

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE
A REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA AORTA E
ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS EXPOSTOS
CRONICAMENTE AO CLORETO DE MERCÚRIO
(HgCl₂)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Danize Aparecida Rizzetti

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A
REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA AORTA E
ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS EXPOSTOS
CRONICAMENTE AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂)

Por

Danize Aparecida Rizzetti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giulia Wiggers Peçanha

Co-Orientador: Prof. Dr. Franck Maciel Peçanha

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A REATIVIDADE
VASCULAR DA ARTÉRIA AORTA E ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS
EXPOSTOS CRONICAMENTE AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂)**

elaborada por

Danize Aparecida Rizzetti

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Giulia Alessandra Wiggers Peçanha
(Presidente, orientadora)

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo
(Universidade Federal do Espírito Santo/UFES)

Prof^a. Dr^a. María Jesús Alonso Gordo
(Universidad Rey Juan Carlos/URJC-ES)

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

“ Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.”

Augusto Cury

*Aos meus pais Valmor e Eleani e a
minha irmã Daniele, por
representarem o bem mais precioso
de minha vida, a minha família.*

AGRADECIMENTOS

Como não poderia ser diferente, gostaria de, primeiramente, agradecer a Deus, por ter colocado em meu caminho a possibilidade da realização de um sonho e, junto a isso, por ter-me dado forças suficientes para a sua concretização. Quero dedicar um agradecimento muito especial a minha família, meus pais Eleani e Valmor, minha irmã Daniele e meu cunhado André, pelo apoio incondicional, pelo suporte em todos os momentos dessa trajetória, até mesmo pela companhia nos vários fins de semana de trabalho no laboratório. Vocês sempre serão meu porto seguro e meu maior motivo para continuar sonhando e buscando novas conquistas.

Quero registrar minha gratidão também a algumas pessoas muito especiais em minha vida, minhas amigas. Obrigada àquelas de Santa Maria, Luísa, Marcele, Emanuele, Ana Paula e Juliana pelo apoio, mesmo que à distância, pela compreensão, nos muitos momentos em que permaneci longe de Santa Maria, e por terem-me proporcionado ótimos momentos durante esse período. Obrigada também as minhas queridas colegas e amigas de Uruguaiana, Juliana, Lisiane, Patrícia, Marcele e Lilian, pelo suporte emocional e pelas alegrias que me proporcionaram em Uruguaiana durante esse tempo.

Agradeço também, com imenso carinho, a minha orientadora, Giulia, e ao meu co-orientador, Franck, pelo apoio científico, técnico e emocional. Sou muito grata a todo conhecimento que me foi transmitido por vocês e também a toda força e incentivo que me foram passados nos momentos em que, até eu mesma, desanimava. Tenham certeza de que, apesar de algumas dificuldades encontradas ao longo do caminho para a finalização da pesquisa, foi uma brilhante orientação.

Durante esses meses pude conhecer algumas pessoas às quais hoje tenho muita satisfação em agradecer. Obrigada aos meus queridos amigos e IC's Guilherme e Alyne. Vocês foram meus excelentes ajudantes no laboratório, meus fiéis parceiros de pesquisa e hoje são meus grandes amigos.

É com imenso carinho que agradeço também ao professor Dalton Vassallo e à equipe do Laboratório de Eletromecânica Cardíaca da UFES, em especial a Priscila, pelo constante apoio, pelos grandes ensinamentos sobre reatividade vascular e pela maravilhosa hospitalidade no período em que estive em Vitória. Muito obrigada Chefe!

Às professoras da Universidad Autónoma de Madrid e da Universidad Rey Juan Carlos, Mercedes Salices, Ana María Briones e María Jesús Alonso, obrigada pelo apoio científico na confecção do artigo.

Aos amigos e colegas de pesquisa do Laboratório de Bioquímica, Tatiana, Andréia, Claudia, Matheus e demais, obrigada pela parceria e pelo ótimo auxílio em algumas análises. Agradeço também à professora Francielli pelos ensinamentos e pela grande ajuda nas análises bioquímicas e à professora Cleci pela amizade e pela colaboração nos experimentos.

Da mesma forma, dedico um agradecimento aos professores componentes da banca, Dalton Vassallo e María Jesus Alonso, por terem aceitado o convite e pelas brilhantes sugestões para a pesquisa.

