

# **Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre os mecanismos de vasodilatação da aorta de ratos**

**Tatiani Botelho Nascimento**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas**

**Mestrado em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Julho de 2016

**Botelho, Tatiani Nascimento 1982**

**Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio sobre os mecanismos de vasodilatação de aorta de ratos [Vitória] 2016**

84 p., 29,7 cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2016)

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

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Leonardo dos Santos

1 Mercúrio; 2 aorta; 3 Reatividade vascular; 4 Endotélio; 5 canais para potássio

*Dedico este trabalho a minha mãe Ivany Botelho Nascimento, pelo amor e pelo esforço empreendido em toda a minha formação.*

*Aos meus irmãos Andreia Botelho Nascimento e Paulo Ricardo Botelho Nascimento pelo apoio e compreensão. Obrigada por caminharem comigo.*

*“Por esta causa dobro os joelhos em presença do Pai, ao qual deve a sua existência toda a família no céu e na terra, para que vos conceda, segundo seu glorioso tesouro, que sejais poderosamente robustecidos pelo seu Espírito em vista do crescimento do vosso homem interior. Que Cristo habite pela fé em vossos corações, arraigados e consolidados na caridade, a fim de que possais com todos os cristãos, compreender qual seja largura, o comprimento, a altura e a profundidade, isto é, conhecer a caridade de Cristo, que desafia todo o conhecimento, e sejais cheios de toda a plenitude de Deus. Àquele que, pela virtude que opera em nós, pode fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou entendemos”.*

*Efésios 3:14-20*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por derramar seu imenso amor na minha vida. Porque “O Senhor me protege de todo mal e guarda meus passos agora e sempre” (Sl 120).

Sei o quanto Deus precisou agir através de amigos durante essa caminhada, são verdadeiros anjos em minha vida, dedico a estes meu agradecimento.

Em especial aos meus orientadores:

Ao prof. Dr. Leonardo, que com todo cuidado me foi conduzindo a crescer, acreditando no meu potencial. Sempre serei grata pelas conversas e conselhos, por ter abraçado comigo este trabalho e ter permitido fazer parte da família “dos Santos”.

Ao querido prof. Dr. Dalton, agradeço pela orientação e oportunidade, e por me acolher de forma tão especial no laboratório.

Ao meu amigo Vinícius, parceiro de experimentos, agradeço pelas conversas, por dividir comigo todos os momentos da realização desse trabalho, mas principalmente pela amizade.

À Maylla, pela contribuição e disponibilidade na realização dos experimentos na Bioquímica e carinho de sempre.

As professoras Dra. Alessandra e Dra. Ivanita, por estarem sempre prontas para ajudar. Agradeço por me acolherem e por todo o carinho.

À Fabiana Simões, Jhuli Keli, Jonaina, Bruna Fernandes e Paula Rodrigues, vocês são presentes que recebi. Obrigada por me ouvir, pelo incentivo e pela amizade. Estarão sempre em meu coração.

À minha amiga Patrícia do Val Lima, que esteve comigo nos experimentos e está comigo na vida. Abriu seu coração para me receber, um coração que é do tamanho do mundo! Agradeço por compartilhar comigo o amor e a segurança da sua família e do seu lar.

Ao Bruno Jacobsen, que chegou já na reta final do meu mestrado, mas dedicou o seu carinho e atenção para me ajudar. Amigo querido, que felicidade conhecer você! Obrigada por estar ao meu lado e pelo cuidado que sempre tem comigo.

Aos amigos do LEMC, obrigada por todos os momentos que compartilhamos no dia-dia no laboratório. Pelas conversas, risadas e vida partilhada. Como não lembrar o acidente que me obrigou a ficar afastada do laboratório e o quanto senti falta de tudo isso. Mas ao mesmo tempo sentir vocês bem pertinho quando recebia visitas, mensagens, ligações amorosas e repletas de carinho. Não teria conseguido sem vocês!

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela dedicação e por compartilharem tantos conhecimentos.

Aos funcionários do PPGCF da UFES pela atenção e disponibilidade.

Aos meus queridos amigos que também fazem parte da minha família, agradeço imensamente porque sonharam e vibraram comigo.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1. Mercúrio: propriedades do metal, vias de exposição e intoxicação.....	15
1.2. Efeito do mercúrio no sistema cardiovascular.....	18
1.3. Papel do endotélio na função vascular.....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1. Animais experimentais.....	29
3.2. Modelo experimental.....	29
3.3. Método de estudo da reatividade vascular “in vitro” .....	30
3.4. Teste de viabilidade da preparação.....	32
3.5. Protocolos experimentais.....	33
3.5.1 Vasodilatação dependente do endotélio.....	33
3.5.2 Vasodilatação independente do endotélio.....	35
3.6. Conteúdo proteico para subunidade $\alpha$ 1 da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATP-ase.....	35
3.6.1 Detecção “in situ” de óxido nítrico.....	38
3.6.2 Detecção “in situ” de ânion superóxido.....	39
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>41</b>

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1. Relaxamento dependente e independente do endotélio.....	42
5.2. Mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio.....	43
5.3. Níveis de óxido nítrico e de ânion superóxido.....	47
5.4. Papel do NO sobre o relaxamento dependente de canais para potássio...	49
5.5. Papel do NO sobre o relaxamento dependente da ativação da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase.....	50
5.6. Expressão proteica da subunidade $\alpha_1$ da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase.....	52
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>8. REFERÊNCIA.....</b>	<b>63</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema mostrando alteração considerada precursora das doenças cardiovasculares. Flechas pontilhadas = redução da secreção; flechas espessas = aumento da secreção. (modificada de Rattmann, 2009).....21
- Figura 2.** Esquema mostrando a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (modificado de Rattmann, 2009) .....22
- Figura 3.** Aorta torácica imersa em placa de Petri com solução fria de Krebs após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo, sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3 a 4 mm. (Angeli, 2009).....30
- Figura 4.** Preparação de anéis (segmentos) de aorta para a avaliação da reatividade vascular “in vitro”. (modificado de Nunes, 2014 e foto de Angeli, 2009).....31
- Figura 5.** Registro representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (30 min permanecendo na tensão de  $1 \pm 0,1g$ ); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré- contração com fenilefrina ( $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  M) ou mais até atingir entre 50 e 60% do 2º KCl; J) Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}M$ ; L) Troca de solução Krebs-Henseleit e período de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (Marques, 2015) .....33

**Figura 6. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio no relaxamento vascular dependente e independente do endotélio de aorta.** A) Curva concentração-resposta a acetilcolina (ACh) e (B) nitroprussiato de sódio (NPS) em segmentos de aorta nos grupo  $\text{HgCl}_2$  (Hg) e controle (CT) pré-contraídos com fenilefrina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo CT por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.....42

**Figura 7. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio sobre os fatores derivados do endotélio na vasodilatação induzida pela acetilcolina.** Curvas concentração-resposta a acetilcolina (ACh) foram analisadas após a pré-incubação dos segmentos de aorta do grupo controle (CT) e grupo  $\text{HgCl}_2$  (Hg) com L-NAME (A e B), Ouabaína (OUA) (D e E) e TEA (G e H). A magnitude dos efeitos foi mensurada por meio das diferenças da área sob a curva (dAAC%) com e sem pré-incubação com L-NAME e Ouabaína. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  versus respectivo grupo sem intervenção, por ANOVA duas vias seguido pelo teste pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Teste t de Student não pareado para comparação da dAAC% (C e F)). O número de animais está indicado entre parênteses.....44

**Figura 8. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio sobre o papel dos subtipos de canais de potássio na vasodilatação à acetilcolina.** Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), foram construídas com ou sem pré-incubação com iberiotoxina (IbTX) (A e B), apamina (AP) (C,D), e 4-aminopiridina (E ,F) em segmentos de aorta de grupo controle (CT) e  $\text{HgCl}_2$  (Hg). A magnitude dos efeitos foi mensurada por meio das diferenças da área sob a curva (dAAC%) com e sem pré-incubação com 4-aminopiridina (4-AP). Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  versus respectivo grupo sem intervenção, por ANOVA duas vias seguido pelo teste pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Teste t de Student não pareado para comparação da dAAC% (G). O número de animais está indicado entre parênteses.....45

**Figura 9. Papel do estresse oxidativo, sistema renina-angiotensina local e COX na vasodilatação após a intoxicação por mercúrio.** Curvas concentração-resposta a acetilcolina (ACh) foram analisados após a pré-incubação dos segmentos de aorta nos grupos HgCl<sub>2</sub> (Hg) e controle (CT) com tiron (TIR) (A e B), enalapril (ENA) (C e D) e Indometacina (INDO) (E e F). Os resultados são expressos como média ± EPM. \*P <0,05 respectivo grupo versus sem intervenção, por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.....47

**Figura 10. Efeito da exposição crônica ao mercúrio na produção e/ou biodisponibilidade de NO nos segmentos da aorta.** Microfotografias de fluorescência representando (ampliação original x 400) secções de aorta marcadas com o corante fluorescente (NO sensível) 4,5 diaminofluoreceim (DAF-2) a partir do grupo controle (CT) e o grupo HgCl<sub>2</sub> (Hg). Gráfico de barras que mostra a análise semi-quantitativa da produção de NO. Os dados são expressos em média ± EPM da densidade de fluorescência. \* P<0,05 em relação grupo CT pelo teste *t* de Student. O número de animais utilizados é indicado entre parêntese.....48

**Figura 11. Efeito da exposição crônica ao mercúrio na produção de ânion superóxido.** Microfotografias de fluorescência de secções (ampliação original x 400) da aorta marcadas com (DHE) e análise quantitativa de produção e/ou biodisponibilidade O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Os resultados são expressos como média ± EPM. \*P <0,05 pelo teste *t* de Student quando comparados grupos CT e Hg. As médias da intensidade de fluorescência representadas no gráfico de barras.....49

**Figura 12. Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre o papel dos canais para potássio mediada por NO e por EROs na vasodilatação.** Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) foram construídas com ou sem pré-incubação TEA em segmentos de aorta do grupo controle (CT) e HgCl<sub>2</sub> (Hg). No grupo de Hg, o relaxamento com NPS também foi testada após incubação com tiron (TIR) (A e B) ou co-incubação com TEA (C). Os resultados são expressos

em média  $\pm$  EPM. \*P<0,05 respectivo grupo versus sem intervenção por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O número de animais está indicado entre parênteses.....50

**Figura 13. Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre o papel da ativação mediada por NO da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase na vasodilatação.** Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) foram construídas com ou sem pré-incubação com ouabaína (A, B). A magnitude dos efeitos foi mensurada por meio das diferenças da área abaixo da curva (dAAC%) com e sem pré-incubação com Ouabaína (OUA). Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM. \*P<0,05 respectivo grupo versus sem intervenção por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas (A-B); teste *t* de Student não pareado para comparação da dAAC% (C) . O número de animais está indicado entre parênteses.....51

**Figura 14. Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre a expressão proteica da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase na vasodilatação.** O teor de proteína da isoforma  $\alpha$ 1 de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase foi avaliada por transferência Western e medido como densidades ópticas integradas das bandas . Anti- $\alpha$ -actina foi utilizado como um controle de carga interna. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM. \*P<0,05 pelo teste *t* de Student não pareado para comparação entre os grupos.....52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

3,5 - Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

3'5'- Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)

4,5-diaminofluoresceína (DAF-2)

5'-trifosfato de adenosina (ATP)

Acetilcolina (ACh)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Angiotensina II (Angio II)

Ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

Canais para potássio dependentes de cálcio ( $K_{Ca}$ )

Canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ )

Canais para potássio ativados por cálcio de intermediária condutância ( $IK_{Ca}$ )

Canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância ( $BK_{Ca}$ )

Canais para potássio voltagem dependentes ( $K_v$ )

Canais para potássio retificadores ( $K_{ir}$ )

Ciclooxigenase (COX)

Controle (CT)

Cloreto de potássio (KCl)

Cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ )

Concentração intracelular de  $Ca^{+2}$  [ $Ca^{+2}$ ]<sub>i</sub>

Diacilglicerol (DAG)

Dihidroetídio (DHE)

Enalapril (ENA)

Endotelina (ET)

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Guanilato ciclase solúvel (GCs)

Guanosina trifosfato (GTP)

Indometacina (INDO)

Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)

Músculo liso vascular (MLV)

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (NKA)

N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Nitroprussiato de sódio (NPS)

NO sintase (NOS)

Óxido nítrico (NO)

Ouabaina (OUA)

Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Peroxinitrito (OONO<sup>-</sup>)

Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)

Prostaglandinas H<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub> (PGH<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>)

Proteína quinase C (PKC)

Proteína quinase dependente de AMPc (PKA)

Radical hidroxila (HO<sup>·</sup>)

Receptor de angiotensina II do subtipo 1 (AT<sub>1</sub>)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/Zn SOD)

Tetraetilamônio (TEA)

Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)

## RESUMO

Sugere-se que a exposição crônica ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) causa disfunção endotelial devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio, de vasoconstritores e redução de óxido nítrico (NO), sendo assim, pessoas expostas apresentam maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares. O NO induz vasodilatação por diferentes vias, e pouco se sabe sobre a participação dos canais para potássio e da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nesta condição de toxicidade pelo mercúrio. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos crônicos do  $\text{HgCl}_2$  com doses elevadas na resposta vasodilatadora dependente da ativação de alguns fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio. Material e Métodos: ratos Wistar foram divididos em grupos controle (CT, salina i.m.);  $\text{HgCl}_2$  (1ª dose de 10,86  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , e doses subsequentes diárias de 0,014  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  durante 30 dias, i.m.). A reatividade vascular de segmentos de aorta a acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio foram avaliados na presença de L-NAME, tiron, indometacina, enalapril, Ouabaína, TEA, 4-aminopiridina, iberiotoxina ou apamina. A exposição a uma dose elevada de  $\text{HgCl}_2$  reduziu a vasodilatação dependente do endotélio. Essa alteração envolve uma redução da biodisponibilidade de óxido nítrico associada ao aumento da EROs, o aumento da atividade da ECA e provavelmente de prostanóides da via da COX. Foi também sugerido que essa redução do óxido nítrico diminui a ativação dos canais para potássio como os  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  e  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ , além de reduzir a ativação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase no relaxamento estimulado pela acetilcolina. Apesar disso, houve o aumento da expressão da subunidade  $\alpha$  da bomba de sódio, indicando um provável mecanismo compensatório a esta reduzida ativação. Nossos resultados reforçam ainda mais as evidências de que a exposição ao mercúrio crônica é deletério para a função vascular. Acreditamos que a compreensão desse mecanismos da vasodilatação prejudicada deverá permitir o desenvolvimento de novas abordagens de diagnóstico e estratificação do risco cardiovascular, bem como pesquisas futuras destinadas a intervenções terapêuticas em intoxicação mercúrio.

