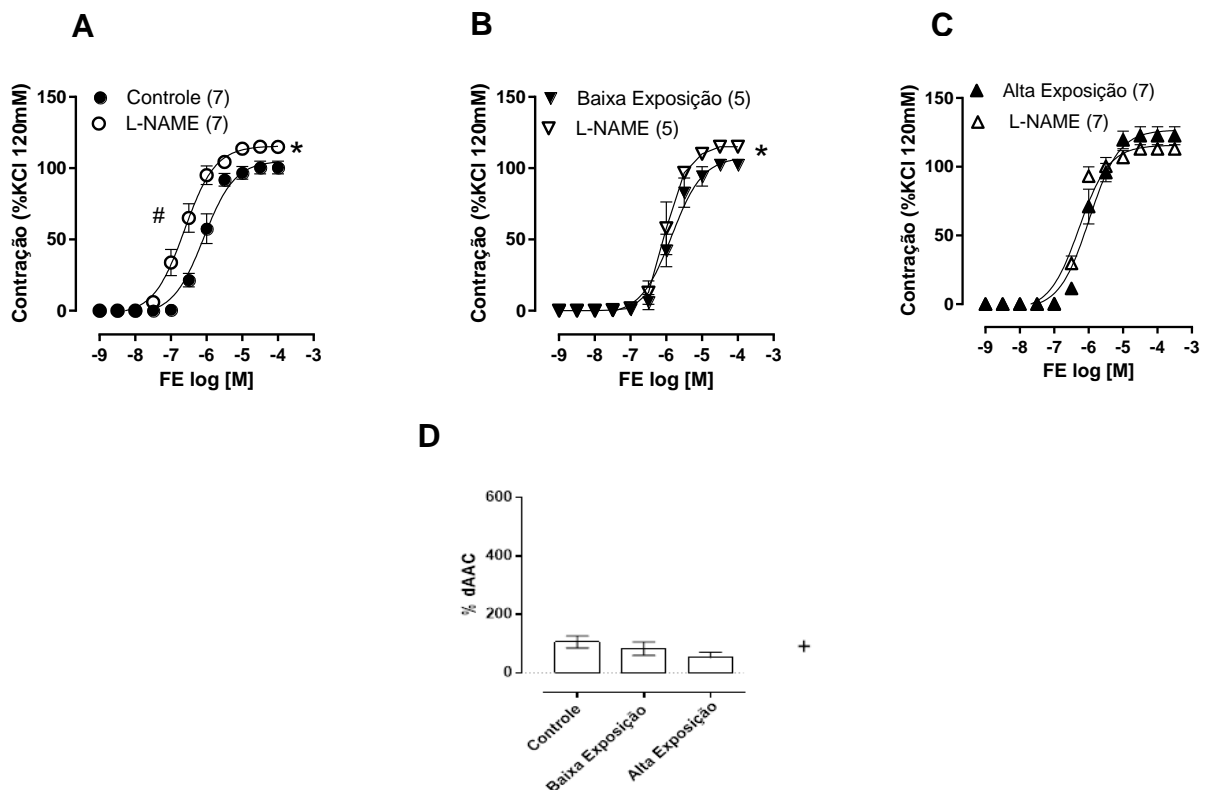


Figura 8: Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle (A), Alta

Exposição (60nM) (B) e Baixa Exposição (15nM) (C). Em D, diferença percentual da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (dAAC) em artérias mesentéricas dos grupos experimentais. Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. * $P < 0,05$

4.3.5 Participação de espécies reativas de oxigênio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com baixa (15nM) e alta exposição (60nM) ao mercúrio

4.3.5.1 Participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta

Diante da alteração da biodisponibilidade de NO nos grupos Alta (60nM) e Baixa (15nM) Exposição, e sabendo que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio leva à redução da biodisponibilidade do NO, decidimos avaliar os efeitos das espécies reativas de oxigênio na reatividade vascular à fenilefrina em artérias de ambos os grupos experimentais. Para estudarmos esta via, incubamos apocinina (30 μ M), um inibidor específico da NADPH oxidase (enzima que sintetiza do $O_2^{\bullet-}$) no banho. A apocinina promoveu redução na resposta máxima à fenilefrina nos anéis de aorta dos animais dos grupos Alta Exposição (60nM) (Figura 9C) (R_{max} Alta Exposição: $132 \pm 3,7$; Apocinina: $87,85 \pm 8,09$) sem alterar os grupos Controle e Baixa Exposição (15nM) (Figura 9A,B) (R_{max} Controle: $94,51 \pm 5,54$ Apocinina: $79,56 \pm 7,09$; Baixa Exposição: $74,89 \pm 81,41$; Apocinina: $81,83 \pm 7,32$).

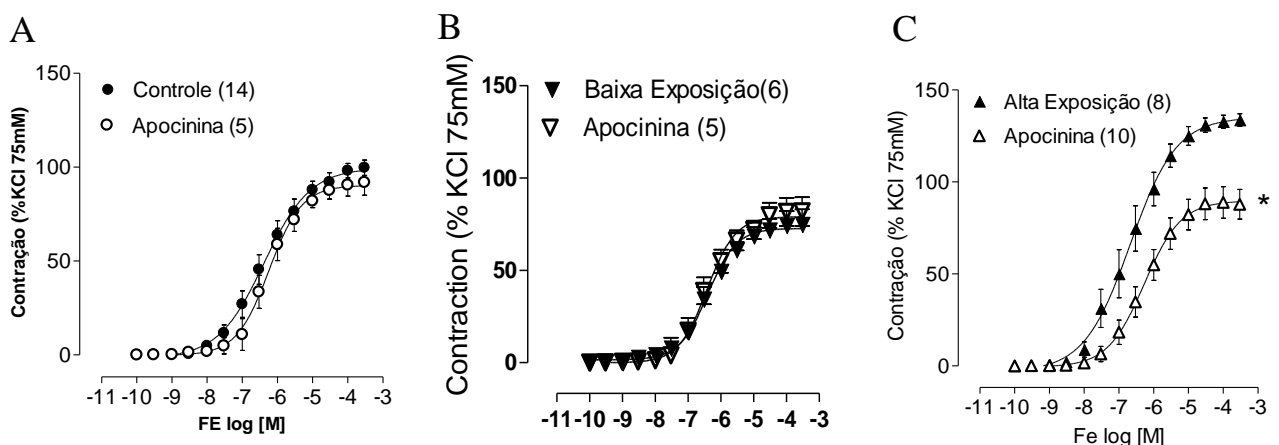


Figura 9: Efeito da inibição da NADPH oxidase com apocinina (30 μ M), sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle (A), Alta Exposição (60nM) (B) e Baixa Exposição (15nM) (C). Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. * P < 0,05

Para corroborar com os resultados acima, que mostram um aumento de radicais livres no grupo alta exposição ao cloreto de mercúrio, nós analisamos a expressão proteica da subunidade gp91phox da NADPH oxidase no grupo Alta Exposição. Como se pode observar, temos maior expressão proteica dessa subunidade no grupo Alta Exposição (60nM)(Figura 10).

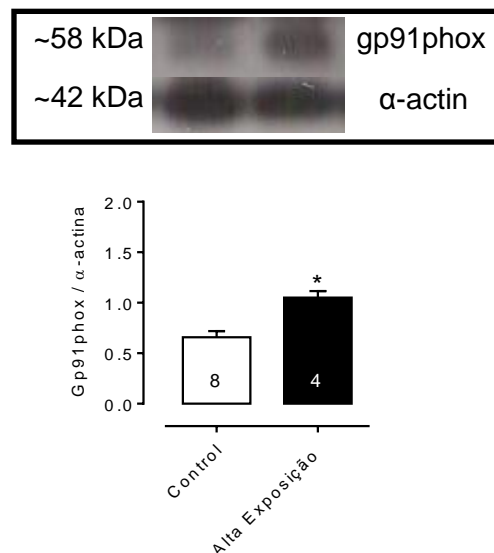


Figura 10: Efeito da Alta Exposição (60nM) sobre expressão proteica da subunidade gp91phox da NADPH oxidase. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da gp91phox e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM). Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. *P<0,05.

4.3.5.2 Participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria mesentéricas

Assim como na artéria aorta, diante da alteração da biodisponibilidade de NO nos grupo Alta Exposição (60nM), e sabendo que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio leva à redução da biodisponibilidade do NO, decidimos avaliar os efeitos das espécies reativas de oxigênio na reatividade vascular à fenilefrina em artéria mesentérica de ambos os grupos experimentais. Para estudarmos esta via, incubamos apocinina (30 μ M), inibidor específico da

NADPH oxidase (enzima que sintetiza do $O_2^{\bullet-}$) no banho. A apocinina promoveu redução na resposta máxima à fenilefrina nos anéis de artéria mesentérica dos animais dos grupos Alta Exposição (60nM) (Figura 11C) (R_{max} Alta Exposição: $150,51 \pm 23$; Apocinina: $122,53 \pm 18,5$), sem alterar os grupos Controle e Baixa Exposição (15nM) (Figura 11A,B) (R_{max} Controle $100,44 \pm 14,2$; Apocinina: $95,41 \pm 14,76$; Baixa Exposição: $102,42 \pm 9,5$, Apocinina: $104,14 \pm 10,50$).