Por fim, quero registrar minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, ao coordenador Vanderlei Folmer e, em especial, a UNIPAMPA, por possibilitarem a mim esta maravilhosa conquista e pelo esforço em proporcionar aos alunos desta instituição um valioso reconhecimento no mundo científico. Obrigada!

SUMÁRIO

PARTE I.....	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
1 Mercúrio.....	17
1.1 Propriedades físico-químicas do mercúrio.....	17
1.2 Utilização do mercúrio.....	18
1.3 Formas de Intoxicação por mercúrio e limites seguros de exposição.....	20
1.4 Mecanismo de toxicidade do mercúrio.....	23
1.5 Efeitos tóxicos do mercúrio no organismo.....	23
1.5.1 Efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular.....	25
2 Endotélio vascular.....	27
2.1 Óxido Nítrico.....	28
3 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e Estresse oxidativo.....	30
3.1 Enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase.....	31
3.2 Enzima ciclooxigenase (COX).....	34
4 Mecanismos antioxidantes.....	36
5 Tratamento antioxidante na exposição ao mercúrio.....	37
5.1 Apocinina.....	38
6 Justificativa.....	40
7 Objetivos.....	41
7.1 Objetivo geral.....	41
7.2 Objetivos específicos.....	41
PARTE II.....	42
APOCYNIN PREVENTS VASCULAR EFFECTS CAUSED BY CHRONIC EXPOSURE TO LOW CONCENTRATIONS OF MERCURY.....	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUCTION.....	44
MATERIAL AND METHODS.....	46
Animals.....	46
Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure.....	46
Blood collection and Reactivity experiments.....	46

Lipid Peroxidation in plasma.....	47
Thiol groups in plasma.....	48
Superoxide dismutase (SOD) and Glutathione peroxidase (GPx) activity in aortas.....	48
Drugs and reagents.....	49
Data analysis and statistics.....	49
RESULTS.....	50
Effect of apocynin treatment on systolic and diastolic blood pressure.....	50
Apocynin treatment improves endothelium dependent vasodilator responses and reduced vasoconstrictor responses in mercury treated rats.....	50
Apocynin treatment diminishes the deleterious effect of mercury on endothelial NO modulation of vasoconstrictor responses.....	51
Apocynin reduces the increased participation of ROS in vasoconstrictor responses of mercury treated rats.....	51
Effect of apocynin on lipid peroxidation and thiol groups in plasma.....	52
Effect of apocynin on superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity.....	52
Apocynin treatment does not modify the participation of prostanoids on vasoconstrictor responses of mercury treated rats.....	52
DISCUSSION.....	53
Acknowledgements.....	57
REFERENCES.....	58
FIGURE LEGENDS.....	62
TABLE.....	65
FIGURES.....	66
PARTE III.....	75
DISCUSSÃO.....	75
CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO I - Aprovação do projeto pelo CEUA.....	105
ANEXO II - Submissão do artigo à Revista Plos One.....	106

LISTA DE TABELAS

PARTE II.....	42
Table 1: Effects of apocynin treatment on maximum response (R_{max}) and sensitivity (pD2) to phenylephrine.....	65

LISTA DE FIGURAS

PARTE I.....	15
Figura 1: Mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela apocinina.....	38
PARTE II.....	42
Figure 1. Effect of apocynin treatment on systolic and diastolic blood pressure.....	66
Figure 2. Effect of apocynin treatment on the vascular relaxation to acetylcholine and sodium nitroprusside.....	67
Figure 3. Effect of apocynin treatment on vasoconstrictor response to phenylephrine.....	68
Figure 4. Effect of apocynin treatment on endothelial modulation of vasoconstrictor response to phenylephrine.....	69
Figure 5. Effect of apocynin treatment on NO modulation of vasoconstrictor response to phenylephrine.....	70
Figure 6. Effect of apocynin treatment on ROS effects of vasoconstrictor response to phenylephrine.....	71
Figure 7. Effect of apocynin treatment on lipid peroxidation and thiol groups in plasma.....	72
Figure 8. Effect of apocynin treatment on SOD and GPx activity.....	73
Figure 9. Effect of apocynin treatment on prostanoids modulation of vasoconstrictor response to phenylephrine.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetato de desoxicorticosterona e sal – DOCA-sal