**Palavras-chave:** mercúrio, aorta, reatividade vascular, endotélio, canais para potássio



## ABSTRACT

It is suggested that chronic exposure to mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) causes endothelial dysfunction associated with increased vasoconstriction due to reactive oxygen species (ROS) and reduced nitric oxide (NO) bioavailability. Thus,  $\text{HgCl}_2$ -exposed people are at increased risk of developing cardiovascular disease. NO induces vasodilatation by different pathways, and little is known about the participation of potassium channels and  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase for mercury intoxication. The objective of this study was to evaluate the chronic effects of high doses of  $\text{HgCl}_2$  in the vasodilatation dependent on activation of some hyperpolarizing factors derived from the endothelium. Methods: Wistar rats were divided into control (CT, saline i.m.);  $\text{HgCl}_2$  (1st dose 10.86 mg/kg daily, and subsequent doses of 0.014 mg/kg for 30 days i.m.). Vascular reactivity of aortic segments to acetylcholine and sodium nitroprusside were evaluated in the presence of L-NAME, tiron, indomethacin, enalapril, ouabain, TEA, 4-aminopyridine, iberiotoxin or apamin. Exposure to  $\text{HgCl}_2$  reduced the endothelium-dependent vasodilatation. This alteration involves a reduction of the bioavailability of NO associated with increased ROS, increased ACE activity and probably COX pathway prostanoids. Furthermore, it was suggested that the reduction of NO decreases activation of BKCa and SKCa potassium channels. Similarly, reduced NO was responsible for the impaired activation of  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase during ACh-induced relaxation, although there was an increased expression of its  $\alpha$ -subunit, indicating a compensatory mechanism. These observations reinforce further evidence that chronic mercury exposure is deleterious to the vascular function. We believe that the understanding of the mechanisms of the impaired vasodilatation should allow the development of new approaches for diagnosis and cardiovascular risk stratification, as well as future researches aimed at therapeutic interventions in mercury intoxication.

**Key words:** Mercury, aortic, vascular reactivity, endothelial, potassium channel

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Mercúrio: propriedades do metal, vias de exposição e intoxicação

O mercúrio é um metal pesado encontrado naturalmente no meio ambiente. Além disso, ele é um elemento estável que não pode ser degradado ou destruído, mas pode passar por transformações de uma espécie química para outra (WHO, 2010). Em relação a essas espécies temos o mercúrio metálico ou elementar, o orgânico e o inorgânico (CGVAM & Ministério da Saúde, 2010). Quando mercúrio se combina com elementos como o cloro, enxofre ou oxigênio são formados compostos de mercúrio inorgânico, também conhecido como sais mercuriosos e mercúricos. Mas se a combinação for com o elemento carbono, são formados os compostos de mercúrio orgânico (metilmercúrio, etilmercúrio, fenilmercúrio) (OPAS/OMS, 2011).

Este metal é derivado de várias fontes naturais como emissões de gases na crosta terrestre, atividade vulcânica e erosão. Mas existem diversas fontes artificiais de atividades humanas que incluem indústria nos setores de mineração (exploração mineral e refino de metal), indústrias (fabricação de papel, plástico, eletrônica, medicamentos, lâmpadas fluorescentes) (OPAS/OMS, 2011), tintas, pesticidas, fungicidas, cosméticos, além do uso em amálgamas dentárias (UNEP, 2013). O timerosal, um conservante de vacina a base de mercúrio é usado desde os anos 30 para reduzir a contaminação por fungos e bactérias. Devido a grande quantidade de vacinas que compõe o esquema vacinal de crianças, nos anos 80 e

90 no EUA houve uma significativa exposição ao mercúrio (aproximadamente 200 microgramas nos primeiros seis meses de vida), que foi acompanhada de forte suspeita de estar relacionada a problemas neurológicos (Marques, 2008). Atualmente, nos EUA e Europa, quase todas as vacinas administradas em crianças são isentas de timerosal. No Brasil, o ministério da saúde publicou em 2001 a resolução nº 528, que suspende a venda de produtos a base de timerosal, incluindo o mertiolate (Marques, 2008). Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) também proibiu o uso desse composto por seu risco de toxicidade. Entretanto, apesar da OMS reconhecer que não existe nível seguro para o mercúrio, ainda recomenda o uso de timerosal como conservante de vacina, o qual continua sendo utilizado em vários países, incluindo o Brasil. (Prado et al., 2004; Marques, 2008). A Vigilância em Saúde do trabalhador e Saúde Ambiental do Ministério da Saúde, afirma o risco de exposição humana a vapores de mercúrio vindos de lâmpadas quebradas em áreas industriais, comerciais, residenciais e rurais, alcançando níveis acima do limite de tolerância para o ambiente de trabalho definido na NR 15 (CGVAM e Ministério da Saúde, 2010).

Além da exposição ocupacional, acidentes ambientais levaram a alguns casos de intoxicação por mercúrio e fizeram despertar grande preocupação em relação a este metal. Um caso icônico aconteceu no Japão na década de 1950, onde o despejo de dejetos industriais com grande quantidade de metilmercúrio resultou na contaminação da Baía de Minamata (WHO, 2010). Outro acidente aconteceu no Iraque na década de 1970, onde o uso do metilmercúrio como fungicida para tratamento de grãos levou ao envenenando de pessoas que

consumiram pão feito com o trigo contaminado. Das 6.530 pessoas com intoxicação hospitalizadas, 459 morreram (WHO, 2010).

Todas as formas do mercúrio são consideradas tóxicas e não possuem função fisiológica para o organismo (OPAS/OMS, 2011). Este metal pode estimular a produção de radicais livres, e interagir com grupos sulfidríla (Clarkson, 1972; Omotayo et al., 2011) que são essenciais para a função de enzimas, canais iônicos e receptores (Abramson & Salama, 1989; Vassallo et al., 2011). Após o íon de mercúrio se ligar em grupos celulares ricos em radicais sulfidríla, pode alterar os sistemas enzimáticos e metabólicos da célula (OPAS/OMS, 2011). De maneira interessante, esse complexo protéico formado permite ao mercúrio mobilidade através dos tecidos (Micaroni et al., 2000). Outro fator que facilita a sua passagem aos tecidos é sua característica de lipossolubilidade (Micaroni et al., 2000). Nos diferentes tecidos, o mercúrio tem a habilidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) incluindo o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e inibir ou reduzir as defesas antioxidantes (Lerman et al., 2001; Brandão et al., 2008). Isso caracteriza um estado de estresse oxidativo aumentado, visto que esse estado é definido como o desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, predominando os pró-oxidantes (Rahman et al., 2006)

Muitos estudos mostram os efeitos tóxicos do mercúrio causando danos em diversos sistemas (Bluhm et al., 1992; Carmignani et al., 1992; Nesovic-Ostojic et al., 2008; Farina et al., 2011; Mello-Carpes et al., 2013; Martinez et al., 2014). Durante o período de desenvolvimento, a exposição ao mercúrio e outros poluentes ambientais podem resultar em danos irreversíveis ao sistema nervoso

central, imunológico e reprodutor, além de danos sobre os padrões comportamentais e habilidades motoras (Rice & Barone, 2000). No sistema nervoso está relacionado ao desenvolvimento de doença degenerativa e distúrbios no cérebro em desenvolvimento (Mutter et al., 2004). A contaminação por metilmercúrio, por exemplo, tem conseqüências como retardo mental, paralisia cerebral, e destruição neuronal (Clarkson & Magos, 2006; Guzzi & La Porta, 2008). No sistema reprodutor feminino a exposição ao mercúrio inorgânico causa aborto espontâneo, malformação congênita, infertilidade, alteração do ciclo menstrual, além de inibir a ovulação (Schuurs, 1999). E tem a capacidade de se acumular em testículos e próstata (Jackson et al., 2011). O mercúrio é capaz de gerar reações autoimunes que causam lesão glomerular e dano tubular renal (Belghiti et al., 1986). E alterações hepáticas que levam a casos de hepatite, edema e necrose (Azevedo, 2003). No sistema respiratório o mercúrio elementar causa edema, congestão pulmonar, bronquiolite e fibrose pulmonar (Azevedo, 2003). Além disso, o mercúrio provoca diminuição de anticorpo humoral, fixa em ácidos desoxirribonucléicos, causando alterações cromossômicas e anomalias congênitas (OPAS/OMS, 2011). Além dos danos sobre todos esses órgãos e sistemas, o mercúrio afeta também, e de forma importante, o sistema cardiovascular (Houston, 2007; Vassallo et al., 2011).

## 1.2. Efeito do mercúrio no sistema cardiovascular

De fato, indivíduos expostos ao mercúrio apresentam um maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares (Salonen et al., 1995). Em animais de

experimentação, a exposição a baixas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  prejudicou o relaxamento do ventrículo esquerdo e reduziu a função da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (Furieri et al, 2011a). Além disso, a exposição aguda com baixas doses de  $\text{HgCl}_2$  é capaz de provocar aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca de ratos (Machado et al., 2007). Corações de ratos expostos agudamente a altas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  apresentam arritmias, alteração na condução átrio-ventricular, redução da pressão sistólica e do desenvolvimento de força (Massaroni et al., 1992; Vassallo et al., 1999). Por outro lado, Assis et al (2003) reportou que a exposição aguda a 20 nM de  $\text{HgCl}_2$  em corações isolados e perfundidos pela técnica de Langendorff, promoveu aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo.

No que tange ao sistema vascular, o mercúrio afeta a reatividade vascular e isso parece estar relacionado aos efeitos sobre o endotélio (Wiggers et al., 2008a; Wiggers et al., 2008b; Peçanha et al., 2010; Giuberti, 2010). Essas alterações incluem aumento de radicais livres e da produção de angiotensina pela enzima conversora de angiotensina (ECA) local (Vassallo et al., 2011). De maneira importante, o aumento do estresse oxidativo causado pela exposição ao mercúrio é uma das causas de disfunção endotelial, algo que também é observado em doenças cardiovasculares como a hipertensão, aterosclerose carotídea (Salonen et al., 2000; Houston et al., 2007), infarto agudo do miocárdio e doença arterial coronariana (Vassallo et al., 2011; Houston et al., 2007). Em consequência, a hiperatividade vascular pode ser associada a aumento resistência vascular, efeitos do mercúrio de fato encontrados em vasos arteriais de diferentes sítios (Wiggers et al., 2008a; Peçanha et al., 2010). Por último, mas não menos importante, as

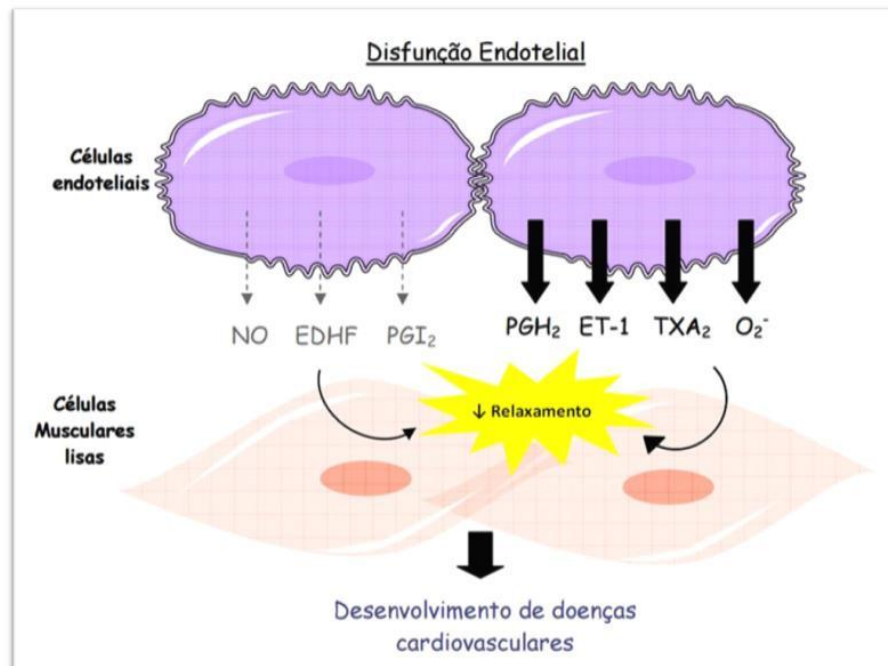
artérias basílicas também são afetadas pela exposição ao mercúrio, que mesmo em baixa concentração pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento de vasoespasmos cerebrais proposto por Wiggers et al (2016). Como exposto, no sistema cardiovascular o principal efeito do mercúrio está no endotélio, que sabidamente ocupa papel essencial para sua homeostase do tônus vascular.

### 1.3. Papel do endotélio na função vascular

O endotélio libera substâncias importantes para o tônus vascular, controlando não só o fluxo sanguíneo, mas também participando do controle das respostas inflamatórias e imunológicas (Rubanyi, 1993). O endotélio possui também ações antioxidantes, anti-inflamatória, inibição da adesão e migração de leucócitos, da proliferação de células musculares lisas, da agregação e adesão plaquetária quando em seu funcionamento normal (Förstermann, 2006). Assim, na alteração de sua função endotelial, denominada disfunção endotelial, podem ocorrer inúmeros eventos incluindo a perda na resposta vasodilatadora dependente do endotélio devido à redução da produção e/ou biodisponibilidade dos seus fatores (Maturana et al., 2007). Como resultado, essa alteração aumenta o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares como Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial, Insuficiência Cardíaca Congestiva, Aterosclerose e Hipertensão Pulmonar (Triggle et al., 2003; Melo et al., 2004).

Em relação a essas substâncias, produzidas pelo endotélio, temos o óxido nítrico (NO) (Furchgott & Zawadzki, 1980), o fator hiperpolarizante derivado do

endotélio (EDHF) (Taylor & Weston, 1988; Félétou & Vanhoutte, 1999) e a prostaciclina (Bunting et al., 1976; Moncada et al., 1977; Vanhoutte, 1993) como fatores de ação vasodilatadora (Figura 1). Com relação aos agentes vasoconstrictores temos como principais fatores a angiotensina II (Kifor & Dzau, 1987), a endotelina-1 (Yanagisawa et al., 1988), os prostanoídes derivados do ácido araquidônico como o tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) (Frolich & Forstermann, 1989; Vanhoutte, 1993) e as prostaglandinas  $H_2$  e  $F_{2\alpha}$  (PGH<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), e o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Furchgott, 1983; Rubanyi & Vanhoutte, 1986) (Figura 1).

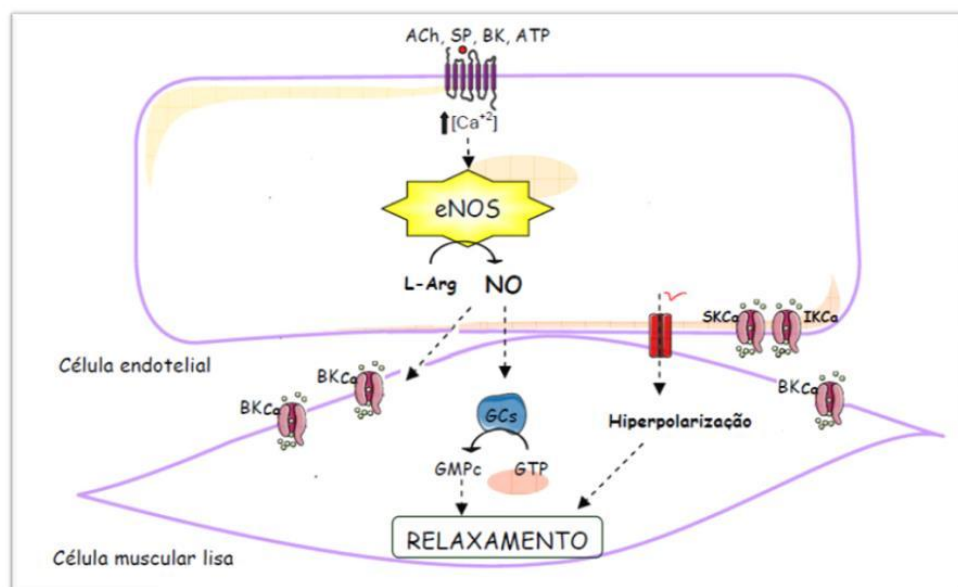


**Figura 1:** Esquema mostrando alteração considerada precursora das doenças cardiovasculares. Flechas pontilhadas= redução da secreção; flechas espessas=aumento da secreção. (modificada de Rattmann, 2009).