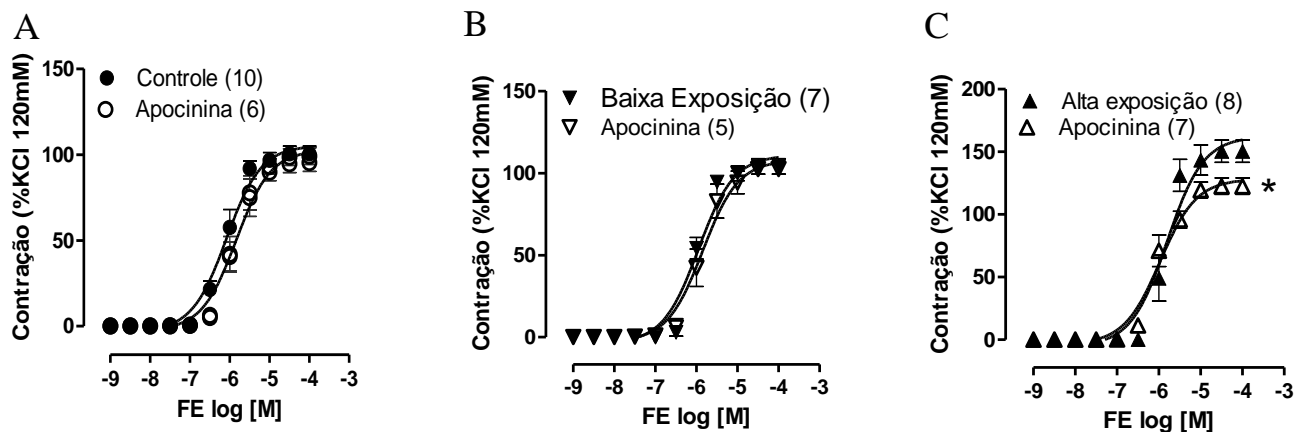


Figura 11: Efeito da inibição da NADPH oxidase com apocinina (30 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle, Alta Exposição (60nM) e Baixa Exposição (15nM). Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. * $P < 0,05$

4.3.6 Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com Baixa (15nM) e Alta (60nM) exposição ao mercúrio

4.3.6.1 Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta

Para investigar se a alta (60nM) e baixa (15nM) exposição crônica ao cloreto de mercúrio altera a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de

artéria aorta dos grupos Controle, Alta Exposição (60nM) e Baixa Exposição (15nM) foi incubado um inibidor não-específico da COX, a indometacina (1 μ M). O grupo Controle e Baixa Exposição (15nM) não foram capazes de alterar, de forma significativa, a resposta à fenilefrina (Figura 12 A-B) (R_{max} Controle: $94,51 \pm 5,54$; Indometacina: $89,30 \pm 4,8$; Baixa Exposição: $74,95 \pm 8,08$; Indometacina: $64,93 \pm 8,0$). Já o grupo Alta Exposição reduziu a resposta máxima à fenilefrina (Figura 12C) (R_{max} Alta Exposição: $132 \pm 3,72$, Indometacina: $93,13 \pm 6,92$).

Estes resultados indicam que a Alta Exposição (60nM) ao coreto de mercúrio aumenta a participação da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina em artérias aorta.

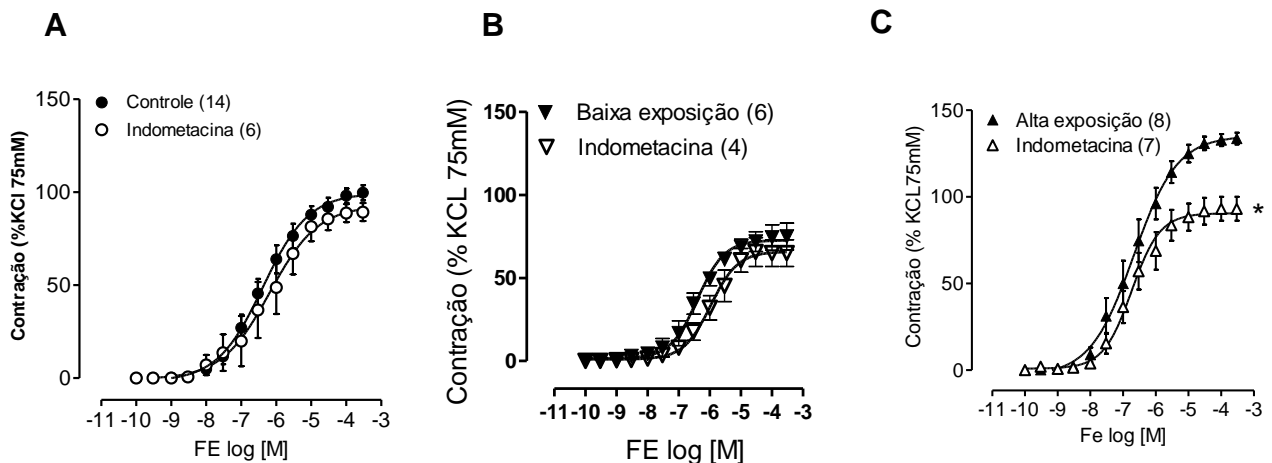


Figura 12: Efeito do bloqueio da via ácido araquidônico-ciclooxigenase com indometacina (INDO, 1 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. * P < 0,05

Corroborando os achados com Alta Exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio e indometacina, a expressão proteica da ciclooxigenase-2 (COX-2), mostrou aumento da expressão proteica da COX-2 em aortas quando comparado ao Controle (Figura 13).

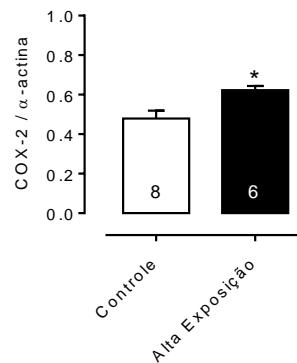
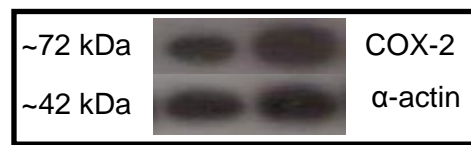


Figura 13: Efeito da Alta Exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio sobre expressão proteica da COX-2. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da COX-2 e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM). Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. * $P < 0,05$.

4.3.6.2 Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria mesentérica de resistência

Para investigar se a alta (60nM) e baixa exposição (15nM) crônica ao cloreto de mercúrio altera a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de artéria mesentérica, artérias dos grupos Controle, Alta Exposição (60nM) e Baixa (15nM) Exposição foram incubadas com o inibidor inespecífico da COX, a indometacina (1 μ M). O grupo Controle e Baixa Exposição (15nM) não foram capazes de alterar de forma significativa a resposta máxima à fenilefrina (Figura 14 A,B) (Rmax Controle: $100,44 \pm 14,2$, Indometacina: $95,93 \pm 16,27$; Baixa Exposição: $102,42 \pm 9,5$, Indometacina: $89,58 \pm 18,93$). Já o grupo Alta Exposição (60nM) reduziu a resposta máxima à fenilefrina (Figura 14C) (Rmax Alta Exposição: $122,53 \pm 18,5$; Indometacina: $96,67 \pm 17,22$).

Estes resultados indicam que a Alta Exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio aumenta a participação da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas.

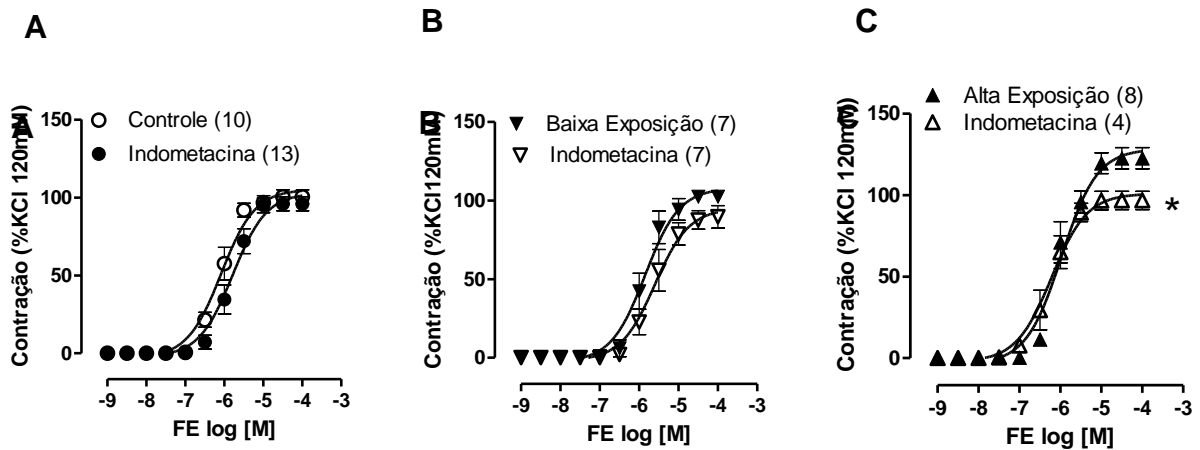


Figura 14: Efeito do bloqueio da via ácido araquidônico-ciclooxigenase com indometacina (INDO, 1 μM) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle (A), Baixa Exposição(15nM) (B) e Alta Exposição (60nM) (C). Os resultados (média ± erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. * P < 0,05.