Angiotensina II – Ang II

Ânion superóxido – $O_2^{\cdot-}$

Área abaixo da curva – dAUC

Cálcio ATPase – Ca^{+2} -ATPase

Canais de potássio mitocondriais sensíveis ao ATP – mitoKATP

Catalase – CAT

Ciclooxigenase – COX

Cinábrio – HgS

Cloreto de mercúrio – $HgCl_2$

Cobre-zinco superóxido dismutase – CuZnSOD

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA

Diabetes Mellitus – DM

Dissulfeto isomerase – PDI

Dose letal mediana – DL50

Endothelial-Derived Relaxing Factor – EDRF

Environmental Protection Agency – EPA

Enzima conversora de angiotensina – ACE

Espécies reativas de oxigênio – ROS

Estados Unidos da América – EUA

Extracelular superóxido dismutase – EcSOD

Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio – EDHF

Glutathiona oxidada – GSSG

Glutathiona peroxidase – GPx

Glutathiona redutase – GR

Glutathiona reduzida – GSH

Gramas por 24 horas – g/24h

Grupo amida (R-CO)NH₂

Grupo amina – R-NH₂

Grupo carboxil – COOH

Grupo fosforil – PH₃

Grupo sulfidril – SH

Lipoproteína de baixa densidade – LDL

L-NG-Nitroarginina metil ester – L-NAME

Malondialdeído – MDA

Mangânês superóxido dismutase – MnSOD

Mercúrio – Hg

Microgramas por grama – µg/g

Microgramas por litro – µg/l

Microgramas por metro cúbico – µg/m³

Microgramas por quilograma por dia – µg/kg/dia

Mieloperoxidase – MPO

Miligramas por litro – mg/l

Miligramas por metro cúbico – mg/m³

Miligramas por quilograma – mg/kg

Mililitros – ml

Molécula de água – H₂O

Monóxido de carbono – CO

Nanogramas por mililitro – ng/ml

Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase – NADPH oxidase

Organização Mundial de Saúde – OMS

Óxido nítrico – NO

Óxido nítrico sintase – NOS

Óxido nítrico sintase constitutiva – c-NOS

Óxido nítrico sintase induzida – i-NOS

Oxigênio molecular – O₂

Peróxido de hidrogênio – H₂O₂

Peróxido de nitrito – •ONOO⁻

Prostaciclina – PGI₂

Prostaglandina - PG

Prostaglandina H sintase – PGH sintase

Quociente de inteligência – QI

Radical hidroxil – OH[•]

Radical peroxil – ROO[•]

Ratos espontaneamente hipertensos – SHR

Resposta máxima – Rmax

Sistema Nervoso Central – SNC

Sódio-Potássio ATPase – NKA

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS

Sulfeto de hidrogênio – H₂S

Superóxido dismutase – SOD

Timerosal – EtHg

Tromboxano A₂ – TA₂

Wistar Kyoto – WKY

Xantina oxidase – XO

PARTE I

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa

EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA AORTA E ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE AO CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂)

Autora: Danize Aparecida Rizzetti
Orientadora: Giulia Alessandra Wiggers Peçanha
Co-orientador: Franck Maciel Peçanha
Local e Data da defesa: Uruguiana, 26 de setembro de 2012

O mercúrio aumenta o risco de doença cardiovascular, estresse oxidativo, e altera a reatividade vascular. Este metal induz disfunção endotelial, como resultado da diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) por aumento do estresse oxidativo e produção de prostanóides contráteis. A enzima NADPH oxidase é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) na vasculatura. Nosso objetivo foi investigar se o tratamento com apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, evita os efeitos vasculares causados pela intoxicação crônica por baixas concentrações de mercúrio. Para isso, ratos machos *Wistar* de três meses de idade foram tratados durante 30 dias com: a) Não-tratado (injeções intramusculares - im - de solução salina, b) HgCl₂ (im, primeira dose de 4,6 ug/kg, e doses subsequentes de 0,07 ug/kg/dia), c) Apo (1,5 mM de apocinina em água de beber e salina im); d) ApoHg (tratamento com mercúrio e apocinina) Tratamento com mercúrio: 1) aumentou a resposta vasoconstritora à fenilefrina na aorta e reduziu a resposta dependente do endotélio à acetilcolina, 2) aumentou o envolvimento de ROS e prostanoides vasoconstritores em resposta à fenilefrina enquanto reduziu a modulação de NO endotelial de tais respostas, 3) reduziu a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) da aorta e aumentou os níveis de malondialdeído (MDA) plasmático. O tratamento com apocinina preveniu parcialmente o aumento da resposta à fenilefrina e reduziu a disfunção endotelial induzida pelo mercúrio. Além disso, aumentou a modulação de NO das respostas vasoconstritoras, a atividade da SOD aórtica e reduziu os níveis plasmáticos de MDA, sem afetar o aumento da participação de prostanóides vasoconstritores observados na aorta de ratos tratados pelo mercúrio. Conclusões: O mercúrio aumenta a resposta vasoconstritora à fenilefrina pela redução da biodisponibilidade de NO e aumenta a participação de ROS e prostanoides vasoconstritores. A apocinina protege o vaso dos efeitos deletérios causados pela NADPH oxidase, mas não dos causados pelos prostanoides, demonstrando a ação de duas vias independentes nos danos cardiovasculares desenvolvidos pelo metal.