O NO é uma molécula gasosa, um radical livre com elétron desemparelhado e meia-vida de 4 a 8 segundos (Moncada et al., 1989) e possui livre difusão nas membranas biológicas (Palmer et al., 1987). O relaxamento



promovido pelo NO no músculo liso vascular envolve (Figura 2): ativação da enzima guanilato-ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP em GMPc, ativando a proteína quinase G (PKG). Esta, ativa canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ , estimula a recaptação de  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático, fosforila a cadeia leve da miosina (tornando-a menos sensível ao  $Ca^{2+}$ ), além de aumentar a saída do  $Ca^{2+}$  pelo trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (Rapoport & Murod, 1983; Ignarro & Kadowitz, 1985; Lincoln et al., 2001). A redução da função do NO pode dever-se a diminuição em sua síntese ou pelo aumento de sua degradação, por exemplo pelo estresse oxidativo aumentado, e esse parece ser o principal mecanismo da disfunção endotelial (Pepine, 2009). As EROs podem reduzir o NO endotelial por inativação direta, quando esse reage com ânion superóxido, formando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Gao e Mann, 2009), ou por reduzir a expressão e a atividade da sua sintase endotelial (eNOS) mudando seus substratos ou co-fatores (De Gennaro Colonna et al., 2009).



**Figura 2:** Esquema mostrando a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (modificado de Rattmann, 2009).

A exposição crônica ao  $\text{HgCl}_2$  e em baixas concentrações causa disfunção endotelial, que pode ser secundária ao aumento do estresse oxidativo e dos prostanoídes contráteis da via da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), aumentando a resposta contrátil à fenilefrina (Wiggers et al., 2008a; Peçanha et al., 2010; Furieri et al., 2011b). Concentração micromolares ao  $\text{HgCl}_2$  agudamente estimula vasoconstricção e reduz a resposta vasodilatadora dependente do endotélio (da Cunha et al., 2000; Vassallo et al., 2011). E exposição crônica com baixa concentração de mercúrio em ratos aumenta a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) local e a atividade da COX (Peçanha et al., 2010) e, além disso, aumenta a atividade da ECA no plasma e coração (Giuberti, 2010).

Ainda em relação à função endotelial, os EDHF possuem importante papel na modulação do tônus vascular, porque promovem a vasodilatação por hiperpolarização das células do músculo liso vascular ao ativarem canais para potássio ativados por cálcio e a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Félétou & Vanhoutte, 2006). Os canais para potássio participam do potencial de membrana de células excitáveis, regulando a contratilidade muscular e controle do tônus vascular (Nelson e Quayle, 1995). Esses canais são estimulados por NO,  $\text{PGI}_2$ , substância P, bradicinina, peptídeo natriurético tipo C,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , potássio, pelos metabólicos da via do ácido araquidônico-lipoxigenases e da via do ácido araquidônico-citocromo P450 (ácidos epoxieicosatrienóicos, EETs) (Félétou & Vanhoutte, 2006), o que permite o efluxo de  $\text{K}^+$  e hiperpolarização da célula ao reduzir o potencial de membrana (Nelson e Quayle, 1995). A hiperpolarização da célula fecha canais de cálcio dependentes de voltagem e promove o relaxamento do músculo liso vascular (Coleman et al., 2004). Por outro lado, quando esses canais são inibidos,

ocorre uma redução do efluxo de  $K^+$ , abre canais de cálcio, aumenta o potencial de membrana e leva a despolarização e vasoconstrição (Coleman et al., 2004).

Em relação aos diversos subtipos de canais para potássio encontrados nas células endoteliais e do músculo liso vascular podemos destacar os canais para potássio voltagem dependentes ( $K_v$ ), canais para potássio ativados por cálcio ( $K_{Ca}$ ) de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ), intermediária ( $IK_{Ca}$ ) e alta condutância ( $BK_{Ca}$ ), canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e canais para potássio retificadores ( $K_{IR}$ ) (Jackson, 2005).

Os canais  $BK_{Ca}$  são os mais abundantes no músculo liso vascular e podem ser ativados por  $[Ca^{+2}]_i$ , por despolarização (Jackson, 2005), monócito de carbono (CO), PKA e PKG (Félétou & Vanhoutte, 2006). O NO e outros vasodilatadores aumentam o AMPc e GMPc e ativam os  $BK_{Ca}$ , direta ou indiretamente (Archer et al., 1994). Os  $BK_{Ca}$  são inibidos por hiperpolarização, diminuição do  $[Ca^{2+}]_i$  e PKC (Félétou & Vanhoutte, 2009). As espécies reativas de oxigênio modulam de forma negativa a atividade dos  $BK_{Ca}$  em doenças cardiovasculares (Félétou & Vanhoutte, 2009).

Já os canais  $SK_{Ca}$  são canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância, expressos em neurônios, epitélio, endotélio vascular e vários tipos de músculo liso, mas pouco expresso em músculo liso vascular (Ledoux et al., 2006). Este canal pode ser ativado pelo aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  e a sua inibição acontece com a diminuição do  $[Ca^{+2}]_i$ , sendo importante ressaltar que isso acontece independente do potencial de membrana (Ledoux et al., 2006; Félétou & Vanhoutte, 2009). Um dos mecanismos propostos para explicar como a ativação

dos  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$  nas células endoteliais culminam na hiperpolarização das células do músculo liso vascular são os seguintes: a hiperpolarização da célula endotelial é transmitida diretamente para o músculo liso vascular através de gap junctions; acúmulo de  $K^+$  intracelular a partir das células endoteliais pela abertura dos  $K_{Ca}$ , induzindo hiperpolarização do músculo liso através da ativação de  $K^+$  e/ou  $Na^+K^+$ -ATPase (Féléto & Vanhoutte, 2006).

Os canais  $K_v$  são encontrados na membrana do músculo liso vascular e são ativados por despolarização da membrana (Sobey, 2001). Sua função envolve a limitação da despolarização e a manutenção do potencial de repouso da membrana celular (Sobey, 2001). A proteína quinase A (PKA) dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e o NO via GMPc estão envolvidos na ativação dos  $K_v$  (Nelson & Quayle, 1995). Por outro lado a proteína quinase C (PKC) e o aumento da concentração de cálcio intracelular inativa esses canais (Sobey, 2001; Jackson, 2005).

Ainda sobre fatores hiperpolarizantes, a  $Na^+K^+$ -ATPase é uma proteína integral encontrada nas células e tem como função manter os gradientes de concentração dos íons  $Na^+$  e  $K^+$  elevados, permitindo que ocorra despolarização e repolarização. É uma proteína importante para a regulação do volume celular, tônus vascular, crescimento e diferenciação celular, concentração de cálcio, pH e influência em transportes secundários (Vassalle, 1987; Skou & Esmann, 1992; Blaustein, 1993; Pritchard et al., 2010). É constituída por subunidades alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ) (Cortes et al., 2006). A subunidade alfa possui 4 isoformas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ ) e possui sítios de ligação para  $Na^+$ ,  $K^+$ , ATP e compostos digitálicos (Dostanic-Larson et al., 2006). A isoforma  $\alpha_1$  se distribui amplamente pela

membrana plasmática de neurônios, astrócitos, células epiteliais e miócitos (Dias, 2011). Na verdade é expressa em quase todos os tecidos, mas é predominante nos rins (Dostanic-Larson et al., 2006). Possui alta afinidade ao  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , mas baixa afinidade à ouabaína (um composto digitálico) em comparação as outras isoformas (Arnon et al., 2000). As isoformas  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  estão presentes em neurônios e miócitos (Xie & Cai, 2003), sendo que a  $\alpha_2$  é bastante encontrada no músculo esquelético, coração, cérebro adipócitos, olhos e alguns outros tecidos (Dostanic-Larson et al., 2006). A ativação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase em artérias de mamíferos pode envolver o GMPc (Ferrer et al; 1995). Dessa maneira, o NO por aumentar a concentração de GMPc nas células musculares lisas (Ferrer et al., 1995), ativa a PKG, que fosforila várias proteínas e promove o relaxamento do MLV, não só por reduzir a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ignarro e Kadowitz, 1985), mas também por ativar a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase e hiperpolarizar a célula. Além disso, há ainda a hipótese de que o NO pode ativá-la diretamente para promover o relaxamento vascular (Gupta et al., 1994). Estudos mostram que a retirada do endotélio de fato inibe a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, e que a inibição desta enzima está associada a disfunção endotelial, mostrando a importância do endotélio como modulador de sua atividade (Rossoni et al., 2003; dos Santos et al., 2003). De fato, alterações na atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase têm sido associadas a doenças cardiovasculares, renais, neurológicas e metabólicas (Biver et al., 1990). Embora a exposição ao mercúrio sabidamente promova alteração na atividade de algumas ATPases tais como a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase e Ca-ATPase em alguns sítios (Clarkson, 1972;Patrick, 2006), nada fora descrito a respeito dos efeitos do mercúrio sobre a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase vascular.

Apesar do conhecimento dos efeitos prejudiciais do mercúrio, esse elemento continua sendo utilizado em diversos componentes do cotidiano. Portanto, continua sendo imprescindível avaliar seus efeitos, uma vez que, a literatura tem mostrado diversos problemas causados por este metal em vários sistemas e em diferentes concentrações. No sistema cardiovascular encontramos efeitos deletérios como hipertensão, aterosclerose e infarto agudo do miocárdio e isso parece ser explicado, pelo menos em parte, pela redução do NO e o aumento de ânion superóxido. Todavia, até o presente momento não foi relatado o efeito dessa redução de NO sobre fatores hiperpolarizantes, como canais para potássio e Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase de forma funcional e mais detalhada, nem os mecanismos envolvidos na vasodilatação arterial em animais intoxicados por esse elemento. Dessa forma, o presente estudo pretendeu analisar a reatividade vascular *in vitro* em segmentos de aorta em um modelo de intoxicação crônica por HgCl<sub>2</sub>, com o intuito de mostrar que essa intoxicação também pode prejudicar a ativação desses fatores hiperpolarizantes como moduladores do tônus vascular, ou como mecanismos compensatórios à redução de óxido nítrico.

## 2.1 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da intoxicação crônica ao cloreto de mercúrio sobre a resposta vasodilatadora de aorta de ratos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição ao mercúrio sobre a resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio
- Avaliar os efeitos da exposição ao mercúrio sobre a participação do óxido nítrico na vasodilatação endotélio-dependente
- Avaliar os efeitos da exposição ao mercúrio na participação das espécies reativas de oxigênio, do sistema renina-angiotensina local e da ciclooxigenase na resposta vasodilatadora endotélio-dependente
- Verificar a participação da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, dos canais para potássio ativados por cálcio e dos canais para potássio voltagem dependentes na resposta vasodilatadora após exposição crônica ao mercúrio.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais experimentais

Em nossa análise experimental utilizamos ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultos, pesando entre 300-350g. Os ratos foram cedidos pelo biotério do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas sobre condições controladas de temperatura e ciclo de claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. Todos os experimentos foram conduzidos em concordância com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2013) e foram aprovados pela Comissão de Ética Institucional da Universidade Federal de Espírito Santo (CEUA-UFES 039/2014)

#### 3.2. Modelo experimental

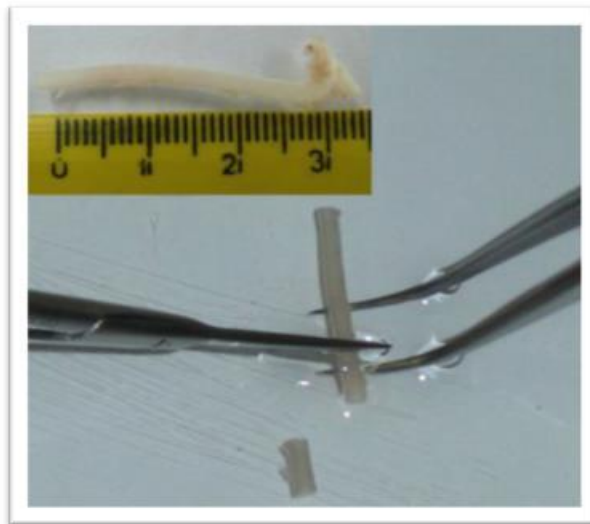
Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: no grupo controle os ratos receberam solução salina (NaCl 0,9%) via intramuscular (*i.m*) e no grupo exposto ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) receberam uma 1ª dose, chamada dose de ataque: 10,86  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  e doses subsequentes de 0,014  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ , chamadas dose de manutenção, também via intramuscular durante os 30 dias de exposição. Essas doses de manutenção foram calculadas de acordo com a quantidade estimada de excreção diária e com o peso dos animais. A dose e o cálculo utilizado neste estudo foram baseados segundo o protocolo experimental desenvolvido por Wiggers et al (2008a), sendo



ajustada para 2,5x mais alta a fim de estudar os efeitos da intoxicação pelo mercúrio, e não simplesmente uma exposição leve.

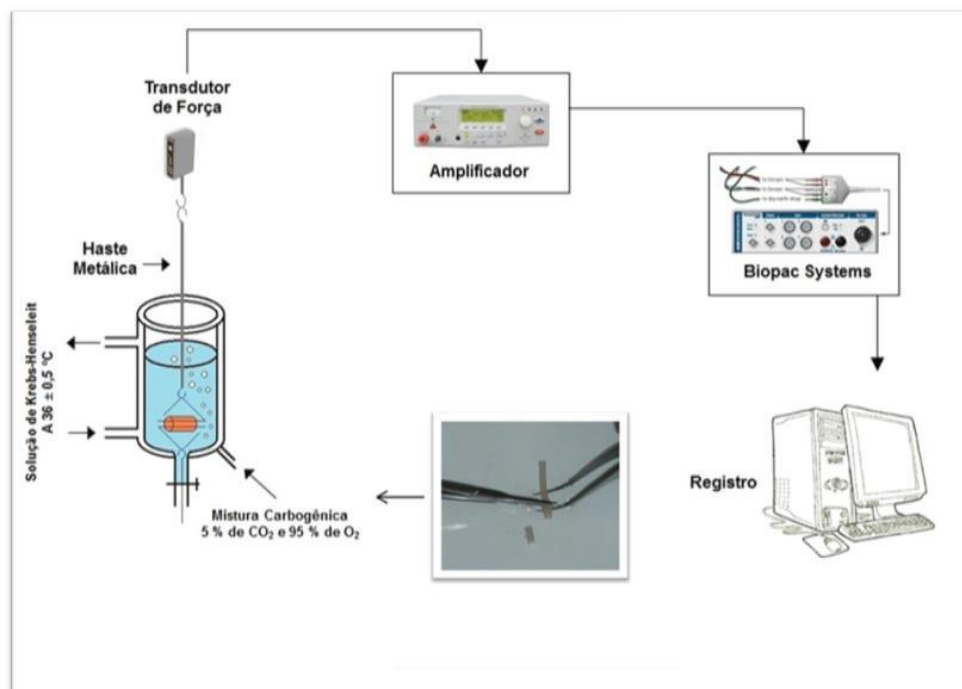
### 3.3. Método de estudo da reatividade vascular “*in vitro*”

Após 30 dias de exposição, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2g/Kg), via intraperitoneal e eutanaziados. A aorta torácica descendente foi removida e imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs–Henseleit composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> .2H<sub>2</sub>O 2,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17; NaHCO<sub>3</sub> 24; Glicose 11; EDTA 0,01). A aorta foi manipulada para a retirada do tecido conectivo e adiposo, e dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento (Figura 3).



**Figura 3:** Aorta torácica imersa em placa de Petri com solução fria de Krebs após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo, sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3 a 4 mm. (Angeli, 2009).