4.3.7 Participação do sistema renina angiotensina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de artéria aorta e artérias mesentéricas em ratos tratados com Baixa (15nM) e Alta (60nM) exposição ao mercúrio

4.3.7.1 Participação do sistema renina angiotensina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta.

Estudos prévios do nosso laboratório, como o de Wiggers et al. 2008 mostram a capacidade do mercúrio em aumentar a atividade da enzima conversora da angiotensina, que por sua vez exerce um efeito vasoconstrictor. Diante disso, fomos investigar esse efeito vasoconstrictor através da incubação dos grupos Controle e Alta Exposição (60nM) com um inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), o Enalapril (10μM), e com um antagonista dos receptores AT₁, o Losartan (10 μM). O grupo Baixa Exposição (15nM) encubamos somente com losartan (10 μM). Pôde ser observado, que tanto o Enalapril, quanto o Losartan foram capazes de reduzir a resposta máxima e a sensibilidade à fenilefrina no grupo

Alta Exposição (60nM) (Figura 15 C,E) (R_{max} Alta exposição: $132 \pm 3,72$; Losartan: $85,86 \pm 6,53$; Enalapril: $62,83 \pm 8,61$. PD2 Alta exposição: $6,73 \pm 0,21$; Losartan: $6,50 \pm 0,10$; Enalapril: $5,73 \pm 0,90$), sugerindo que o tratamento com alta exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio é capaz de ativar a participação do sistema renina-angiotensina na resposta vascular à fenilefrina em artérias aorta.

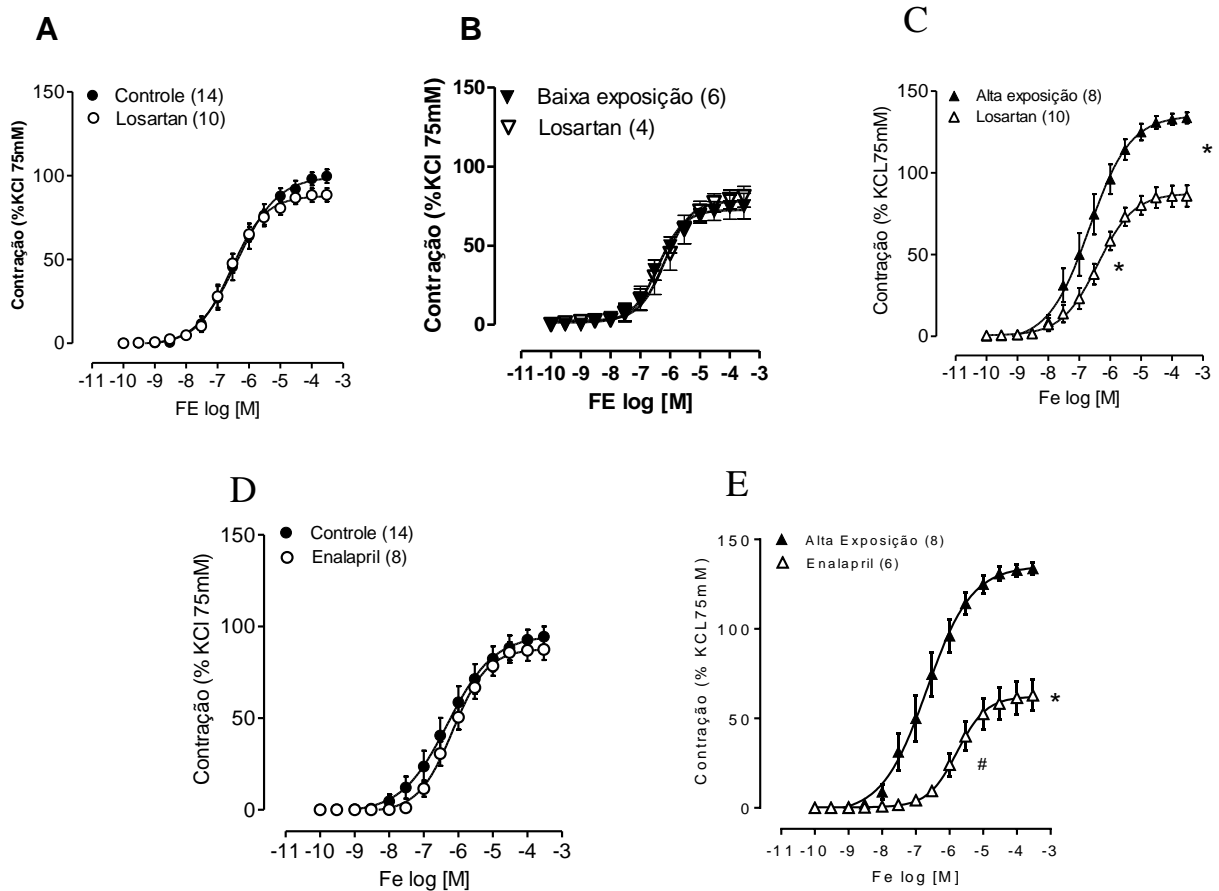


Figura 15: Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) pela incubação com Enalapril (10 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Efeito do bloqueio do receptor AT_1 pela incubação com o antagonista Losartan (10 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. * $P < 0,05$.

4.3.7.2 Participação do sistema renina angiotensina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria mesentérica

Ainda com base nos estudos de Wiggers et al. 2008 que mostram a capacidade do mercúrio em aumentar da atividade da enzima conversora da angiotensina, que por sua vez exerce um efeito vasoconstrictor, nós incubamos anéis de artéria mesentérica dos grupos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) com um antagonista dos receptores AT_1 , o Losartan (10 μ M) (Figura 16). Pôde ser observado, que o Losartan é capaz de reduzir a resposta máxima à fenilefrina no grupo Alta Exposição (60nM) (Figura 16C) (R_{max} Alta Exposição: $122,53 \pm 18,5$, Losartan: $88,86 \pm 17,94$), sem alterar o grupo Controle e Baixa Exposição (15nM) (Figura 16A,B) (R_{max} Controle: $100,44 \pm 14,2$; Losartan: $101,61 \pm 24,21$; Baixa Exposição: $102,42 \pm 9,5$; Losartan: $96,44 \pm 18,77$), sugerindo que o tratamento com Alta Exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio é capaz de ativar a participação do sistema renina-angiotensina na resposta vascular à fenilefrina em artérias mesentéricas.

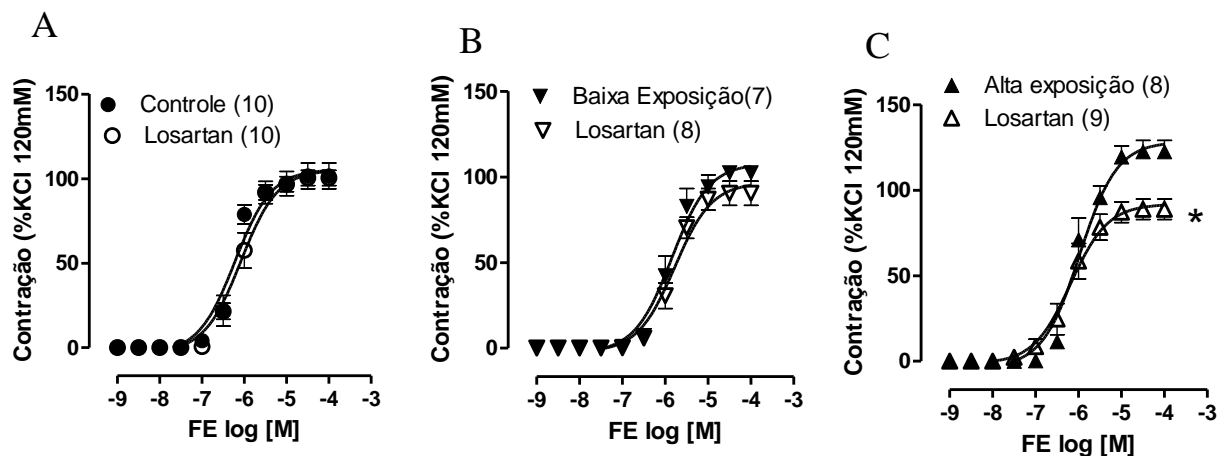


Figura 16: Efeito do bloqueio do receptor AT_1 pela incubação com o antagonista Losartan (10 μ M) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM). Os resultados (média \pm erro padrão da média) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. * $P < 0,05$.

Tabela 2: Valores de pD_2 e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias aorta de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) com ou sem endotélio na condição controle e após incubação com L-NAME, Apocinina, Indometacina, Losartan e Enalapril.