Palavras-chave: Mercúrio, Intoxicação Crônica, Apocinina, Reatividade Vascular

ABSTRACT

Dissertation of Master
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

EFFECT OF ANTIOXIDANT TREATMENT ON THE VASCULAR REACTIVITY OF AORTA AND OXIDATIVE STRESS IN RATS CHRONICALLY EXPOSED TO MERCURIC CHLORIDE (HgCl₂)

Author: Danize Aparecida Rizzetti
Advisor: Giulia Alessandra Wiggers Peçanha
Co-advisor: Franck Maciel Peçanha
Site and Date of Defence: Uruguiana, September 26, 2012

Mercury increases the risk of cardiovascular disease and oxidative stress and alters vascular reactivity. This metal elicits endothelial dysfunction causing decreased NO bioavailability via increased oxidative stress and contractile prostanoid production. NADPH oxidase is the major source of reactive oxygen species (ROS) in the vasculature. Our aim was to investigate whether treatment with apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, prevents the vascular effects caused by chronic intoxication with low concentrations of mercury. Three-month-old male Wistar rats were treated for 30 days with a) intramuscular injections (*i.m.*) of saline; b) HgCl₂ (*i.m.* 1st dose: 4.6 µg/kg, subsequent doses: 0.07 µg/kg/day); c) Apocynin (1.5 mM in drinking water plus saline *i.m.*); and d) Apocynin plus HgCl₂. The mercury treatment resulted in 1) an increased aortic vasoconstrictor response to phenylephrine and reduced endothelium-dependent responses to acetylcholine; 2) the increased involvement of ROS and vasoconstrictor prostanoids in response to phenylephrine, whereas the endothelial NO modulation of such responses was reduced; and 3) the reduced activity of aortic superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) and increased plasma malondialdehyde (MDA) levels. Treatment with apocynin partially prevented the increased phenylephrine responses and reduced the endothelial dysfunction elicited by mercury treatment. In addition, apocynin treatment increased the NO modulation of vasoconstrictor responses and aortic SOD activity and reduced plasma MDA levels without affecting the increased participation of vasoconstrictor prostanoids observed in aortic segments from mercury-treated rats. Conclusions: Mercury increases the vasoconstrictor response to phenylephrine by reducing NO bioavailability and increasing the involvement of ROS and constrictor prostanoids. Apocynin protects the vessel from the deleterious effects caused by NADPH oxidase, but not from those caused by prostanoids, thus demonstrating a two-way action.

Keywords: Mercury, Chronic intoxication, Apocynin, Vascular reactivity

INTRODUÇÃO

1 Mercúrio

1.1 Propriedades físico-químicas do mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal pesado, pertencente ao grupo II B da Tabela Periódica, extremamente volátil que se apresenta no estado líquido à temperatura ambiente e a 0°C. Não apresenta funções biológicas, e é considerado um agente potencialmente tóxico ao oferecer grande risco de contaminação (AZEVEDO, 2003).

O mercúrio pode derivar de fontes naturais ou antropogênicas. A maior fonte natural ocorre pelo desgaste da crosta terrestre, onde é encontrado na forma de cinábrio (HgS) e possui emissão estimada em cerca de 2.700 a 6.000 toneladas anuais. As fontes antropogênicas, com índices de emissão crescentes (2.000 a 3.000 toneladas/ano), derivam da produção industrial de geradores de eletricidade a carvão, refinarias, fábricas de adubos, lâmpadas de vapor de mercúrio, pilhas, extração do ouro e incineração de resíduos hospitalares e urbanos (FURST & RADDING, 1998).