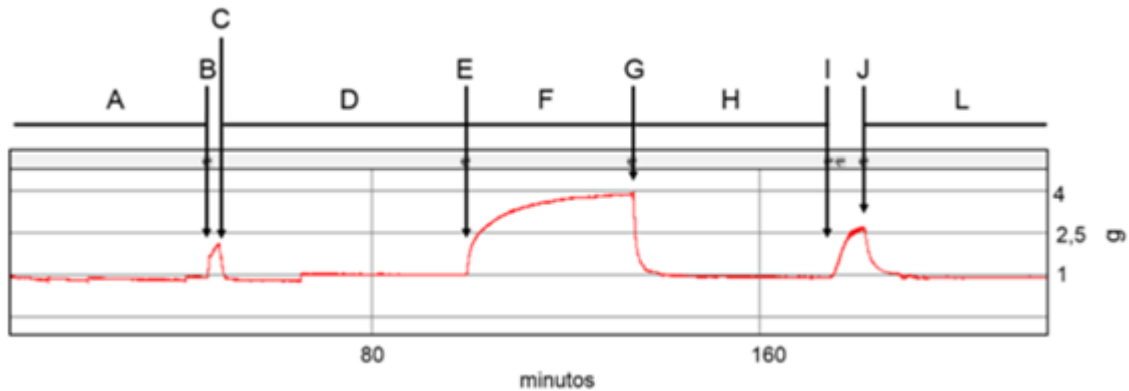
Dois fios de aço em forma de triângulos foram colocados através do lúmen dos segmentos vasculares para que ficassem paralelos. Cada segmento vascular foi colocado em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs–Henseleit, mantida aquecida a 37°C e gaseificada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), mantendo o pH estável em 7,4. Um fio foi fixado na base da cuba e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Para mensurar a tensão isométrica foi utilizado um transdutor de força (TSD125C, CA, USA) conectado em um sistema de aquisição de dados (MP100A, BIOPAC System, Inc., Santa Barbara, USA) (Figura 4). Em seguida a montagem, os segmentos vasculares foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 grama. Sempre que necessário, a tensão era reajustada durante os 30 minutos de estabilização (Figura 5A).



**Figura 4:** Preparação de anéis (segmentos) de aorta para a avaliação da reatividade vascular “in vitro”. (modificado de Nunes, 2014 e foto de Angeli, 2009)

### 3.4. Teste de viabilidade da preparação

Após esse período de estabilização, foi verificado a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização utilizando o KCl (75 mM). Ao atingirem a variação de 1 grama de força a partir do valor basal os segmentos eram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit para retornarem ao basal (Figura 5B,C) Os segmentos que não atingiram tal contração foram descartados. Foi aguardado outro período de 30 minutos de estabilização (Figura 5D), e uma segunda dose KCl (75mM) era adicionada ao banho para estabelecer a contração máxima do músculo liso vascular, aferida no tempo de 30 minutos, que é o tempo necessário para atingir um platô na contração (Figura 5E,F). Após, os segmentos foram lavados três vezes para retornarem ao valor basal.



**Figura 5:** Registro representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (30 min permanecendo na tensão de  $1 \pm 0,1$ g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina ( $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  M) ou mais até atingir entre 50 e 60% do 2º KCl; J) Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$ M; L) Troca de solução Krebs-Henseleit e período de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (Marques, 2015).

### 3.5. Protocolos experimentais

#### 3.5.1. Vasodilatação dependente do endotélio

Em seguida a avaliação da integridade funcional do endotélio, os segmentos vasculares foram lavados três vezes com a troca da solução de Krebs-Henseleit. E a função vasodilatadora dependente do endotélio foi avaliada por meio do relaxamento induzido por acetilcolina. Para isso, os segmentos vasculares foram contraídos com fenilefrina ( $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  M) até atingir de 60 a 80% da contração do KCl. Após atingirem um platô, foram realizadas curvas concentração-reposta à acetilcolina ( $10^{-11}$  a  $10^{-4}$  M).

A partir deste momento, todos os protocolos de reatividade vascular, foram realizados da mesma forma: Após verificar a viabilidade dos segmentos vasculares o fármaco utilizado era incubado por 30 minutos.

Para avaliar a função do óxido nítrico sobre a resposta a acetilcolina em relação aos efeitos da exposição ao  $\text{HgCl}_2$  utilizou o  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME 100  $\mu\text{M}$ ), um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

A fim de investigar a participação do SRA local e das espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido) na resposta a acetilcolina, utilizamos o Enalapril (ENA, 10  $\mu\text{M}$ ), inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) e Tiron, um “varredor” de ânion superóxido.

Com o objetivo de estudar a influência dos prostanóides derivados da ciclooxigenase (COX), utilizamos incubação com Indometacina (Indo, 10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor não seletivo da COX.

Com a finalidade de avaliar a participação dos EDHF, utilizamos a ouabaína (100  $\mu\text{M}$ ), um inibidor da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Além disso, estudamos também a participação de subtipos de canais para potássio. Para isso, realizamos incubações com tetraetilamônio (TEA, 1mM), um inibidor não específico dos canais para potássio ativados por cálcio ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) (Vanhoutte,2001); a 4-aminopiridina (4-AP, 5 mM), inibidor seletivo dos canais para  $\text{K}^+$  voltagem dependentes ( $\text{K}_v$ ); a iberiotoxina (IbTx, 30 nM), inibidor seletivo dos canais para  $\text{K}^+$  ativados por cálcio de larga condutância ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) e apamina (Apa 0,5 $\mu\text{M}$ ), inibidor seletivo dos canais para  $\text{K}^+$  ativados por cálcio de baixa condutância ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ).

### 3.5.2. Vasodilatação independente do endotélio

Em outros segmentos arteriais, foram realizadas curva concentração resposta independente do endotélio utilizando o nitroprussiato de sódio (NPS  $10^{-11}$  a  $10^{-4}$  M), doador de óxido nítrico. Similar à acetilcolina, a pré-contracção foi com fenilefrina.

Avaliamos a participação dos  $K_{Ca}$  utilizando o tetraetilamônio (TEA, 1mM). E como a presença das EROs interfere na biodisponibilidade de NO, e este também participa da ativação dos  $K_{Ca}$ , verificamos a vasodilatação independente do endotélio na presença do TEA (1 mM) e (Tiron 1 mM). Verificamos também a resposta independente do endotélio em relação à função da  $Na^+K^+$ -ATPase utilizamos a ouabaína (100 $\mu$ M).

### 3.6. Conteúdo proteico para subunidade $\alpha_1$ da $Na^+K^+$ -ATPase

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da exposição crônica ao  $HgCl_2$  sobre a expressão proteica em artéria aorta. Foi medida a expressão proteica da subunidade alfa-1 da NKA. As amostras foram preparadas utilizando segmento de aorta de ambos os grupos. Os órgãos eram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a  $-80^\circ C$  até o momento em que foram utilizados. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização das amostras, em temperatura de  $4^\circ C$ , com tampão de homogeneização

contendo: Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO<sub>3</sub> (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 era recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, foi feita a quantificação das proteínas pelo método de Lowry (Peterson, 1977). Determinou-se a densidade óptica medindo a absorbância num espectrofotómetro multi-canal a  $\lambda = 750$  nm (Cary, Varian). Para a quantificação, foi realizada uma diluição da amostra (1:25). Em seguida foram aliquotados os volumes para uma carga de 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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 7,5% (acrilamida 40%, Tris HCl 1,5 M (pH = 8,8), SDS 10%, persulfatoamônico (APS) 10% e Temed), juntamente com um marcador de peso molecular de amplo espectro (6 a 180 kDa), previamente imersos em uma cuba contendo tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %), que é um eletrólito com alta capacidade de tamponamento, sendo submetidas à eletroforese aplicando corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) durante aproximadamente 2 horas. Isto promoveu a separação das proteínas no gel.

Após o término da eletroforese as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK) previamente

ativada com água durante 20 segundos. Para isso, o gel, a membrana e papel Whatman (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) foram colocados em um sistema “sanduíche”. O método realizado foi o de transferência líquida na qual o sanduíche era montado em suporte Holder Cassete e acoplado à uma cuba (Trans-Blot SD CellBio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 % e Metanol 20 %) à 8° C com uma corrente de 60 V por 2 horas.

Uma vez transferidas às proteínas, as membranas foram deixadas durante uma hora a temperatura ambiente em agitação contínua com uma solução de bloqueio para evitar uniões inespecíficas do anticorpo. Esta solução de bloqueio continha 5 % de leite desnatado em pó, dissolvida em solução de lavagem das membranas: 10 mM de Tris-HCl a pH = 7,5; 100 mM de NaCl; e 0,1 % Tween-20 (TBS-T). Em seguida, também sob agitação constante, as membranas foram incubadas por toda a noite a 4 °C com os anticorpos primários para a  $\alpha_1$  NKA (anticorpo monoclonal de rato, 1:500, Millipore, San Francisco, U.S.A.),  $\alpha$ -actina (anticorpo monoclonal de rato anti- $\alpha$ -actina, 1:5000, Sigma Chemical, CO, St. Louis, USA), diluídos em solução à 5 % de leite desnatado em pó ou 5 % de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,5).

Uma vez finalizada a incubação com os anticorpos primários, foram feitas três lavagens sucessivas de dez minutos cada, com uma solução TBS-T, para eliminar os restos do anticorpo primário que não se uniram.

À continuidade, as membranas foram incubadas durante uma hora, a temperatura ambiente e agitação contínua, com o correspondente anticorpo



secundário conjugado com peroxidase de rabanete: anticorpo IgG anti-camundongo (1:5000; StressGen Bioreagent Corp., Victoria, Canada).

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).

Os imunocomplexos foram detectados por reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 min a um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham™, GE Healthcare, UK). As membranas, então, foram expostas a autorradiografia (Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, EUA / Hyperfilm, Amersham™, 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 escaneados. Os dados de expressão proteica da proteína ( $\alpha_1$  NKA) foram expressos como razão da expressão proteica da  $\alpha$ -actina, usadas como controle de carga. O programa ImageJ foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

### 3.6.1 Detecção “in situ” de óxido nítrico

A produção de NO foi determinada usando a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), um método descrito previamente e ajustado a partir de outros estudos (Kojima et al., 1998; Lobato et al., 2011). Após isolamento e dissecação, as aortas foram

imersas em solução tampão de Krebs-HEPES (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0,24 MgCl<sub>2</sub>, 8,3 HEPES, e 11 glicose, pH 7.4) com 30% de sacarose durante uma hora, a seguir foram embebidas em meio de inclusão para cortes com criostato (Killik ®, Easy Path) e mantidas em -80°C até o momento de realização dos cortes.

As secções de aorta foram cortadas em criostato a 10 µm de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DAF-2. As lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas em idênticas condições a 37° C por 30 min com tampão fosfato (0,1 M) contendo CaCl<sub>2</sub> (0,45M). As lâminas foram secadas e incubadas durante 30 min a 37°C em câmara úmida protegida da luz com 8 µM de DAF diluído em solução tampão fosfato contendo CaCl<sub>2</sub>. Imagens digitais foram coletadas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500 com a objetiva de 40x e câmera Leica DFC 310 X, usando a mesma configuração de imagem para controle e grupo exposto ao HgCl<sub>2</sub>. Para quantificação, 5 segmentos da aorta por animal foram utilizados para obter a média amostral. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software Image J.

### 3.6.2 Detecção “in situ” de ânion superóxido

A fluorescência oxidativa ao dihidroetídio (DHE) foi utilizada para avaliar a produção de ânion superóxido “in situ”, e os procedimentos se seguiram como previamente descritos (Nunes et al., 2014). A membrana celular é permeável ao

hidroetídio, e na presença de  $O_2^-$ , esse componente é oxidado a brometo de etídio, que intercala com o DNA. Brometo de etídio é excitado a 546 nm e emite luz a 610 nm.

Após isolamento e dissecação, as aortas foram imersas em eppendorf contendo solução tampão de Krebs-HEPES com 30% de sacarose durante uma hora, a seguir foram embebidas em meio de inclusão para criostato e mantidas em  $-80$  até o momento de realização dos cortes. As secções de aorta foram cortadas com criostato em 10  $\mu$ m de espessura e colocadas em lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DHE. No dia do protocolo as lâminas foram mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas com tampão Krebs-HEPES, em idênticas condições por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Foram então secadas e incubadas com solução tampão de Krebs-HEPES contendo DHE (2  $\mu$ M) em câmara úmida e protegida da luz, à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. Após este período as lâminas foram montadas com meio de montagem (Erv-Mount, EasyPath) e lamínula. As imagens das secções de aorta foram detectadas com microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500) usando filtro 568 nm, no aumento de 100x e fotografadas com a câmera acoplada ao microscópio (Leica DFC 310 FX). Para quantificação, 5 segmentos da aorta por animal foram utilizados para obter a média amostral. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software ImageJ.

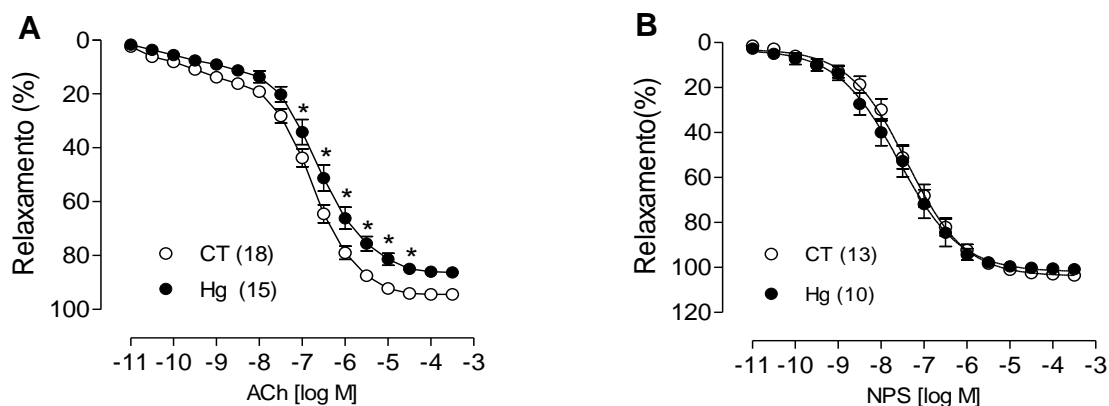
#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As respostas contráteis à fenilefrina foram normalizadas pela contração máxima induzida por KCl (75 mM) e expressa em porcentagem desta. As respostas vasodilatadoras à ACh e NPS foram expressas como porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração à fenilefrina. Alguns resultados foram expressos com as diferenças na área abaixo da curva (dAAC) para comparar a magnitude do efeito promovido pelas incubações com os inibidores das vias estudadas. As diferenças foram analisadas por teste *t*, ANOVA de uma ou duas vias seguidas por teste de Bonferroni, quando necessário.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Relaxamento dependente e independente do endotélio.

A vasodilatação em resposta a ACh foi reduzida no grupo mercúrio (Figura 6A). Todavia, o relaxamento independente do endotélio, avaliado pela curva concentração-resposta ao NPS, um doador de óxido nítrico, foi semelhante em ambos os grupos (Figura 6B).