	Controle		Baixa Exposição		Alta Exposição	
	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2
Controle	94.51±5.54	6.32±0,22	74.95±8.08#	6.45±0.23	132±3.72#	6.73±0.21
E-	141±14.48	7.10±0.05	158±3.90*	7.20±0.13*	153±6.70*	7.12±0.20*
L-NAME	129±11.25	6.82±0,18	194±36.3*	7.48±0.22*	140±9.50*	7.24±0.17*
Apocinina	79.56±7.09	6.26 ± 0,14	81,83 ± 7,72	6,42 ± 0,08	87.85 ± 8.09*	6.30 ± 0,16
Indometacina	89.30± 4.84	6.12± 0.33	64,93 ± 8,04	5,96 ± 0,11	93.13±6.92*	6.66± 0.24
Losartan	85.24± 2.61	6.60± 0,21	80,88 ± 6,59	6,17 ± 0,11	85.86 ± 6.53*	6.50 ± 0.10
Enalapril	87.53±5.78	6.15 ± 0,10			62.83 ± 8.61*	5.73 ± 0,90*

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. Teste-t: * * P < 0,05 entre o próprio grupo, # P < 0.05 vs curva controle.

Tabela 3: Valores de pD_2 e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, % de contração) obtidos através de curvas concentração-resposta à fenilefrina em artérias mesentérica de ratos Controle, Baixa Exposição (15nM) e Alta Exposição (60nM) com ou sem endotélio na condição controle e após incubação com L-NAME, Apocinina, Indometacina e Losartan.

	Controle		Baixa Exposição		Alta Exposição	
	$R_{m\acute{a}x}$	pD_2	$R_{m\acute{a}x}$	pD_2	$R_{m\acute{a}x}$	pD_2
E+	100,44 ± 14,2	6,07 ± 0,06	102,72 ± 9,50	5,84 ± 0,07	122,53 ± 18,50#	5,98 ± 0,06
E-	119,84 ± 19,6*	5,96 ± 0,06	126,77 ± 6,45*	6,00 ± 0,10	125,73±24,71	6,24 ± 0,06
L-NAME	114,93 ± 13,60*	6,66 ± 0,06*	115,02 ± 5,37*	5,94 ± 0,07	112,97 ± 4,05	6,27 ± 0,05
Apocinina	95,41 ± 14,70	5,83 ± 0,05	104,47 ± 9,59	5,84 ± 0,07	150,51 ± 23,50*	5,80 ± 0,08
Indometacina	95,93 ± 16,27	5,75 ± 0,06	89,59 ± 18,93	5,59 ± 0,93	96,67 ± 17,02*	5,96 ± 0,06
Losartan	101,61 ± 24,21	6,21 ± 0,07	96,44 ± 18,77	5,57 ± 0,07	88,86 ± 17,44*	6,18 ± 0,08

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. Teste-t. * * P < 0,05 entre o próprio grupo, # P < 0.05 vs curva controle.

V DISCUSSÃO

Estudos prévios demonstram os efeitos do HgCl_2 na reatividade vascular (Aguado et al. 2013, Lemos et al. 2012, Furieri et al. 2011a, Wiggers et al. 2008), mas pouco se sabe sobre os efeitos da exposição crônica a baixas (15nM) e altas (60nM) concentrações de cloreto de mercúrio sob diferentes leitos vasculares. O presente estudo mostrou um comportamento diferente do tratamento crônico com baixas (15nM) e altas (60nM) concentrações de HgCl_2 na reatividade vascular de artérias aorta e mesentéricas de resistência. Embora a exposição a altas doses de HgCl_2 provoque um aumento da resposta vasoconstritora em aortas de ratos, animais cronicamente expostos a doses mais baixas (15nM) apresentaram redução da reatividade no mesmo leito vascular. Já em artéria mesentéricas de resistência a alta exposição (60nM) também aumenta a reatividade vascular, porém a dose mais baixa (15nM) não foi capaz de alterar tal reatividade, isso demonstra a mudança de comportamento do HgCl_2 em diferentes leitos vasculares com concentrações plasmáticas distintas. Visando esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na resposta desencadeada pelo cloreto de mercúrio, os resultados encontrados serão discutidos minuciosamente em cada protocolo realizado neste trabalho.

5.1 Efeitos da alta (60nM) e baixa (15nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre o peso corporal

É sabida a capacidade do mercúrio em produzir alterações no peso corporal. Sendo essas alterações concentrações dependentes, uma vez que ratos submetidos a um tratamento crônico com altas concentrações de mercúrio (5 mg/kg/dia) tiveram redução do peso corporal (Sakamoto et al. 2004) e ratos submetidos a doses menores (10 a 100 μg de vapor de mercúrio/ m^3), não tiveram alteração do peso corporal (Eide & Wesenberg 1993).

Tentando elucidar como estas alterações acontecem, encontramos o estudo de Rothenberg et al. (2015), que compara obesidade com níveis aumentados de metilmercúrio em adultos e crianças. O mesmo mostra que existe uma relação entre metabolismo, distribuição e excreção do metilmercúrio

com índice de massa corporal (IMC) em adultos, pois os níveis de mercúrio no sangue foram inversamente proporcionais ao peso dessas pessoas.

Outro estudo interessante é o de Tinkov et al. (2014), que observou a associação entre o aumento da concentração de mercúrio, níveis séricos de triglicerídeo em homens. Diante do exposto, entendemos a capacidade do mercúrio em alterar o metabolismo corporal, levando a um ganho ou perda de peso corporal, e que esta alteração do peso está relacionada às alterações de parâmetros lipídicos.

Em nossos estudos, não observamos alterações do peso corporal em nenhuma das doses utilizadas. A dose baixa (15nM) corrobora com o estudo da Wiggers et al. (2008a), que também não encontrou alteração do peso corporal em ratos expostos a baixas doses (29nM) de mercúrio. A exposição crônica a altas doses (60nM), possivelmente não alterou o peso corporal visto que utilizamos cloreto de mercúrio. Outros estudos que realizaram tratamentos com altas doses de mercúrio, possivelmente mostraram perda de peso corporal, pois utilizaram metilmercúrio, que apresenta uma maior toxicidade.

5.2 Efeitos da alta (60nM) e baixa (15nM) exposição ao cloreto de mercúrio sobre a pressão arterial sistólica

Tendo em vista que a hipertensão arterial é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular (Gu et al. 2009), e que a exposição crônica ao mercúrio pode levar a alterações significativas na pressão arterial (Carmignani et al. 1992, Carmignani et al. 1984), investigamos o efeito da exposição crônica a baixas (15nM) e altas (60nM) doses de HgCl_2 sobre a pressão arterial sistólica (PAS). Entretanto, no presente estudo, não observamos alterações na pressão arterial sistólica em ambos os grupos, apesar das inúmeras alterações vasculares. Este resultado parece sugerir que o efeito do mercúrio sobre a PAS é dependente do tempo de exposição utilizado.

Comprovando a capacidade do mercúrio em alterar a pressão arterial, Machado et al. (2007) observaram que o mercúrio é capaz de aumentar a

pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca. Entretanto, após administração de hexametonio e verapamil, ocorre redução da pressão arterial, demonstrando a participação do sistema nervoso autônomo nas alterações de pressões ocasionadas pelo mercúrio.

Corroborando o estudo de Machado et al. (2007), estudo prévio do nosso laboratório demonstrou que após injeção intracisternal de HgCl_2 em ratos, os mesmos tiveram uma elevação da pressão arterial sistólica e diastólica e esta resposta era desencadeada por ativação do sistema nervoso simpático (Azevedo et al. 2011).

Em relação às alterações de pressão arterial decorrente de estresse oxidativo, podemos citar o trabalho em que operários mineiros, expostos a grande quantidade de mercúrio, apresentaram um significativo aumento da pressão arterial e maior risco de doenças cardiovasculares, sendo este aumento correlacionado com a peroxidação lipídica e estresse oxidativo (Boffetta et al. 2001, Kobal et al. 2004, García-Gomez et al. 2007).

Reforçando nossos achados, Wiggers et al. (2008) após realizarem tratamento crônico com baixas doses (29nM) de cloreto de mercúrio não observaram aumento da pressão arterial, apesar das alterações de reatividade vascular. No presente estudo provavelmente as alterações na pressão arterial sistólica ainda não foram observadas por se tratar de uma concentração baixa para tal alteração, além do baixo tempo de exposição utilizado.

5.3 Efeitos da alta (60nM) e baixa (15nM) exposição ao cloreto de mercúrio em artérias aorta e mesentérica

Com intuito de investigar a relação do tratamento com baixas e altas doses de cloreto de mercúrio em vasos de condutância e resistência, e tendo como base estudos anteriores, como o de Peçanha et al. 2010 e Wiggers et al. 2008a, realizamos uma série de experimentos para avaliar a participação endotelial, uma vez que as células endoteliais têm por função sintetizar inúmeras substâncias vasomoduladoras, que interferem diretamente na estrutura e no tônus da parede vascular, modulando a pressão arterial sistêmica.

Entre as principais substâncias vasoconstritoras temos endotelina-1, a angiotensina II, o tromboxano A₂ (TXA₂) e a PGH₂. Como principais substâncias vasodilatadoras temos o óxido nítrico (ON), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) (Feliciano et al. 1999).

Com o objetivo de estudar os efeitos do cloreto de mercúrio sobre algumas dessas substâncias, selecionamos para esse estudo a artéria aorta, por ser um vaso de condutância, cuja função é conduzir e distribuir o débito cardíaco para diferentes tecidos e realizar o armazenamento de pressão e volume nas mudanças fásicas de pressão. Além da capacidade desses vasos em se distender, o que afeta a ejeção ventricular, e por sua vez, o estresse sistólico do ventrículo (Órouker 1990).

Já a artéria mesentérica foi selecionada por possuir diâmetro < 500 µm, sendo assim considerada artérias de resistência. As artérias de resistência têm papel fundamental na resistência vascular sistêmica e, portanto, na manutenção do equilíbrio pressórico, uma vez que a resistência vascular periférica é inversamente proporcional ao raio do vaso elevado à quarta potência. Por esse motivo, uma redução no calibre desses vasos podem produzir importantes aumentos na resistência periférica e, por conseguinte da pressão arterial (Mulvany & Aalkjaer, 1990).

5.3.1 Efeitos da baixa (15nM) e alta (60nM) exposição ao cloreto de mercúrio em artérias aorta e mesentérica sobre a resposta vascular à fenilefrina e o papel do endotélio

Inicialmente, nosso estudo avaliou a resposta à fenilefrina em aorta de ratos expostas ao mercúrio. Observamos que o mercúrio, em baixa concentração (15nM), promoveu uma diminuição, concentração dependente, da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta, confirmada pela diminuição da resposta máxima. Em contrapartida, no grupo Alta Exposição (60nM) ao metal, houve um aumento da reatividade à fenilefrina. Resultado semelhante ao grupo Alta Exposição (60nM) foi encontrado por Wiggers et al. 2008a em anéis de aorta de ratos Wistar, expostos por 30 dias ao mercúrio.

Corroborando nossos achados, Rizzetti et al. (2013) utilizando 29nM de cloreto de mercúrio, observaram um aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta e redução das respostas dependentes do endotélio à acetilcolina em ratos tratados cronicamente com doses baixas de cloreto de mercúrio.

Em seguida, avaliamos a modulação endotelial através da remoção do endotélio em anéis de aorta. No grupo Baixa Exposição (15nM), houve um aumento da modulação endotelial, enquanto no grupo Alta Exposição (60nM), houve uma diminuição da modulação endotelial.

No grupo Baixa Exposição (15nM), o aumento da modulação endotelial associado à diminuição da reatividade à fenilefrina, sugere que o mercúrio aumenta a liberação de um fator vasodilatador dependente do endotélio. Já no grupo Alta Exposição (60nM), a diminuição da modulação endotelial sugere que o mercúrio aumenta a liberação de um fator vasoconstritor e/ou reduz a liberação de fatores vasodilatadores dependentes do endotélio. Neste sentido, o estudo visou investigar algumas vias que possivelmente poderiam esclarecer a ação vascular do mercúrio em anéis de aorta de ratos.

Dentre os fatores vasoativos derivados do endotélio, o NO é o principal fator relaxante que modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas (Chatterjee et al. 2008). Além disso, estudo prévio mostrou importante contribuição do NO em vasos de condutância, como a aorta torácica (Urakami-Harasawa et al, 1997). Assim, com o objetivo de avaliar uma possível participação dessa via, foi realizada uma curva concentração resposta à fenilefrina na presença de L-NAME, um inibidor inespecífico da NO sintase em artéria aorta.

O L-NAME potencializou a resposta vasoconstritora à fenilefrina em maior proporção no grupo Baixa Exposição (15nM) quando comparado ao controle, conforme demonstrada pela % dAAC. Estes resultados sugerem que a exposição ao metal além de diminuir a reatividade vascular, aumenta a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina por aumentar a biodisponibilidade de NO. Reforçando esta linha de evidência, observamos o aumento da relação eNOS/ eNOS fosforilada em segmentos da aorta após a

baixa exposição (60nM) ao cloreto de mercúrio quando comparados aos controles.

Confirmando os nossos achados, temos o estudo de Omanwar et al, (2013), que demonstram um aumento na reatividade vascular à acetilcolina em aorta de ratos agudamente expostas à 5mg/kg de metil-mercúrio . O metil mercúrio induz a óxido nítrico sintase (NOS) a aumentar a produção de NO.

No grupo Alta Exposição (60nM), o L-NAME não alterou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina, sugerindo que o mercúrio, em alta concentração, além de aumentar a reatividade vascular, diminui a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina possivelmente por diminuir a biodisponibilidade de NO em artéria aorta de ratos.

Corroborando com os resultados do grupo Alta Exposição (60nM), encontramos no estudo de Lemos et al. (2012), que após exposição aguda a baixa concentração de mercúrio (6nM) observaram que esse metal produz vasoconstrição, diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico e aumenta o estresse oxidativo em aorta do rato.

Com o propósito de investigar a relação do tratamento com baixas e altas doses de cloreto de mercúrio em vasos de resistência, tendo em vista sua importância para regulação da pressão arterial, estudamos anéis de artérias mesentéricas de resistência de ratos tratados com baixas e altas doses de cloreto de mercúrio com e sem endotélio.

Os ratos tratados com baixas doses de cloreto de mercúrio, cujos anéis permaneceram com endotélio íntegro, não tiveram alteração da reatividade ao serem estimulados com fenilefrina quando comparados ao controle, porém, após a retirada do endotélio os mesmos apresentaram aumento da reatividade vascular, assim como os anéis de ratos controles. Ao compararmos % dAAC do grupo Baixa Exposição (15nM) com o Controle, não encontramos diferenças, demonstrando que baixa exposição (15nM) ao cloreto de mercúrio não altera a resposta vascular à fenilefrina de artéria mesentérica de ratos. Porém quando expostos a altas concentrações (60nM) de cloreto de mercúrio, os anéis com endotélio íntegro apresentaram uma elevação da reatividade vascular, sendo essa alteração abolida após a retirada do endotélio ou

incubação com L-NAME, o que nos indica que em vasos de resistências precisamos de doses mais altas de cloreto de mercúrio para ocasionar disfunção endotelial.

Furieri et al. (2011), após tratamento por 30 dias com uma concentração plasmática em torno de 8 ng/ml (~29nM), observaram que o cloreto de mercúrio foi capaz de aumentar a vasoconstrição induzida por 5-HT e reduzir a vasodilatação induzida pela acetilcolina em artérias coronárias. Além de reduzir óxido nítrico (NO) e aumentar a produção de ânion superóxido e os níveis de mRNA de NOX-1 e NOX-4 .

Investigando os efeitos agudos de 6nM cloreto de mercúrio sobre a função endotelial de anéis de aorta incubados com cloreto de mercúrio durante 45 min, Lemos et al (2011) observaram um aumento da resposta máxima e sensibilidade na curva dose-resposta a fenilefrina, sem alterar o relaxamento vascular induzida pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Além da redução do Rmax e pD2 do L-NAME em resposta à fenilefrina.

Embora esses autores também utilizem doses abaixo daquelas consideradas tóxicas, elas são mais elevadas do que a utilizada no grupo Baixa Exposição (15nM) do presente estudo. Os nossos resultados sugerem que as concentrações sanguíneas de mercúrio menores do que aquelas que não produzem efeitos adversos induzem respostas adaptativas, provavelmente como uma tentativa do organismo em se proteger contra os efeitos tóxicos do mercúrio.

Corroborando nossos resultados nas diferentes concentrações, Omanwar et al. (2013) encontraram uma resposta bifásica após a incubação de anéis de aorta com mercúrio inorgânico: o relaxamento dos vasos em concentrações mais baixas e vasoconstrição na concentração mais elevada; no entanto, após a remoção do endotélio, as concentrações mais baixas de mercúrio produziram apenas vasoconstrição. Estes resultados, apesar de utilizarem administrações agudas, estão de acordo com aqueles encontrados no nosso modelo experimental, indicando um efeito deletério do mercúrio sobre o tônus vascular, mesmo em baixas concentrações, através de um mecanismo dependente do endotélio. Este aumento da produção de NO endotelial pode

ser um efeito direto do mercúrio ou uma resposta compensatória a menor lesão vascular.

Como demonstrado por vários autores supracitados, o mercúrio reduz a biodisponibilidade de NO, e essa redução parece estar relacionada ao aumento do estresse oxidativo, sendo necessária a investigação da participação das espécies reativas de oxigênio nos grupos Baixa (15nM) e Alta Exposição (60nM) nos diferentes leitos vasculares.

5.3.2 Participação de espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta e mesentérica.

O estresse oxidativo está envolvido na patogênese de inúmeras desordens metabólicas, reprodutoras e cardiovasculares (Gao & Mann 2009, Kim et al. 2006, Vaziri et al. 2006, Martinez et al. 2014). O aumento de radicais livres, principalmente aqueles derivados do oxigênio, tem sua gênese na disfunção endotelial, o que leva à redução de NO (Cai & Harrison 2000). A Redução de óxido nítrico disponível é resultado de um desequilíbrio entre a sua produção pela NOS e sua degradação metabólica por espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido. Sendo essas espécies reativas de oxigênio, produzidas principalmente por NADPH oxidase, COX ou SRA (Aguado et al. 2013, Barbieri et al. 2003, Tsuji et al. 2015)

A NADPH oxidase é uma importante fonte de ânion superóxido (Mohazzab et al., 1994), ela é constituída pelas sub-unidades p22phox e gp91phox que estão ligadas à membrana e por três subunidades citosólicas (p67phox, p47phox e p40phox), as quais têm sua ação inibida pela apocinina (Meyer et al. 1999; Stefanska & Pawliczak 2008).