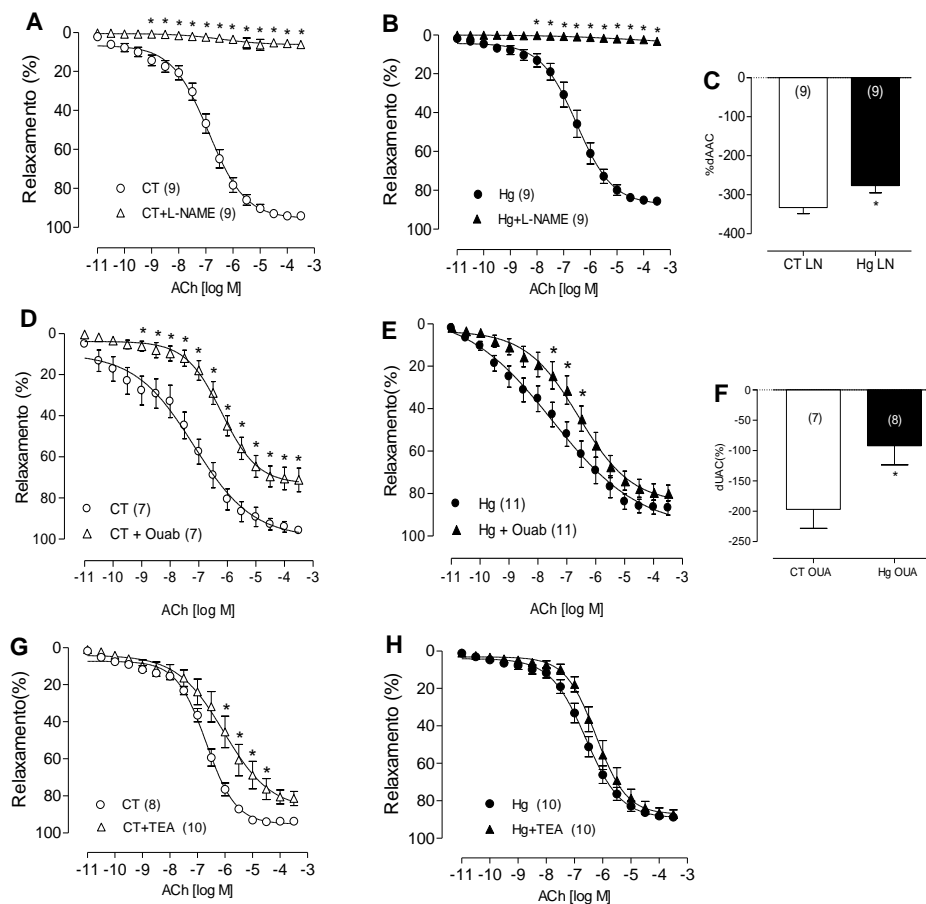


**Figura 6. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio no relaxamento vascular dependente e independente do endotélio de aorta.** A) Curva concentração-resposta a acetilcolina (ACh) e (B) nitroprussiato de sódio (NPS) em segmentos de aorta nos grupo  $\text{HgCl}_2$  (Hg) e controle (CT) pré-contraídos com fenilefrina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo CT por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

## 5.2. Mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada indiretamente pela redução do relaxamento à ACh, na presença de um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, o L-NAME (100  $\mu$ M). Esse inibidor aboliu o relaxamento em ambos os grupos, controle e HgCl<sub>2</sub> (Figura 7A e 7B). Todavia, ao avaliar a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAAC) , é demonstrado que a redução da reatividade à ACh foi menor grupo HgCl<sub>2</sub> (Figura 7C).

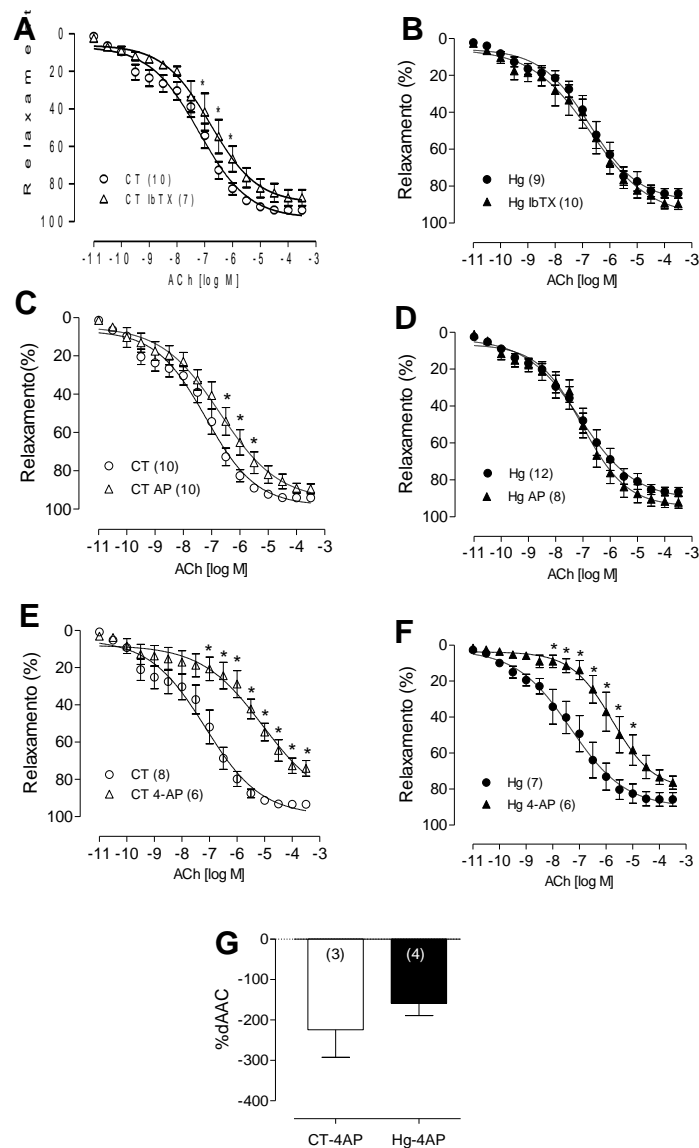
Para estudar a participação dos K<sub>Ca</sub>, utilizamos o bloqueador não seletivo TEA. A presença do TEA mostra redução do relaxamento no grupo CT (Figura 7G), porém não modificou a resposta vasodilatadora no grupo HgCl<sub>2</sub> (Figura 7H). E para avaliar participação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, utilizamos a Ouabaína, um inibidor que reduziu o relaxamento em ambos os grupos (Figura 7D e 7E). Entretanto, ao avaliar a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAAC), observamos uma redução de maior magnitude no grupo HgCl<sub>2</sub> (Figura 7F).



**Figura 7. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio sobre os fatores derivados do endotélio na vasodilatação induzida pela acetilcolina.** Curvas concentração-resposta a acetilcolina (ACh) foram analisadas após a pré-incubação dos segmentos de aorta do grupo controle (CT) e grupo  $\text{HgCl}_2$  (Hg) com L-NAME (A e B), Ouabaína (OUA) (D e E) e TEA (G e H). A magnitude dos efeitos foi mensurada por meio das diferenças da área sob a curva (dAAC%) com e sem pré-incubação com L-NAME e Ouabaína. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  versus respectivo grupo sem intervenção, por ANOVA duas vias seguido pelo teste pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Teste t de Student não pareado para comparação da dAAC% (C e F)). O número de animais está indicado entre parênteses.

E ao analisar os subtipos de canais, utilizando iberiotoxina, apamina para inibir os  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  e  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ , respectivamente, mostramos redução da resposta também somente no grupo CT (Figura 8A e C), sem efeitos no  $\text{HgCl}_2$  (Figura 8B e D). Ao utilizar a 4-aminopiridina, para os canais de  $\text{K}_v$ , mostramos que em ambos os grupos o bloqueio seletivo do  $\text{K}_v$  promoveu igual efeito inibidor sobre a

vasodilatação à ACh (Figura 8E e 8F), como também é mostrado quando avaliamos a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAAC) (Figura 8G).

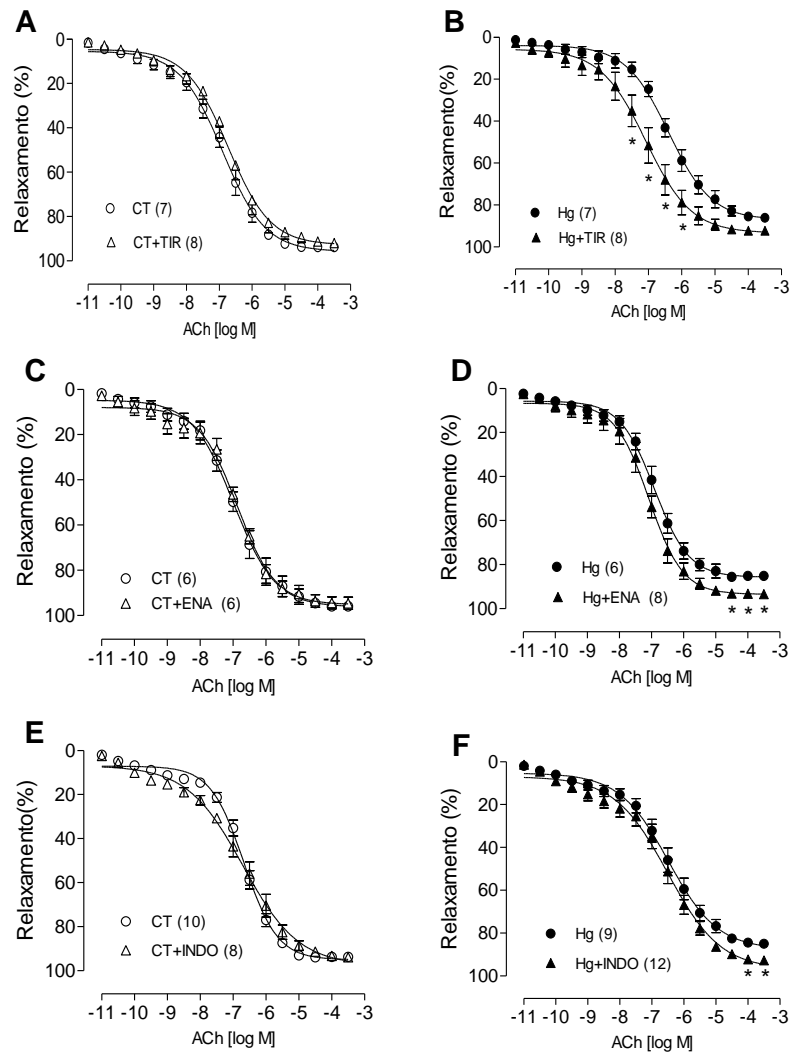


**Figura 8. Efeitos da exposição crônica ao mercúrio sobre o papel dos subtipos de canais de potássio na vasodilatação à acetilcolina.** Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), foram construídas com ou sem pré-incubação com iberiotoxina (lbTX) (A e B), apamina (AP) (C,D), e 4-aminopiridina (E ,F) em segmentos de aorta de grupo controle (CT) e HgCl<sub>2</sub> (Hg). A magnitude dos efeitos foi mensurada por meio das diferenças da área sob a curva (dAAC%) com e sem pré-incubação com 4-aminopiridina (4-AP). Os resultados são expressos em média ± EPM. \* P <0,05 versus respectivo grupo sem intervenção, por ANOVA duas vias seguido pelo teste pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Teste t de Student não pareado para comparação da dAAC% (G). O número de animais está indicado entre parênteses.



A participação das EROs, como o ânion superóxido, foi verificada com o uso do tiron (1mM). Na presença do tiron não houve alteração na resposta vasodilatadora à ACh no grupo controle (Figura 9A), mas melhorou a resposta no grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  (Figura 9B).

Também investigamos a participação da ECA na resposta à ACh utilizando o enalapril, um inibidor dessa enzima. A presença do enalapril melhorou a resposta no grupo  $\text{HgCl}_2$  (Figura 9D) sem alterar a resposta no grupo controle (Figura 9C). O mesmo comportamento foi notado no protocolo que teve como objetivo avaliar a participação da ciclooxigenase, em que utilizamos a indometacina. No grupo controle, a presença da indometacina não alterou a resposta vasodilatadora à ACh (Figura 9E), mas melhorou o relaxamento no grupo  $\text{HgCl}_2$  (Figura 9F).

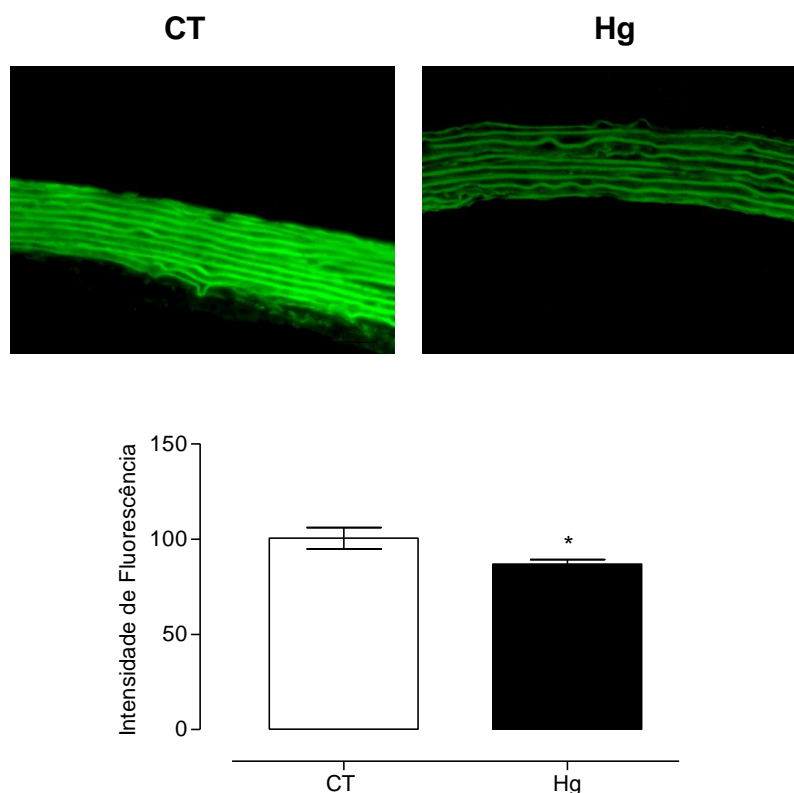


**Figura 9. Papel do estresse oxidativo, sistema renina-angiotensina local e COX na vasodilatação após a intoxicação por mercúrio.** Curvas concentração-resposta a acetilcolina (ACh) foram analisados após a pré-incubação dos segmentos de aorta nos grupos  $\text{HgCl}_2$  (Hg) e controle (CT) com tiron (TIR) (A e B), enalapril (ENA) (C e D) e Indometacina (INDO) (E e F). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  respectivo grupo versus sem intervenção, por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

### 5.3. Níveis de óxido nítrico e de ânion superóxido

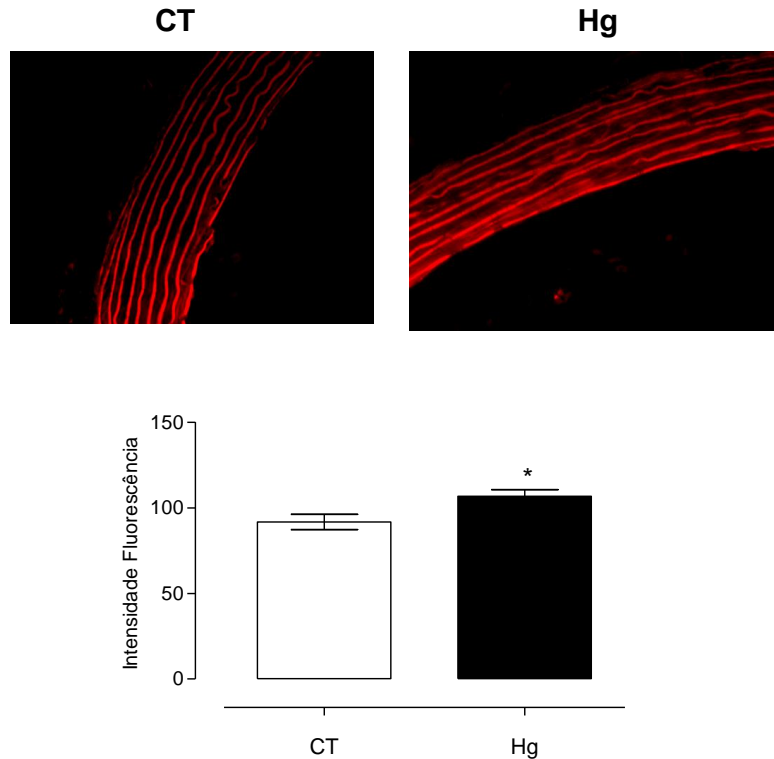
Para confirmar essa menor biodisponibilidade de NO nos protocolos de reatividade vascular após exposição ao mercúrio nas doses utilizadas no presente estudo, utilizamos uma técnica de detecção “in situ” de NO, utilizando o 4,5-

diaminofluoresceína (DAF). Como mostrado na figura (10) o grupo  $\text{HgCl}_2$  apresentou redução da fluorescência em relação ao CT.



**Figura 10. Efeito da exposição crônica ao mercúrio na produção e/ou biodisponibilidade de NO nos segmentos da aorta.** Microfotografias de fluorescência representando (ampliação original x 400) secções de aorta marcadas com o corante fluorescente (NO sensível) 4,5 diaminofluoreceim (DAF-2) a partir do grupo controle (CT) e o grupo  $\text{HgCl}_2$  (Hg). Gráfico de barras que mostra a análise semi-quantitativa da produção de NO. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM da densidade de fluorescência. \*  $P < 0,05$  em relação grupo CT pelo teste *t* de Student. O número de animais utilizados é indicado entre parêntese.

O protocolo para determinar a produção *in situ* de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  foi constituído pela incubação com DHE. Como observado na figura (11), a detecção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  está aumentada em segmentos de aorta de ratos expostos ao  $\text{HgCl}_2$  quando comparados ao grupo CT.

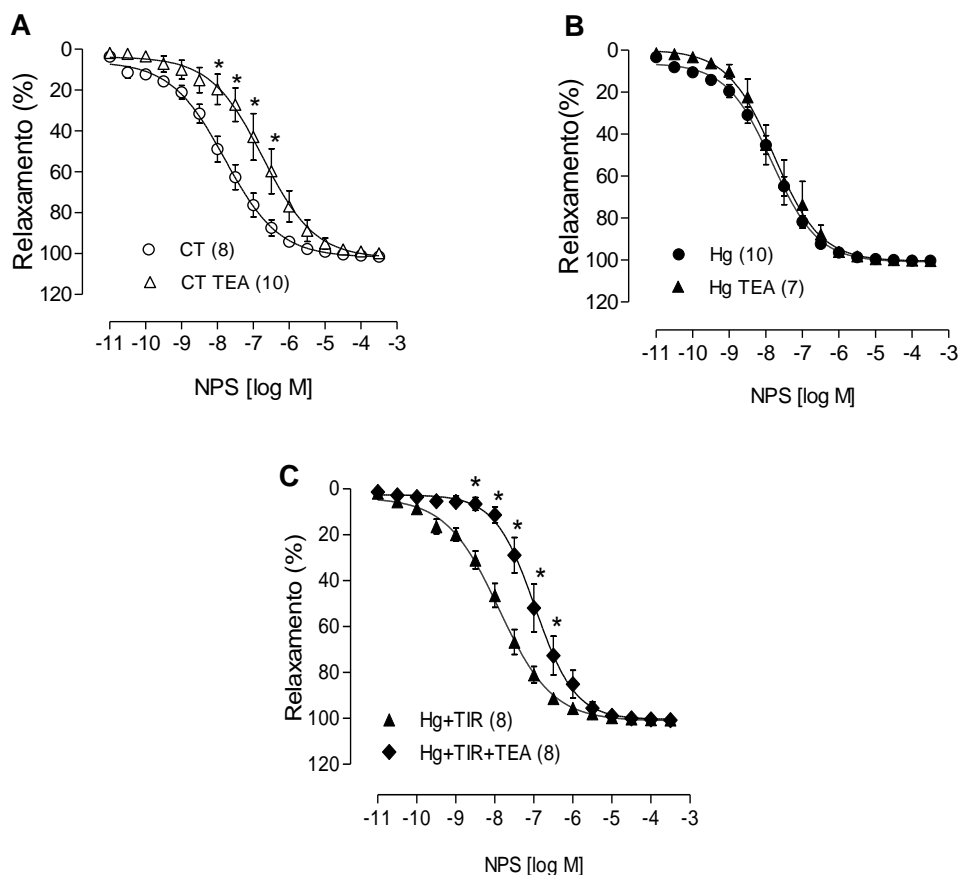


**Figura 11. Efeito da exposição crônica ao mercúrio na produção de ânion superóxido.** Microfotografias de fluorescência de secções (ampliação original  $\times 400$ ) da aorta marcadas com (DHE) e análise quantitativa de produção e/ou biodisponibilidade  $O_2^{\cdot-}$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  pelo teste  $t$  de Student quando comparados grupos CT e Hg. As médias da intensidade de fluorescência representadas no gráfico de barras.

#### 5.4. Papel do NO sobre o relaxamento dependente da ativação de canais para potássio

Analizamos o papel do NO, sobre o qual a sugestão era de que estaria reduzido devido ao aumento de EROs, e sua consequente contribuição na ativação dos  $K_{Ca}$ . Para isso, avaliamos os efeitos da incubação com TEA, um inibidor desses canais, sobre o relaxamento vascular ao doador de NO, nitroprussiato de sódio. Como mostrado na figura 12A, o TEA reduziu o relaxamento no grupo controle. Entretanto, o relaxamento independente do

endotélio não foi modificado pelo TEA no grupo mercúrio (Figura 12B). Por outro lado, a co-incubação de TEA + Tiron permitiu uma melhora no relaxamento (Figura 12C).

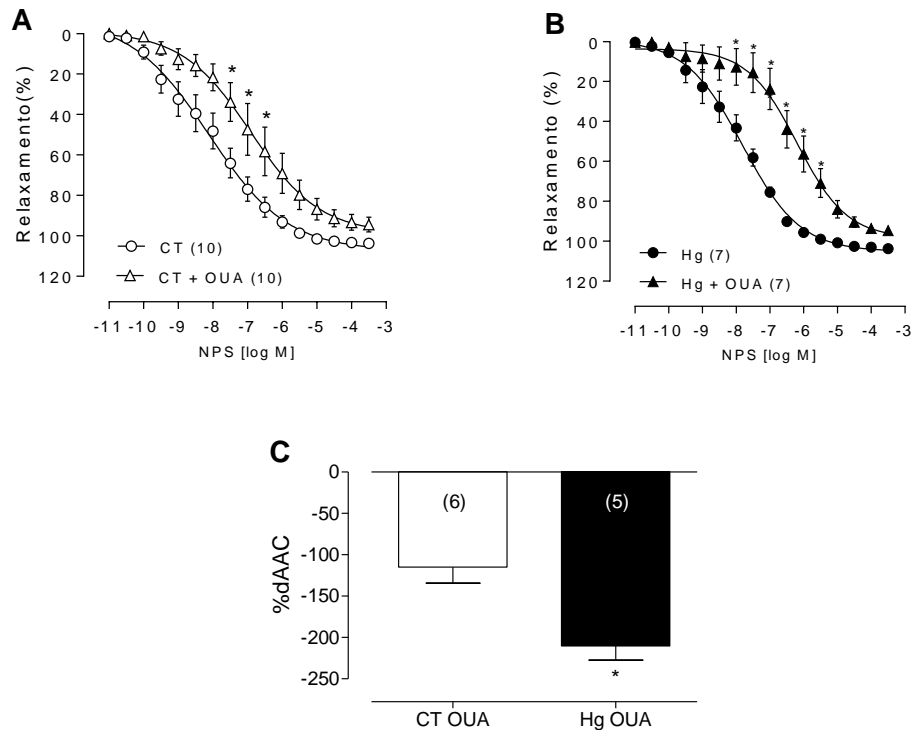


**Figura 12. Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre o papel dos canais para potássio mediada por NO e por EROs na vasodilatação.** Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) foram construídas com ou sem pré-incubação TEA em segmentos de aorta do grupo controle (CT) e  $\text{HgCl}_2$  (Hg). No grupo de Hg, o relaxamento com NPS também foi testada após incubação com tiron (TIR) (A e B) ou co-incubação com TEA (C). Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  respectivo grupo versus sem intervenção por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O número de animais está indicado entre parênteses.

### 5.5. Papel do NO sobre o relaxamento dependente da ativação da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase

Também avaliamos os possíveis efeitos da exposição ao  $\text{HgCl}_2$  sobre a participação da NKA no relaxamento induzido pelo doador de NO. Para isso,

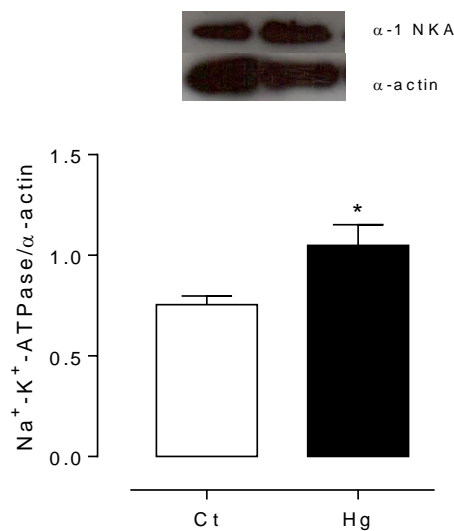
utilizamos um inibidor da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ , a ouabaína, a qual promoveu uma redução da resposta em ambos os grupos (Figura 13 A e B). Entretanto, esse efeito ocorreu com maior magnitude no grupo  $\text{HgCl}_2$ , conforme demonstrado por meio da diferença da área abaixo da curva (%dAAC) (Figura 13C).



**Figura 13. Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre o papel da ativação mediada por NO da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  na vasodilatação.** Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) foram construídas com ou sem pré-incubação com ouabaína (A, B). A magnitude dos efeitos foi mensurada por meio das diferenças da área abaixo da curva (dAAC%) com e sem pré-incubação com Ouabaína (OUA). Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  respectivo grupo versus sem intervenção por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas (A-B); teste *t* de Student não pareado para comparação da dAAC% (C). O número de animais está indicado entre parênteses.

## 5.6. Expressão proteica da subunidade $\alpha_1$ da $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase

Após os resultados funcionais, que indicaram uma redução da participação da NKA na resposta vasodilatadora à ACh, e aumento de sua participação na resposta ao NPS sugerindo aumento da sua atividade e/ou expressão, analisamos o conteúdo proteico da subunidade  $\alpha_1$  NKA nos segmentos da artéria torácica dos animais de ambos os grupos por meio da técnica de Western Blotting. Como observado na figura (14), a expressão proteica está aumentada no grupo  $\text{HgCl}_2$  quando comparado com o grupo CT.



**Figura 14. Efeito da exposição crônica ao mercúrio sobre a expressão proteica da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase na vasodilatação.** O teor de proteína da isoforma  $\alpha_1$  de  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase foi avaliada por transferência Western e medido como densidades ópticas integradas das bandas. Anti- $\alpha$ -actina foi utilizado como um controle de carga interna. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  pelo teste  $t$  de Student não pareado para comparação entre os grupos.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, descrevemos que a exposição crônica ao mercúrio em uma dose considerada tóxica é capaz de prejudicar a vasodilatação mediada pelo endotélio em anéis da aorta de ratos. Esta alteração vascular parece envolver a ativação do sistema renina-angiotensina local, a via do ácido araquidônico-ciclooxigenase e aumento do estresse oxidativo vascular. A consequente redução na biodisponibilidade NO resultou não apenas em uma reduzida participação dos canais para potássio ativados por cálcio ( $BK_{Ca}$ ,  $SK_{Ca}$ ), mas também na redução da participação da  $Na^+K^+$ -ATPase. No entanto, quando avaliamos o papel da  $Na^+K^+$ -ATPase no relaxamento utilizando um doador de NO, foi possível observar um aumento da participação da NKA. De fato, a análise da expressão proteica evidenciou um aumento no conteúdo da subunidade  $\alpha_1$  da  $Na^+K^+$ -ATPase. Tomado em conjunto, isso pode sugerir um mecanismo compensatório do MLV devido a redução na biodisponibilidade de NO.

A diminuição da produção e da biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, especialmente o NO, é realmente um fator que causa disfunção endotelial e está presente em várias condições patológicas (Maturana et al., 2007). O prejuízo nas ações do NO talvez seja considerado o evento mais importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares decorrentes da exposição ao mercúrio (Omanwar et al., 2011; Omanwar et al., 2014). A este respeito, os nossos resultados reforçam sugestões anteriores de que a disfunção endotelial está presente nessa condição, o que poderia contribuir para o aumento do risco de hipertensão, infarto do miocárdio, aterosclerose e doença coronária em



peessoas expostas ao mercúrio (Salonen et al., 1995; Houston et al., 2007; Houston et al., 2011). Estudos em animais com exposição ao  $\text{HgCl}_2$  relatam, também, disfunção endotelial caracterizada por aumento da vasoconstrição mediada pela fenilefrina (Wiggers et al., 2008a; Peçanha et al., 2010; Lemos et al., 2012). Nesse contexto, o presente trabalho buscou investigar o impacto de uma dose mais elevada no relaxamento dependente e independente do endotélio e os possíveis mecanismos envolvidos, investigando a disfunção endotelial sob a óptica da vasodilatação prejudicada e não da modulação sobre a vasoconstrição, como anteriormente descrito.

Corroborando alguns poucos estudos que testaram o papel vasorelaxante do endotélio (Wiggers et al., 2008a; Peçanha et al., 2010; Furieri et al., 2011b), verificamos que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  promoveu uma redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio em segmentos de aorta. Sabendo que essa resposta envolve principalmente o óxido nítrico, decidimos investigar o papel do NO no relaxamento mediado pela ACh, assim como os possíveis fatores que podem interferir com a sua produção e/ou ação. Quando avaliamos a ação do L-NAME, é possível notar bloqueio do relaxamento em ambos os grupos, mas com um efeito maior no grupo  $\text{HgCl}_2$ . Tal fato, fora também sugerido pelo menor efeito do L-NAME em aumentar a vasoconstrição mediada por fenilefrina, tanto em vasos de resistência quanto de condutância de animais expostos ao mercúrio (Wiggers et al., 2008b; Peçanha et al., 2010). O NO reduzido pode ser um resultado da produção prejudicada e/ou aumento de sua degradação. A este respeito, foi demonstrado que o metilmercúrio inibe a produção de NO e atividade da NOS em cultura de células endoteliais umbilicais humanas cultivadas

(Kishimoto et al., 1995). No entanto, Wiggers et al (2008a) mostrou aumento da expressão eNOS em artérias de resistência de ratos expostos com doses mais baixas de mercúrio, enquanto o trabalho de Peçanha (2009) também com baixas doses, não encontrou alteração na expressão da eNOS em aorta de ratos submetidos as mesmas doses baixas. Furieri et al (2011b) também mostrou redução da produção de NO sem encontrar alteração na expressão da eNOS em artéria coronária de ratos após exposição ao mercúrio. Ao mensurar a detecção “*in situ*” desse vasodilatador derivado do endotélio, mostramos uma menor quantidade no grupo HgCl<sub>2</sub> quando comparados com o CT, o que reforça os nossos dados funcionais de menor biodisponibilidade de NO, embora não possamos afirmar ser um resultado de menor produção ou maior degradação.