Diante disso, para investigar o impacto das espécies reativas de oxigênio derivadas da NADPH oxidase sobre a hiperatividade à fenilefrina em artéria aorta de ratos expostos a altas e baixas doses de cloreto de mercúrio, nós incubamos esses anéis com apocinina, um inibidor da NADPH oxidase. Apocinina reduziu a resposta contráctil dos anéis de aorta de animais que foram expostos a elevadas doses de cloreto de mercúrio, mas não em animais expostos a baixas doses, e tão pouco dos animais controle. Esses dados

funcionais foram reforçados pelo aumento da expressão proteica da sub-unidade gp91phox da NADPH oxidase localizadas no endotélio e na camada muscular lisa vascular (Drummond et al. 2011).

Em artérias mesentéricas, obtivemos os mesmos resultados, a apocinina reduziu a resposta contráctil dos animais expostos a elevadas doses de cloreto de mercúrio, mas não em animais expostos a baixas doses e tão pouco dos animais controle, sugerindo que o cloreto de mercúrio em doses altas reduz a disponibilidade de NO por aumentar a atividade de NADPH oxidase, que por sua vez pode aumentar espécies reativas de oxigênio, um importante vasoconstrictor, tanto em vasos de condutância quanto em vasos de resistência.

De fato, usando o tratamento crônico com cloreto de mercúrio e co-tratamento com apocinina, Rizzetti et al. (2013) demonstraram que o tratamento com apocinina preveniu parcialmente o aumento das respostas à fenilefrina e reduziu a disfunção endotelial. Além disso, o tratamento com apocinina aumentou a biodisponibilidade de NO, ou seja, a apocinina protege os animais dos efeitos nocivos provocados pela NADPH oxidase.

Reforçando essa linha de investigação, Aguado et al. (2013), analisaram se a exposição crônica ao HgCl_2 (29nM) afeta as propriedades funcionais das células do músculo liso vascular (VSMC) de artérias aortas de ratos Wistar, e se essas alterações estão envolvidas com o estresse oxidativo. Os ratos tratados com HgCl_2 apresentaram redução da espessura da parede vascular de artérias condutância, aumentaram o número de células musculares lisa e diminuíram o tamanho do núcleo dessas células. Além disso, também foi observado o aumento da produção de anion superóxido, e da atividade da NADPH-oxidase.

Como podemos observar nos artigos supracitados (Aguado et al. 2013; Wiggers et al. 2008; Furieri et al. 2011) o mercúrio é capaz de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, através da ativação da NADPH-oxidase e com isso promover vasoconstrição das artérias de condutância e resistências. Porém a NADPH-oxidase não é a única via de produção de

radicais livres, tão pouco de vasoconstrictores, sendo então necessária avaliação de outras vias, como a via da COX e SRA.

5.3.3 Participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta e mesentérica

Sabendo que a COX-2 pode estimular produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pela ativação da NADPH-oxidase, que a ROS é capaz de aumentar a atividade da COX-2, motivo pelo qual a COX é considerada uma fonte de anion superóxido (Korbecki et al. 2013; Martínez-Revelles et al. 2013; Hernanz et al. 2014), e que a COX pode alterar o sistema cardiovascular por meio dos prostanóides que atuam diretamente sobre o leito vascular, promovendo tanto a vasodilatação como a vasoconstrição (Antman et al., 2005), resolvemos investigar sua participação na alteração da reatividade vascular encontrada no presente estudo.

Para isso, nós incubamos os anéis de aorta com indometacina, e obtivemos uma redução da vasoconstrição induzida pela fenilefrina em ratos expostos a altas doses de cloreto de mercúrio, sem alterar a reatividade de anéis do grupo Controle e Baixa Exposição (15nM). Além disso, o grupo Alta Exposição (60nM) apresentou um aumento da expressão proteica da COX-2. Ao investigarmos esses efeitos em artérias mesentéricas, obtivemos os mesmos resultados, demonstrando que altas doses de mercúrio ativam a via dos prostanóides vasoconstrictores, o que colabora para o aumento da reatividade vascular.

Corroborando com nossos estudos, Peçanha et al. (2010) descreveram que a concentração de mercúrio abaixo (29nM) das utilizada no nosso grupo Alta Exposição (60nM) é capaz de aumentar a participação da COX-2 nas respostas vasoconstrictoras. Além disso, Lemos et al. (2012) observaram que a indometacina, NS 398 e furegrelato reduziram o efeito de baixas doses de cloreto mercúrio sobre a resposta contrátil à fenilefrina. Diante destes resultados, podemos sugerir que prostanóides vasoconstrictores, mais

especificamente o tromboxano A₂, está participando do aumento da reatividade à fenilefrina induzida pelo cloreto de mercúrio.

Outro fator vasoconstrictor que merece nossa atenção, por sua ligação com estresse oxidativo e a via da ciclooxigenase, é a angiotensina.

5.3.4 Participação do sistema renina angiotensina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de segmentos de artéria aorta

Em relação ao sistema renina-angiotensina, já está bem descrito a forte relação entre ativação de receptores AT₁ por angiotensina II e produção de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase, tanto em condições fisiológicas e fisiopatológicas (Briones e Touyz, 2010).

Por isso, investigamos a participação do sistema renina angiotensina nas respostas encontradas até o momento. Nossos resultados sugerem que, apenas no protocolo de alta exposição (60nM), houve um incremento na atividade do sistema renina-angiotensina, como vistos após inibição com losartan e enalapril em anéis de aorta e mesentérica do grupo Alta Exposição (60nM). Diante destes resultados, especulamos que a ativação do sistema renina angiotensina por cloreto de mercúrio no grupo Alta Exposição (60nM) em anéis de aorta e mesentérica provocaria o aumento da EROS e formação de prostanóides vasoconstrictores derivados da COX-2 e subsequente diminuição da biodisponibilidade da NO associada à hiper-reatividade vascular (Hu et al. 2002).

Fortalecendo nossos resultados, Peçanha et al. 2010 realizaram uma pesquisa cujo objetivo foi investigar se a exposição ao cloreto de mercúrio altera a produção de prostanóides contráteis derivados da ciclooxigenase-2 (COX-2) e a participação do sistema renina-angiotensina neste processo. Estes autores observaram que o tratamento com doses baixas de cloreto de mercúrio aumenta a liberação de prostanóides vasoconstrictores derivados da COX. Além disso, o grupo relata que a ativação aumentada do sistema renina-angiotensina após tratamento com mercúrio, encontrada no estudo, pode ser associado a este aumento da atividade da COX.

Corroborando com nossa pesquisa, Lemos et al. (2012) observaram que o HgCl_2 é capaz de aumentar a liberação de angiotensina II, e promover uma baixa regulação da expressão do receptor AT_1 .

Outra possível forma de explicar o significativo efeito observado no grupo Alta Exposição (60nM) tanto em aorta, quanto em mesentérica, é a capacidade da angiotensina II estimular a produção de anion superóxido. Para reforçar essa afirmação temos o estudo de Griending et al (1994), que examinou a capacidade de Angiotensina II em estimular a formação de anion superóxido. Eles observaram que em células musculares lisas tratadas com Ang II durante 4 a 6 horas, a angiotensina II provocou um aumento na formação do ânion superóxido intracelular sendo este o resultado da ativação de NADPH oxidase.

Corroborando com nossos resultados, que demonstram uma grande participação da COX-2 e do sistema renina angiotensina sobre a reatividade vascular do grupo Alta Exposição tanto em artéria aorta, quanto em artéria mesentérica temos o estudo de Hu et al. (2002) que investigaram a participação da COX-2 nas respostas celulares desencadeadas pela angiotensina II em cultura de células musculares lisas (VSMCs), e observaram que a angiotensina II através do receptor tipo 1 (AT_1), induziu o aumento da COX-2. Estes resultados sugerem que a angiotensina II aumenta a expressão e a atividade da COX-2, sugerindo uma possível ampliação dos efeitos da Ang II induzido pela COX-2.

Embora nenhuma diferença na pressão arterial tenha sido detectada em todas as condições de exposição utilizadas aqui, de alguma forma essas mudanças na reatividade vascular e função endotelial podem danificar órgãos vitais. Além disso, a pesquisa também apresentou evidências de que a exposição crônica de HgCl_2 , utilizando dose baixas em comparação a pesquisa realizada por Wiggers et al. (2008a), já evidenciaram alterações vasculares. Assim, nossos resultados sugerem fortemente a necessidade de uma atenção especial à exposição ao mercúrio, visto que mesmo em baixas concentrações, essa exposição pode estar associada ao aumento do risco cardiovascular.

5.4- Sumariação dos resultados



Figura VII: Sumariação esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. O tratamento i.m. com cloreto de mercúrio aumentou a reatividade vascular no Grupo Alta Exposição (60nM), reduziu a biodisponibilidade de NO, aumentou a atividade da NAPH oxidase, COX e do SRA em artéria aorta e mesentérica, já o grupo Baixa Exposição (15nM) teve aumento da biodisponibilidade de NO na artéria aorta, porém não teve alteração significativa em artérias mesentéricas de resistência.