Como a diminuição da biodisponibilidade de NO em condições patológicas podem também resultar da sua degradação metabólica por EROs (Sharma, et al., 2009), investigamos se o aumento do estresse oxidativo está relacionado com o prejuízo que encontramos na vasodilatação dependente do endotélio. Os nossos resultados indicam que a incubação com o Tiron, um “varredor” de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, melhora o relaxamento à ACh dos segmentos arteriais do grupo HgCl<sub>2</sub> sem alterar esta resposta no grupo CT. De fato, o estresse oxidativo parece mesmo estar presente na intoxicação por mercúrio. Foi demonstrado que a incubação com superóxido dismutase ou tiron, bem como o tratamento agudo ou crônico com apocinina, um inibidor de uma importante fonte vascular de ânion superóxido, a NADPH-oxidase, são capazes de impedir o aumento da resposta vasoconstritora em diferentes artérias de ratos expostos ao HgCl<sub>2</sub> (Wiggers et al., 2008a; Furieri et al., 2011b;

Rizzetti et al., 2013; Azevedo et al., 2016). Além disso, a exposição ocupacional de trabalhadores de mineração por mercúrio elementar aumenta a formação de radicais livres em análises no sangue mesmo após vários anos que a exposição foi cessada (Kobal et al., 2004). Finalmente, foi demonstrado que o mercúrio também leva à diminuição de defesas antioxidantes (Brandão et al., 2008), como exemplo, glutathiona peroxidase (Raymond & Ralston, 2004), superóxido dismutase e catalase (Rungby & Ernst, 1992).

De acordo com os dados apresentados, o mercúrio não só reduziu a ação do NO endotelial, mas também aumentou a geração de produtos vasoconstritores, tais como a angiotensina II e prostanóides locais derivados da COX que parecem contribuir para a vasodilatação prejudicada no nosso modelo de intoxicação crônica ao mercúrio.

Isso pode ser sugerido porque a incubação “*in vitro*” com enalapril foi capaz de restaurar a vasodilatação dos segmentos de aorta do grupo de mercúrio. Estes dados reforçam estudos anteriores que mostram que a incubação com os inibidores da ECA ou antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> reduzem também a hiperatividade vasoconstritora de ratos expostos ao mercúrio (Wiggers et al., 2008b; Peçanha et al., 2010; Azevedo et al., 2016). É bem sabido que a angiotensina II local desempenha um importante papel no tônus do músculo liso vascular, não só pela via vasoconstritora direta, mas também por meio da produção de EROs devido ao aumento da atividade e/ou expressão de NADPH-oxidase (Nguyen Dinh et al., 2013). Nesse sentido, foi demonstrado que em células do músculo liso vascular o mercúrio interfere nas vias de sinalização da

MAPK, resultando não só na ativação da NADPH-oxidase, mas também da COX-2.

Quanto aos fatores derivados da COX, em nossos experimentos a indometacina não foi capaz de modificar a vasodilatação no grupo CT, enquanto na aorta do grupo mercúrio melhorou o relaxamento, indicando que o mercúrio pode estimular a liberação de prostanóides vasoconstritores. Em acordo, foi anteriormente demonstrado que mesmo doses menores de mercúrio já conduziam a um aumento da expressão da COX e de sua participação nas respostas vasoconstritoras de aorta de ratos (da Cunha et al., 2000; Peçanha et al., 2010). Além disso, foi recentemente demonstrada uma relação relevante entre COX e o estresse oxidativo em relação à disfunção vascular: enquanto as EROs são capazes de aumentar a expressão de COX-2, os produtos derivados da COX-2 podem ativar a NADPH-oxidase, aumentando a produção de EROs (Korbecki et al., 2013; Martínez-Revelles et al., 2012; Hernanz et al., 2014). Com isso, poderíamos sugerir que a ativação do sistema renina-angiotensina local pelo mercúrio poderia aumentar a formação de EROs e prostanóides, e diminuir a biodisponibilidade do NO, o que conseqüentemente, prejudicaria a vasodilatação mediada por ACh.

Entretanto, embora seja bem sabido que entre os fatores vasodilatadores derivados do endotélio o NO desempenhe papel relevante, a importância de cada fator bem como sua interação podem variar de acordo com o vaso e o contexto fisiopatológico. Os canais para potássio, por exemplo, participam na regulação do tônus do músculo liso vascular e do fluxo sanguíneo, e várias substâncias derivadas do endotélio podem modular a atividade desses canais (Haddy et al.,

2006). Nesse sentido, a exposição ao mercúrio pode causar um desequilíbrio entre a produção de NO e o estresse oxidativo causando disfunção endotelial, que pode ser compensado por relaxamento mediado por EDHF, principalmente representado pela ativação de canais para potássio em vasos de condutância como a aorta (Omanwar et al.,2015). Ao estudarmos a participação dos  $K_{Ca}$ , utilizando a incubação com TEA, percebemos que essa inibição reduziu o relaxamento mediado por acetilcolina no grupo CT, sem alterar no grupo  $HgCl_2$ , o que sugere uma menor participação dos  $K_{Ca}$  nessa resposta endotélio-mediada. Sabe-se que muitos subtipos de canais para  $K^+$  já foram identificados em células endoteliais e músculo liso, e que o seu envolvimento com doenças cardiovasculares depende do tecido vascular ou espécies estudadas (Félétou & Vanhoutte, 2009; Ko et al., 2008). Nos segmentos de aorta de ratos controle, houve redução na resposta após incubação com apamina, que inibe os  $SK_{Ca}$  e com iberiotoxina, que inibem os  $BK_{Ca}$ , mas não houve nenhum efeito no grupo de mercúrio. Em conjunto, estes dados indicam que os subtipos de canais cuja participação na vasodilatação endotélio-dependente foi reduzida após a exposição ao mercúrio foram os  $BK_{Ca}$  e  $SK_{Ca}$ . Em contrapartida, houve uma redução semelhante na resposta vasodilatadora em ambos os grupos após a incubação com 4-aminopiridina, fármaco que inibe os  $K_v$ , indicando que o seu papel aparentemente está inalterado. Wiggers et al (2008b), utilizou doses mais baixas do que em nosso estudo e também mostrou uma redução da participação dos canais para potássio no aumento da resposta vasoconstritora em artéria mesentérica de resistência, embora não tenha estudado o subtipo envolvido naquele contexto. Embora a incubação aguda com diferentes concentrações de

mercúrio pode estimular ou suprimir as correntes de efluxo de potássio sensíveis ao TEA ou glibenclamida em linfócitos B humanos (Gallagher et al., 1995) e células tubulares proximais do rim de rã (Nesovic-Ostojic et al., 2008), uma relação direta entre o mercúrio e a cinética desses canais na vasculatura ainda não fora adequadamente investigada, o que indica que nosso estudo seria pioneiro nesse assunto.

Todavia, como os fatores endoteliais tais com NO podem ativar diretamente canais para potássio, especialmente os  $BK_{Ca}$  (Bolotina et al., 1994), e ainda as EROs podem modular negativamente a atividade destes canais (Tang et al., 2004), havia a possibilidade da menor participação desses canais ser consequência indireta de tais fatores e não um efeito direto do mercúrio. Dessa forma, procuramos avaliar se a redução da função dos  $K_{Ca}$  no grupo de  $HgCl_2$  foi dada pela redução da biodisponibilidade do NO resultante do estresse oxidativo elevado. Para tanto, foi realizada uma avaliação da vasodilatação a uma fonte exógena de NO, utilizando a incubação com TEA e a co-incubação TEA + Tiron. Nos segmentos de aorta de animais CT a incubação com TEA promoveu a redução significativa na vasodilatação mediada por nitroprussiato de sódio, diferente do grupo mercúrio, que não alterou sua resposta. Mas ao avaliar uma co-incubação TEA + Tiron no grupo mercúrio, com uma quantidade conhecida de NO (doador de NO) e sem a influência de EROs devido a presença do Tiron, percebemos uma redução do relaxamento promovido pelo TEA, sugerindo uma possível integridade funcional dos  $K_{Ca}$ . Ademais, poderíamos especular também que a redução da função desses canais para potássio na vasodilatação endotélio-mediada se deva a uma redução da biodisponibilidade de NO. Ou seja, embora a

função dos  $K_{Ca}$  esteja mantida, estes estão sendo menos ativados simplesmente porque o NO está reduzido.

Além da hiperpolarização do músculo liso vascular por meio da ativação dos canais para potássio, também a  $Na^+K^+$ -ATPase, por ser responsável pela manutenção do potencial de membrana celular, pode contribuir para a regulação do tônus vascular em condições fisiológicas e fisiopatológicas (Marin e Redondo, 1999). Nesse ínterim, para o nosso melhor conhecimento, este é o primeiro estudo que testa os efeitos do mercúrio sobre a o papel funcional da  $Na^+K^+$ -ATPase no controle do tônus vascular. Nossos ensaios com ouabaína sobre a vasodilatação mediada pela acetilcolina indicam que a porção da NKA sensível à ouabaína tem papel reduzido em anéis de aorta de ratos expostos ao mercúrio. Ao utilizar os compostos orgânicos e inorgânicos de mercúrio foi demonstrada inibição da  $Na^+K^+$ -ATPase em várias espécies animais e tipos de células tais como tecido renal de rato (Kramer et al., 1986), guelras de peixes (Poopal et al., 2013), cérebro de rato (Chanez et al., 1989; Huang et al., 2008) e miocárdio de rato (Halbach et al., 1989; Furieri et al., 2011a). Na verdade, Nechay & Saunders já haviam proposto, em 1978, que o mercúrio seria capaz de inibir a  $Na^+K^+$ -ATPase em homogenizado de rim humano, e em 1983, Yoshida havia relatado que eritrócitos provenientes de trabalhadores expostos com concentrações sanguíneas de mercúrio entre 29 e 111 ng/ml tiveram de fato uma redução da atividade bioquímica desta enzima. E Kade (2012) relata como pode ser fundamental verificar a interação do mercúrio com a  $Na^+K^+$ -ATPase na avaliação médica e na intervenção da toxicidade do mercúrio no sistema nervoso central, visto que a  $Na^+K^+$ -ATPase de eritrócitos possa ser marcador da toxicidade do mercúrio.

A NKA é uma enzima sulfidrilica que contém tiol no sítio de ligação do  $K^+$ ,  $Na^+$  e ATP (Omotayo et al., 2011). E o mecanismo consensual é que  $Hg^{2+}$  reage com grupos sulfidrilica presentes na  $Na^+K^+$ -ATPase (Kade, 2012). No entanto, uma vez que o NO é capaz de estimular também a  $Na^+K^+$ -ATPase (Gupta et al., 1994), nós decidimos analisar se a redução da biodisponibilidade de NO estaria mediando essa menor função da NKA no relaxamento induzido pela acetilcolina. De maneira interessante, quando o relaxamento foi estimulado por um doador de NO, a incubação com ouabaína, ao contrário do que esperávamos, indicou uma maior participação da NKA no grupo  $HgCl_2$ . Reforçando nossos dados funcionais, a análise por western blotting indicou maiores níveis proteicos da subunidade  $\alpha_1$  da NKA no grupo Hg em relação ao grupo CT. Em conjunto, estes dados permitem sugerir que apesar do papel reduzido da NKA no relaxamento com acetilcolina, provavelmente devido à diminuída biodisponibilidade do NO após exposição ao mercúrio, a sua expressão se encontra aumentada provavelmente como um mecanismo de compensação.



## 7. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a exposição por 30 dias ao  $\text{HgCl}_2$  na dose utilizada prejudica a vasodilatação endotélio-dependente. Sugerimos que essa redução envolve o aumento do estresse oxidativo, ativação local do sistema renina-angiotensina, da COX e diminuição da biodisponibilidade de NO. Em consequência, a redução do óxido nítrico contribui para a redução da ativação dos canais  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  e da NKA no músculo liso vascular, embora a NKA esteja super expressa provavelmente como um mecanismo de compensação. Finalmente, acreditamos que a adequada compreensão desses mecanismos envolvidos na disfunção vasodilatadora deva permitir, no futuro, o desenvolvimento de novas abordagens para diagnóstico e para intervenção terapêutica nos casos de exposições crônicas ao mercúrio.

## 8. REFERÊNCIAS

Abramson JJ, Salama G . Critical Sulfhydryls Regulate calcium release from sarcoplasm icreticulum. *Journal Of Bioenergetics And Biomembranes*. 1989; 21: 283-294.

Aguado A, Galan M, Zhenyukh O, Wiggers GA, Roque FR, Redondo S, Peçanha F, Martin 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. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013; 268: 188–200.

Angeli JK. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009,113f. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdo toxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91: 7583-7571.

Arnon A, Hamlyn JM, Blaustein MP. Ouabain augments Ca<sup>(2+)</sup> transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na<sup>(+)</sup>. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2000; 279 (2), 679-91.

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

Azevedo F A de. Toxicologia do Mercúrio. São Carlos: RiMa. 2003.

Azevedo BFA, Furieri LB, Peçanha FM, Wiggers GA, Vassallo PF, Simões MR. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.

Bauersachs J, Bouloumié A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression. *Circulatio*.1999; 100: 292–98.

Belem FL. Estudo da distribuição espacial de mercúrio em sedimentos no período da Cheia do Rio Mutum-Paraná, Rondônia. Dissertação de Mestrado, 2013. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente do Núcleo de Ciências Exatas e da Terra da Fundação Universidade Federal de Rondônia, Rondônia.

Belghiti D, Patey O, Berry JP, Antelin C, Hirbec G, Lagrue G. Lipoid nephrosis of toxic origin. 2 cases. *Lá Presse Médicale*. 1986 Nov 8;15(39):1953-5.

Biver P, Clerico A, Path A, Balzan S, Boldrini A , Cipollom C. Endogenous digitalis-like factors: their possible pathophysiological implications with particular regard to the perinatal period [Review]. *Child Nephrology and Urology*. 1990; 10: 164– 180.

Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular  $Ca^{2+}$  stores and cell responsiveness. *American Journal Physiology*.1993; 264: 1367-87.

Bluhm RE, Bobbitt RG, Welch LW, Wood AJ, Bonfiglio JF, Sarzen C, Heath AJ, Branch RA. Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers. Part I: History, neuropsychological findings and chelator effects. *Human & Experimental Toxicology*. 1992; 11(3):201-10.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric Oxide directly activates calcium-dependent potassium channel in vascular smooth muscle. *Nature*.1994; 368 (6474): 850-853.

Bjorkman L, Sandborgh-Englund G, Ekstrand J. Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997; 144: 156-162.

Brandão R, Borges LP, De Oliveira R, Rocha JB, Nogueira CW. Diphenyl diselenide protects against hematological and immunological alterations induced by mercury in mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2008; 22(5): 311-9.

Briones AM, Padilha AS, Cogolludo AL, Alonso MJ, Vassallo DV, Pérez Vizcaino, F, Salaices M. Activation of BKCa channels by nitric oxide prevents coronary artery endothelial dysfunction in ouabain-induced hypertensive rats. *Journal Hypertension*. 2009; 27: 83–91.

Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and celiac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*.1976; 12: 897 – 913.

Canela M C. “Determinação de Mercúrio”, UNICAMP, 1995. Clarkson TW. The pharmacology of mercury compounds. *Annual Review of Pharmacology* . 1972; 12: 375-406.

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. *British Journal of Industrial Medicine*. 1992; 49(4):226-32.

Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2001; 8:76-88.

Chang L, Hartman HA. Blood, brain barrier dysfunction in experimental mercury intoxication. *Acta Neuropathologica*.1972 (Berl) 21, 179–184.