VI CONCLUSÕES

Os grupos Alta (60nM) e Baixa Exposição (15nM) ao cloreto de mercúrio não promoveram alteração dos níveis de pressão arterial sistólica, mas alteraram a reatividade vascular promovendo aumento da resposta contrátil a fenilefrina no grupo Alta Exposição (60nM) em aorta e mesentérica, e reduzindo a resposta contrátil a fenilefrina no grupo Baixa Exposição (15nM) em anéis de aorta, sem alteração nas artérias mesentéricas, além de causar disfunção endotelial em segmentos de aorta para ambos os grupos, e em segmentos de artéria mesentérica para o grupo Alta Exposição;

A disfunção endotelial observada neste modelo experimental deve-se, mesmo que parcialmente, a redução da biodisponibilidade do NO causada pelo aumento da produção das espécies reativas de oxigênio produzidos pela NADPHoxidase no grupo Alta Exposição (60nM) em ambos os leitos vasculares; já a alteração encontrada no grupo Baixa Exposição (15nM) em artéria aorta se deve a um possível mecanismo compensatório.

Em conclusão, com estes resultados demonstramos que a exposição crônica a altas e baixas concentrações de HgCl_2 promovem alterações vasculares semelhantes em vasos de condutância e resistência e que essas alterações são concentrações dependentes.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for mercury. Washington (DC): ATSDR, Public Health Service, US Department of health and human services: 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pediatric/appendixb.html>. Acesso em : 10/05/2010).

Aguado A, Galán M, Zhenyukh O, Wiggers GA, Roque FR, Redondo S, Peçanha F, Martín A, Fortuño A, Cachofeiro V, Tejerina T, Salaices M, Briones AM. Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;268(2):188-200.

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

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

Alvarez, Y; Pérez-Giron, JV; Herranz, R; Briones, AM; García-Redondo, A; Beltrán, A; Alonso, MJ; Salaices, M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 321(1): 381-388, 2007.

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

Asano, S; Eto, K; Kurisaki, E; Gunji, H; Hiraiwa, K; Sato, M; Sato, H; Hasuike, M; Hagiwara, N; Wakasa, H. Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathol Int.*; 50(3):169-74,2000.

Azevedo BF, Futuro Neto HA, Stefanon I, Vassallo DV. Acute cardiorespiratory effects of intracisternal injections of mercuric chloride. *Neurotoxicology* 2011; 32(3):350-354.

Azevedo, FA. Toxicologia do Mercúrio. São Carlos: RiMa, 2003.

Bakir , F; Damluji, SF; Amin-Zaqi, L; Murtadha, N; Khalidi, A; al-Rawi, NY; Tikriti, S; Dahahir, HI; Clarkson, TW; Smith, JC; Doherty, RA. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181: 230-241, 1973.

Ballatori, N; Clarkson, TW. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam Appl Toxicol.* 5(5):816-31;1985.

Beal MF, Serial review: Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine.* 2002; 32(9): 797-803.

Beltrán, AE; Briones, AM; García-Redondo, AB; Rodríguez, C; Miguel, M; Alvarez, Y; Alonso, MJ; Martínez-González, J; Salaices, M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 27(1):142-54, 2009.

Berlin, M. Mercury. In: **Friberg, L; Nordberg, GF; Voulk, V.** Handbook on the toxicology of metals, 2nd, Amsterdam. Elsevier Science Publisher, 387-445; 1986.

Bevan, JA; Laher, I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J* 5: 2267-273, 1991.

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

Boffetta P, Sällsten G, Garcia-Gómez M, Pompe-Kirn V, Zaridze D, Bulbulyan M, Caballero J.D, Ceccarelli F, Kopal A.B, Merler E, 2001. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med.*58(7):461-6.

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

Briones AM and Touyz RM. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Curr Hypertens Rep.* 2010;12:135–142.

Burton, CA; Hatlelid, K; Divine, K; Carter, DE; Fernando, Q; Brendel, K; Gandolfi, AJ. Glutathione effects on toxicity and uptake of mercuric chloride and sodium arsenite in rabbit renal cortical slices. *Environ Health Perspec* 103 (Suppl. 1): 81-84, 1995.

Cai, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovas Res* 68: 26-36, 2005.

Cai, H; Harrison, DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidante stress. *Circ Res* 87: 840-844, 2000.

Carmignani M, Boscolo P, Artese L, Del Rosso G, Porcelli G, Felaco M, Volpe AR, Giuliano G. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of

chronic exposure to inorganic mercury in rats. *Br J Ind Med.* 1992; 49(4):226-32.

Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology.* 2008; 49: 134-140.

Clarkson TW. Molecular and ionic Mimicry of Toxic Metals. *Annu, Research Pharmacol. Toxicol.* 32:545-71, 1993.

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

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

Crackower, MAS; Sarao, R; Oudit, GY; Yagil, C; Kozieradzki, I; Scanga, SE; Oliveira-dos-Santos, AJ; Zhang, L; Pei, Y; Scholey, J; Ferrario, CM; Manoukian, AS; Chappel, MC; Backx, PH; Yagil, Y; Penninger, JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417: 822–828, 2002.

Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz M. Vascular smooth muscle cell NA(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *American Journal of Hypertension.* 2005; 18: 81-87.

Danilczyk, U; Penninger, JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res* 98: 463–471, 2006.

Davidge, ST. Prostaglandin H Synthase and Vascular Function. *Circ Res* 89: 650-660, 2001.

Davidson, PW; Myers, GJ; Weiss, B; Shamlaye, DF; Cox, C. Prenatal methyl mercury exposure from fish consumption and child development: a review of

evidence and perspectives from the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology* 27(6): 1106-1109, 2006.

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

Deschepper, CF. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int* 46:1561–1563, 1994.

Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.*2011;10(6):453-471.

Eide R, Wesenberg GR. Mercury contents of indicators and target organs in rats after long-term, low-level, mercury vapor exposure. *Environ Res.* 1993 ; May;61(2):212-22.

Ekino,S; Susa, M; Ninomiya, T; Imamura, K; Kitamura, T. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences*, 262: 131–144;2007

Environmental Protection Agency - USA. Mercury Study Report to Congress. U.S. Environmental Protection Agency; Washington, DC, 1997.

Farina M, Aschner M, and Rocha JBT. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 256, no. 1, pp. 405–417, 2011.

Félétou, M; Vanhoutte, PM. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, Were Are We Now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26: 1215-125, 2008.

Feliciano L, Henning RJ. Coronary artery blood flow: physiologic and pathophysiologic regulation. *Clin Cardiol* 1999; 22: 775-86.

Forstermann U, Closs EL, Pollock JS, Nakane M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-1131.

Freeman, EJ; Ruehr, ML; Dorman, RV. Ang II-induced translocation of cytosolic PLA₂ to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274(1Pt1): C282-288, 1998.

Funk, CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-1875, 2001.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*.1980; 288: 373-6.

Furchgott RF. The role of the endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. *Annual reviews Pharmacology and Toxicology* 1984; 24: 175 - 197.

Furieri LB, Fiorese M, Junior RFJ et al. Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 255, no. 2, pp. 193–199, 2011a.

Furieri LB, Fiorese M, Junior RFJ et al. “Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 255, no. 2, pp. 193–199, 2011b.

Ganther HE. Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 355, pp. 212–226, 1980.

Gao, L; Mann, GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signaling. *Cardiovasc Res* 82: 9-20, 2009,

García Pascual A, Labadía A, Jimenez E, Costa G. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K⁺ conductance. *British journal of pharmacology*. 1995; 115(7): 1221-1230.

Geisterfer, AA; Peach, MJ; Owens, GK. Angiotensin II induce hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62: 749–756, 1988.

Gilman, AG; Hardman, JG; Limbird, LE. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana Brasil; 2007.

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

Gómez, MG; Boffetta, P; Klink, JDC; Español, S; Quintana, JG; Colin, D. Mortalidad por cáncer en los mineros del mercurio *Gaceta Sanitaria*; 21: 210-217, 2007.

Graeme, AK; Pollack, CV. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine* 16(1): 45-56, 1998.

Griedling, K; Lassegue, B; Alexander, RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 281–306, 1996.

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

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

Griendling, KK; Sorescu, D; Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494–501, 2000.

Grizzo LT, Cordelline S. Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicol Sci* 2008; 103: 207-14.

Gu, D; Chen, J; Wi. X; Duan, X; Jones, DW; Huang, JF; Chen, CS; Chen, JC; Kelly, TN; Whelton, PK; He, J. Prehypertension and risk of cardiovascular disease in Chinese adults. *J Hypertens.* 2009; 27(4): 721-729

Guallar, EM. Sanz-Gallardo I, Van'T Veer P et al., Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction, *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 22, pp. 1747–1754, 2002.

Hackenthal, E; Ganten, PM; Taugner, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70: 1067–1116, 1990.

Hall, JE. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol* 24: 27–39, 2003.

Hamilton CA, Brosnam MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczack AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension.* 2002; 40: 755-762

Hansen, JC; Danscher, G. Organic mercury na environmental therat to the health of dietary-exposed societies? *Rev Environ Health;* 12(2): 107-116, 1997.

Harrinson DG, Gongora MC. Oxidtive stress and hyperension. *The Medical Clinicals and North America* 2009; 93: 621-635. Harrison R. Structure and

function of xanthine oxidoreductase: where are we now: *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 774-797.

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

Hernanz R, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. 2014; 126(2):111-21.

Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 1991; 266(34): 22789-91.

Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107(11): 1411-22.

Houser, MT; Milner, LS; Kolbeck, PC; Wei, SH; Stohs, SJ. Glutathione monoethyl ester moderates mercuric chloride-induced acute renal failure. *Nephron* 61: 449-455, 1992.

Houston, MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med.*; 13(2):S128-33; 2007.

HSDB – Hazardous Substances Data Bank. Mercury. In: Toxicology, occupational medicine and environmental series. 2004. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov>. Acesso em: 20/05/ 2010.

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

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

Hussain S., Rodgers, D. A., Duhart H. M., and Ali S. F. "Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain," *Journal of Environmental Science and Health—Part B*, vol. 32, no. 3, pp. 395–409, 1997.

Hylander LD, Meili M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Sci Total Environ.* 2003; 304(1-3):13-27.

Jaffe EA. Physiologic functions of normal endothelial cells. *Annals of New York Academy of Science* 1985; 454: 279-291.

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

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, J; Montagni, M; Koh, KK; Quon, MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: Molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113: 1888-1904, 2006.

Kobal AB, Horvat M, Prezelj M, Briski AS, Krsnik M, Dizdarevic T, Mazej D, Falnoga I, Stibilj V, Arneric N, Kobal D, Osredkar J. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol.* 2004; 17(4):261-74.

Griendling KK, Harrison D. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996; 97(8): 1916-1923.

Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol*. 2013; 64(4):409-21.

Lemos NB, Angeli JK, Faria TO, 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 (11): e49005.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of applied physiology* 2001; 91(3): 1421-1430.

Lindberg, SE; Bullock, OR; Ebinghaus, R; Engstron, DR; Feng, X; Fitzgerald, WF; Pirrone, N; Prestbo, E; Seigneur, C. A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio.*; 36: 19-32; 2007.

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

Magos L and Clarkson TW. Overview of the clinical toxicity of mercury. *Annals of Clinical Biochemistry*, vol. 43, no. 4, pp. 257–268, 2006.

Malmstrem C. Hanson M, Nylander M. Conference on Trace elements in Health and disease. Stockholm, 1992.

Mardini, IA; FitzGerald, GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a group class of anti-inflammatory drugs. *Mol Interv* 1: 30-38, 2001.

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

Martinez CS, Torres JG, Peçanha FM, Anselmo-Franci JA, Vassallo DV, Salaices M, Alonso MJ, Wiggers GA. 60-Day chronic exposure to low concentrations of HgCl₂ impairs sperm quality: hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats. *PLoS One*. 2014; 9(11):e111202

Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2013. 1;18(1):51-65.

Massaroni L, Oliveira EM, Stefanon I, Vassallo DV. Effects of Mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25: 861-864.

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

Massaroni, VJ; Johnson, TA, Gatti, PJ. Cardiotopic organization of the nucleus ambiguus? An anatomical and physiological analysis of neurons regulating Atrioventricular conduction. *Brain Research*, 679: 227-240, 1995.

Mayer B, Andrew P. Nitric oxide synthase: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358: 127-33, 1998.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension* 1999; 34: 539-545.

Mellander, S. Functional aspects of myogenic vascular control. *J Hypertens* 7: S21-S30, 1989.

Methaa, PK; Griending, KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82–C97, 2007.

Meyer, JW; Holland, JA; Ziegler, LM; Chang, MM; Beebe, G; Schmitt, ME. Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells: a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium* 1999. 7(1): 11–22.

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

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 2010; 450(6): 807-16.

Miller FJ, Gutterman DD, Rios DC, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in arterosclerosis. *Circulation Research.* 1998; 82:1289-1305.

Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990;70(4):921-961

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research* 1977; 41 (1): 19-26.

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

Ohnaka, K; Numaguchi, K; Yamakawa, T; Inagami, T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35(1Pt1): 68-75, 2000.

Omanwar S, Saidullah B, Ravi K, Fahim M. Modulation of vasodilator response via the nitric oxide pathway after acute methyl mercury chloride exposure in rats. *Biomed Res Int.*2013. 1-8.

Órourker, M. Arterial stiffne, systolic blood pressure, and logical treatment of arterial hipertencion. *Hipertencion.* 1990; 15:339-347.

Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195(2):539-44.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-6, 1988.

Passos CJ, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saude Publica.* 2008;24 Suppl 4:s503-20.

Pecanha FM, Wiggers GA, Briones AM et al. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 61, no. 1, pp. 29–36, 2010.

Persson, PB; Skälweit, A; Thiele, BJ. Controlling the release and production of renin. *Acta Physiol Scand* 181: 375–381, 2004.

Pestana MHD & Formoso MLL. Mercury contamination in Lavras do Sul, south Brazil: a legacy from past and recent gold mining. *The Science of the Total Environment*. 2003; 307: 125-40.

Quinn, SJ; Williams, GH. Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 50: 409–426, 1988.

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

Rhee HM and Choi BH. Hemodynamic and electrophysiological effects of mercury in intact anesthetized rabbits and in isolated perfused hearts, *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 50, no. 3, pp. 281–290, 1989.

Ross R. Growth regulatory mechanisms and formation of the lesions of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748:1-4.

Rossoni, LV; Cunha V; França, A; Vassallo, DV. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 34:887-892, 1999.

Rothenberg SE, Korrick SA, Fayad R. The influence of obesity on blood mercury levels for U.S. non-pregnant adults and children: NHANES 2007-2010. *Environ Res.*2015; 138C:173-180.

Sakamoto M, Kakita A, de Oliveira RB, Sheng Pan H, Takahashi H. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004; 152(2):171-176.

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

Smith, WL; Garavito, RM; DeWitt, DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157–33160, 1996.

Steckelings, UM; Kaschima, E; Unger, T. The AT2 receptor: a matter of love and hate. *Peptides* 26: 1401–1409, 2005.

Stefanska, J; Pawliczak, R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm* 2008. 2008: 1-10.

Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiothaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 139-155

.

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(17): 7773-7.

Su Jy and Chen W.J. The effects of methylmercury on isolated cardiac tissues, *American Journal of Pathology*, vol. 95, no. 3, pp. 753–764, 1979.

Suzuki, H; Motley, ED; Frank, GD; Utsunomiya, H; Eguchi, S. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3: 305–322, 2005.

Takeuchi, T; Eto, K; Kinjo, Y; Tokunaga, H. Human brain disturbance by methylmercury poisoning, focusing on the long-term effect on brain weight. *Neurotoxicology*; 17: 187-190, 1996.

Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*.2003; 42: 1075-1081.

Tinkov AA, Skalnaya MG, Demidov VA, Serebryansky EP, Nikonorov AA, Skalny AV. Hair mercury association with selenium, serum lipid spectrum, and gamma-glutamyl transferase activity in adults. *Biol Trace Elem Res*. 2014; 161(3):255-262.

Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv*. 2011;11(1):27-35.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004; 44(3):248-52.

Touyz, RM; Schiffrin, EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev* 52: 639–672, 2000.

Urakami-Harasawa L, Shimokava H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 1997; 100: 2793-2799.

Valko M, Rhodes JV, Moncol J, Izakovic M, and Mazur M, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, 2006.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120.

Vanhoutte PM, Félétou M. Existence of multiple endothelium-derived hyperpolarizing factor(s)?. In: Vanhoutte PM (ed.). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. The Netherlands, Harwood Academic Publishers 1999; 303-305.

Rizzetti DA, João Guilherme D. Torres, Alyne G. Escobar, Franck M. Peçanha, Francielli W. Santos, Robson L. Puntel, Maria J. Alonso, Ana M. Briones, Mercedes Salaices, Dalton V. Vassallo, Giulia A. Wiggers. Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low concentrations of Mercury. PLOS ONE 2013; 8(2):e55806.

Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. Nat Clin Pract Nephrol. 2006; 2(10):582-93.

Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM et al., "Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries, American Journal of Physiology, vol. 295, no. 3, pp. H1033–H1043, 2008a.

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

Williams, SP; Campbell, AK; Roszell, N; Myatt, L; Leikauf, GD; Rapoport, RM. Modulation of phorbol ester-induced contraction by endogenously released cyclooxygenase products in rat aorta. Am J Physiol 267: H1654-1662, 1994.

World Health Organization. Methyl Mercury. V. 101. International Programme on Chemical Safety. Geneva, Switzerland, 1990.

Wright, DH; Abran. D; Bhattacharya. M; Hou, X; Bernier, SG; Bouayad, A; Fouron, JC; Vázquez-Tello, A; Beauchamp, MH; Clyman, RI; Peri, K; Varma, DR; Chemtob, S. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1343-R1360, 2001.

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

Yee, S; Choi, BH. Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Exp Mol Pathol.*; 60(3):188-96, 1994.

Yu, D; Gordon, FJ. Anatomical evidence for a bi-neuronal pathway connecting the nucleus tractus solitarius to caudal ventrolateral medulla to rostral ventrolateral medulla in the rat. *Neuroscience Letters*, 205: 21-4, 1996.

Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev.*; 2(1):113-43, 2000.