Chen C, Qu L, Li B, Xing L, Jia G, Wang T, et al. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clinical Chemistry*. 2005; 51: 759- 767.

Chanez C, Flexor MA, and Bourre JM. “Effect of organic and inorganic mercuric salts on Na+K+ATPase in different cerebral fractions in control in intrauterine growth-retarded rats: alterations induced by serotonin,” *NeuroToxicology*. 1989 vol. 10, no. 4, pp. 699–706.

Clarkson, TW; Magos, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds *Critical Reviews in Toxicology*. 2006; 36: 609-662.

Coleman HA, Tare M, Parkington HC. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2004; 31: 641-649.

CONCEA- Ministério da Ciência, tecnologia e inovação. Conselho Nacional de controle de experimentação animal. DBCA- Diretriz Brasileira para cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Brasília/DF, 2013.

Cortes VF, Veiga-Lopes FE, Barrabin H, Alves-Ferreira M, Fontes CF. The gamma subunit of Na+K+-ATPase: role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006; 38 (11): 1901-13.

da Cunha V, Rossoni LV, Oliveira PA, Poton S, Pretti SC, Vassallo DV, et al. Cyclooxygenase inhibition reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2000; 22: 203-215.

De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Medical Science Monitor*. 2009; 15 (4): RA91-101.

Dias FMV. Participação da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e dos canais para K<sup>+</sup> nas diferenças de reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Tese de Doutorado, 2011. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Dostanic-Larson I, Lorenz JN, Van Huysse JW, Neumann JC, Moseley AE, Lingrel JB. Physiological role of the  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2- isoforms of the Na-K-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2006; 290: 524–28.

Dos Santos L, Xavier FE, Vassallo DV, Rossoni LV. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Sciences*. 2003; 74 (5): 613-27.

Drasch G, Bose-O'Reilly S, Beinhoff C, Roider G, Maydl S. The Mt. Diwata study on the Philippines 1999—assessing mercury intoxication of the population by small scale gold mining. *Science of The Total Environment*. 2001; 267, 151–168.

Faria TdO, Costa GP, Almenara CCP, Angeli JK, Vassallo DV, Stefanon I, et al. Chronic exposure to low doses of HgCl<sub>2</sub> avoids calcium handling impairment in the right ventricle after myocardial infarction in rats. *PLoS ONE*. 2014; 9(4): e95639.

Farina M, Rocha JB, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sciences*. 2011; 89: 555-563.

Ferrer M, Encabo A, Conde MV, Marin J, and Balfagon G. Heterogeneity of endothelium-dependent mechanisms in different rabbit arteries. *Journal of Vascular Research*. 1995; 32: 339–46.

Félétou M. & Vanhoutte, P.M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *Journal Physiology Pharmacology*. 1999; 50 (4): 525 – 534.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Where Are We Now? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2006; 26:1215-1225.

Félétou M, Vanhoutte P. EDHF: an uptake. *Clinical Science*. 2009; 117: 139–155.

Förstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biological Chemistry*. 2006; 387 (12): 1521-33.

Frolich JC. & Förstermann U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*.1989; 19: 211 – 215.

Furieri LB, Fioresi M, Junior RF, Bartolomé MV, Fernandes AA, Cachofeiro V, Lahera V, Salaices M, Stefanon I, Vassallo DV. Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011a; 255: 193-19

Furieri LB, Galán M, Avendano M, Garcia-Redondo AB, Aguado A, Martínez S, Cachofeiro V, Bartolomé MV, Alonso MJ, Vassallo DV, Salaices M. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. *British Journal of Pharmacology*. 2011b; 162(8): 1819-1831.

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

Furchgott RF. Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. *Circulation Research*. 1983;53: 557 – 572.

Gao L, Mann GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovascular Research*. 2009; 82 (1): 9-20.

Gallagher JD, Noelle RJ, McCann FV. Mercury suppression of a potassium current in human B lymphocytes. *Cell Signal*.1995; 7:31–38.

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

Clarkson TW. The pharmacology of mercury compounds. *Annual Review of Pharmacology* . 1972; 12: 375-406.

Giuberti K. Efeitos da exposição crônica a baixas concentrações de cloreto de mercúrio (20  $\mu$ M) sobre o sistema cardiovascular de ratos. Tese de Doutorado,2010. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na(+)-K(+)-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *American Journal Physiology*.1994; 266: 2146-51.

Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2006; 290 (3): 546-52.

Halbach S, Schonsteiner G, and Vierling W. “The action of organic mercury compounds on the function of isolated mammalian heart muscle.” *European Journal of Pharmacology*.1989 vol. 167, no. 2, pp. 255–264.



Hernanz R, Briones A M, Salaices M, & Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clinical Science (Lond)*. 2014;126(2), 111–121.

Holmes P. James KAF. Levy LS. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health. *Science of the Total Environment*. 2009; 408:171–182.

Houston MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2007; 13: S128-S133.

Houston MC . Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)*. 2011; 13: 621–627.

Huang CF, Hsu CJ, Liu SH and Lin-Shiau S.Y. “Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by lowdose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase involved,” *Toxicology Letters*. 2008 vol. 176, no. 3, pp. 188–197.

Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.1985; 25:171-91.

Jackson WF. Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation. *Microcirculation*. 2005; 12 (1): 113-27.

Jackson LW, Howards PP, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. The association between cadmium, lead and mercury blood levels and reproductive hormones among healthy, premenopausal women. *Human Reproduction*. 2011;26(10):2887–95.

Kade IJ. Mercury toxicity on sodium pump and organoseleniums intervention: A paradox. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, 924549.

Kifor I & Dzau VJ. Endothelial rennin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensin. *Circulation Research*.1987; 60: 422 – 428.

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

Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Journal Smooth Muscle Research*. 2008; 44(2): 65-81.

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 longterm past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *Journal Trace Elements in Medicine and Biology*. 2004; 17: 261–274.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, & Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*.1998; 70, 2446-2453.

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

Kramer HJ, Gonick HC, Lu E. In vitro inhibition of Na-K-ATPase by trace metals: relation to renal and cardiovascular damage. *Nephron*. 1986; 44(4):329-36.

Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*. 2006; 21: 69–76.

Lemos NB, Angeli JK, Faria Tde O, Ribeiro Junior RF, Vassallo DV, Padilha AS, Stefanon I. Low mercury concentration produces vasoconstriction, decreases nitric oxide bioavailability and increases oxidative stress in rat conductance artery. *PLoS One*. 2012; 7: e 49005.

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

Lincoln T, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in smooth muscle. 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.

Lobato NS, Figueira FP, Akamine EH, Davel AP, Rossoni LV, Tostes RC, Carvalho MH, & Fortes ZB. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. *Nutrition Metabolism Cardiovascular Diseases*. 2011;21, 808-816.

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*. 2007; 24: 92-97.

Malagrino W. Bioacumulação e eliminação de mercúrio ( $^{203}\text{Hg}$ ) no mexilhão (*Perna perna*, Linné, 1758) modelo Cinético para avaliar o risco de ingestão no homem. Tese de Doutorado, 2003. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.

Marques VB. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. Dissertação de Mestrado 2015. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Marques RC. As preocupações públicas com a segurança das vacinas- Uma casa dividida. Saúde pública. 26, *Ciência Hoje*. 2008 Volume 42, nº 250.

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(8): 861-864.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics*.2007; 62: 77-866.

Melo LG, Gnechi M, Pachori AS, Kong D, Wang K, Liu X, Pratt. RE, Dzau, VJ. Endothelium-targed gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24:1761-1774.

Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM) e Ministério da Saúde. Coletânea de informações sobre o mercúrio, incluindo padrões ambientais no Brasil,2010.

Micaroni Regina C C Mesquita; Bueno MIS; Jardim WF. Compostos de mercúrio. revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*. 2000; 23(4).

Marín J, Redondo J. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. *Pharmacology & Therapeutics*. 1999; 84:249–271.

Martínez-Revelles S, Avendano MS, Garcia-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Perez-Giron JV, Garcia-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. *Antioxidants and Redox Signaling*.2012.

Martinez CS, Escobar AG, Torres JGD, Brum DS, Santos FW, Alonso MJ, Salaices M, Vassallo DV, Peçanha FM, Leivas FG, Wiggers GA. Chronic Exposure to Low Doses of Mercury Impairs Sperm Quality and Induces Oxidative Stress in Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2014; Part A , v. 77, p. 143-154.

Mello-Carpes PB, Barros W, Borges S, Alves N, Rizzetti D, Peçanha FM, Vassallo DV, Wiggers GA, Izquierdo I. Chronic exposure to low mercury chloride concentration induces object recognition and aversive

memories deficits in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2013; 31 (Nov (7)), 468–472.

Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*.1977; 11: 323 – 344.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochemical Society Transactions*. 1989; 17: 642-4.

Mutter J; Naumann J, Sadaghiani C, Schneider R, Walach, H. Alzheimer disease: mercury as pathogenic factor and apolipoprotein. *Neuro Endocrinol Lett*. 2004; 25: 331-339.

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

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American Journal of physiology*.1995; 268:C799-C822.

Nesovic-Ostojic J, Cemerikic D, Dragovic S, Milovanovic A, Milovanovic J. Low micromolar concentrations of cadmium and mercury ions activate peritubular membrane K<sup>+</sup> conductance in proximal tubular cells of frog kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular Integrative Physiol*. 2008; 149(3): 267-74.

Nechay BR, Saunders JP. Inhibitory characteristics of cadmium, lead, and mercury in human sodium and potassium dependent adenosinetriphosphatase preparations. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*. 1978; 2: 283-290.

Nguyen Dinh CA, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19, 1110-1120.

Nunes DO, Almenara CC, Broseghini-Filho GB, Silva MA, Stefanon I, Vassallo DV, & Padilha AS . Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Lipids in Health and Disease*. 2014; 13, 107.

Nunes DO. Efeitos do tratamento intramuscular por quinze dias com óleo de linhaça sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos. Dissertação de Mestrado 2014. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Omotayo TI, Rocha JBT, Ibukun EO, Kade IJ. Inorganic mercury interacts with thiols at the nucleotide and cationic binding sites of the ouabain sensitive cerebral electrogenic sodium pump. *Neurochemistry International*. 2011; 58:776–784.

Omanwar S, Saidullah B, Fahim M. Molecular Basis for Mercury- Induced Alteration in Endothelial Function: NO and its Modulators. *Cardiovasc Pharm Open Access*. 2015; 4: 167.

Omanwar S, Ravi K, Fahim M. Persistence of EDHF pathway and impairment of the nitric oxide pathway after chronic mercury chloride exposure in rats: mechanisms of endothelial dysfunction. *Human & Experimental Toxicology* . 2011; 30(11): 1777–1784.

Omanwar S, Saidullah B, Ravi K, Fahim M. Vasorelaxant effects of mercury on rat thoracic aorta: the nitric oxide signaling mechanism. *Human & Experimental Toxicology*. 2014; 33: 904-910.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524 6.

Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*. 2006; 11: 114-127.

Pepine CJ .The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. *The American Journal of Medicine*. 2009; 122 (5 Suppl): S10-5.

Peterson GL. Simplification of protein assay method of lowry et al which is moregenerally applicable. *Analytical Biochemistry*. 1977; 83(2): 346-356.

Poopal RK, Ramesh M, Dinesh KPB. Short-term mercury exposure on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and ionoregulation in gill and brain of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* . *journal of Trace Elements in Medicine and Bioogyl*. 2013; 27;70–75.

Pritchard TJ, Bowman PS, Jefferson A, Tosun M, Lynch RM, Paul RJ. Na(+)-K(+)-ATPase and Ca(2+) clearance proteins in smooth muscle: a functional unit. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2010; 299 (2): 548-56.

OPAS/OMS-Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde. Cooperação Técnica entre Brasil,Bolívia e Colômbia:Teoria e Prática para o Fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas ao Mercúrio. Brasília, Brasil- 2011.ISBN 978-92-75-71658-8.

Peçanha FM, Wiggers GA, Briones AM, Perez-Giron JV, Miguel M, Garcia-Redondo AB, 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 : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2010; 61(1):29-36.

Peçanha FM. A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) altera a reatividade vascular da aorta de ratos - Papel das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides da via da ciclooxygenase. Tese de Doutorado, 2009. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

Prado MJV, de Oliveira RC, Ferreira RSF, Vieira RCPA, de Pinho JJRG. The

withdrawal of thimerosal from pharmaceutical market and its substitution by quaternary ammonium derivatives. *Evaluation of risk/benefit. Lecta*. 2004; 22 (1/2): 37-47.

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

Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2006;533:222-39.

Raymond LJ, Ralston NVC. Mercury: selenium interactions and health implications. *Seychelles Medical and Dental Journal*. 2004; 7: 72-77.

Rattmann, Y.D, Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. 2009.145f. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

Rizzetti DA, Torres JGD, Escobar AG, Peçanha FM, Santos FW, Puntel RL, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M, Vassallo DV, and Wiggers GA. Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low Concentrations of Mercury. *PLoS ONE*. 2013; 8(2): e 55806.

Rice DC and Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*. 2000; 108(3): 511-533.

Rossoni LV, Dos Santos L, Barker LA, Vassallo DV. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2003; 41 (1): 105-116.

Rubanyi, G.M. The role endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1993; 22 (4): 1-14.



Rubanyi GM, Vanhoute PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology*.1986; 250: H82-H827.

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

Sharma M, Zhou Z, Miura H, Papapetropoulos A, Mccarthy ET, Sharma R, et al. ADMA injures the glomerular filtration barrier: role of nitric oxide and superoxide. *American Journal Physiology Renal Physiology*. 2009; 296:F1386–95.

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

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

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

Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arteriosclerosis Thrombosis And Vascular Biology*. 2001; 21 (1): 28-38.

Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*.1992; 24 (3): 249-61.

Stern AH. Balancing the risks and benefits of fish consumption. *Annals of Internal Medicine*. 2005; 142: 949.

Taylor SG & Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1988; 9: 272 – 274.

Tang XD, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004; 11 (2): 171-8.

Triggle CR, Hollenberg M, Anderseon TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ng ES, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium health and disease – a targeted for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2003; 39: 249-267.

UNEP- Global Mercury Assessment: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. *UNEP Chemicals Branch*. 2013. Geneva, Switzerland.

Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation*. 1993;87 (suppl V): V9 - V17.

Vanhoutte PM. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *Journal of Clinical Investigation*. 2001 Jan;107(1):23-5.

Vassalle M. Contribution of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump to the membrane potential. *Experientia*. 1987; 43: 1135-40.

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

Vassallo DV, Simões MR, Furieri LB, Fioresi M, Fiorim J, et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 2011;44: 939-946.

Xie Z, Cai T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. *Molecular Interventions*. 2003; 3 (3): 157-68.

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

Yoshida M. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity of Red Cell Membranes in Workers Exposed to Mercury Vapor. *Industrial Health*. 1983; 21, 11-18.

Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cahofeiro V, Alonso MJ, e Salices M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2008a; 295:1033-43.

Wiggers GA, Stefanoni, PadilhaAS, Peçanha FM, Vassallo DV, Oliveira EM. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comparative Biochemistry And Physiology C- Toxicology & Pharmacology*. 2008b;147 (2): 252-260.

Wiggers GA, Furieri LB, Briones AM, Avendaño MS, Peçanha FM, Vassallo DV, Salices M, Alonso MJ. Cerebrovascular endothelial dysfunction induced by mercury exposure at low concentrations. *Neurotoxicology*. 2016 Mar;53:282-9.

WHO-World Health Organization. Children's Exposure to Mercury Compounds. *Library Cataloguing-in-Publication Data*. 2010.ISBN 978 92 4 150045 6.