A origem e características das principais fontes antropogênicas de mercúrio no Brasil mudaram drasticamente nas últimas três décadas. As fontes industriais eram responsáveis por praticamente a totalidade das emissões antropogênicas de mercúrio até a década de 70. No entanto, a partir da imposição de algumas restrições quanto ao uso do Hg pelo Ministério da Saúde e da Agricultura (BRASIL, 2010), houve uma redução do uso de mercúrio na indústria brasileira e hoje esta fonte representa menos de 30% da emissão total. A partir destas regulamentações, principal carga de mercúrio para o meio ambiente passou a ser oriunda dos garimpos de ouro e dejetos urbanos (LACERDA, 1997).

O mercúrio está presente em diversas formas e pode encontrar-se em três estados de oxidação (0, +1, +2), em geral facilmente interconvertíveis na natureza. Tanto os humanos, como os animais estão expostos a todas as formas através do ambiente. O mercúrio metálico ou elementar, no estado de oxidação zero (Hg⁰) existe na forma líquida à temperatura ambiente, é volátil e libera vapor de mercúrio, um gás monoatômico que representa um perigo para a população. Nesta forma é estável, podendo permanecer na atmosfera por meses ou anos, revelando-

se muito importante no ciclo do mercúrio, pois pode sofrer oxidação e formar os outros estados: o mercurioso, Hg^{+1} , quando o átomo de mercúrio perde um elétron e o mercúrico, Hg^{+2} , quando perde dois elétrons. Quando se combina com elementos como cloro, enxofre ou oxigênio, obtêm-se os compostos de mercúrio inorgânicos, também designados como sais de mercúrio (sais mercuriosos e mercúricos). Por outro lado, se um átomo de mercúrio se liga covalentemente a pelo menos um átomo de carbono, dá origem a compostos de mercúrio orgânico (metilmercúrio, etilmercúrio, fenilmercúrio) (CLARKSON, 1997; AZEVEDO, 2003).

Essas diferentes formas de apresentação do Hg no ambiente determinam diferentes níveis de toxicidade aos compostos por ele constituídos. A dose letal mediana (DL50), que é um indicativo do grau de toxicidade, para o mercúrio elementar por via intraperitoneal em ratos é de 63 mg/kg (GALVÃO & COREY, 1987). Já para o mercúrio inorgânico (cloreto de mercúrio- HgCl_2), por via oral em humanos é de 29 a 50 mg/kg (SALGADO, 2003). Com relação à permanência deste metal no organismo humano, o metilmercúrio apresenta meia-vida de 50 a 70 dias (SKERFVING & COPPLESTONE, 1976). O mercúrio metálico inalado sob a forma de vapor apresenta uma meia-vida de 35 a 90 dias enquanto os sais inorgânicos do metal possuem meia-vida no organismo de 37 dias e nas hemácias de 16 dias (GOYER, 1986).

A eliminação do mercúrio do organismo ocorre pelos rins, fígado (via bile), mucosa intestinal, glândulas sudoríparas e salivares, pele e leite materno, sendo as vias urinária e fecal as mais importantes (SWIFT, 1997). Embora a maior parte do mercúrio absorvido seja eliminada em cerca de 60 a 70 dias, traços deste metal podem ser detectados no organismo por meses ou anos pois deposita-se nos tecidos, demonstrando que o contato humano com este metal constitui uma ameaça à saúde.

1.2 Utilização do mercúrio

O contato do homem com o mercúrio, remonta às civilizações orientais antigas, que manipulavam o metal, tendo sido também encontrado no interior de tumbas egípcias. Anterior à era cristã, os chineses usavam o sulfeto de mercúrio (HgS), na produção de tintas e pinturas, dominando o processo da redução do sulfeto a metal. Com a Revolução Industrial e a difusão do uso do mercúrio em várias atividades

humanas, houve um grande aumento na emissão ao meio ambiente. Seu uso mais antigo na atividade industrial foi na fabricação de espelhos (AZEVEDO, 2003; VECCHIO, 2005).

Posteriormente o uso do metal foi disseminado para os mais diversos setores da indústria, como na produção de instrumentos de medidas (termômetros e barômetros), lâmpadas fluorescentes e como catalisador em reações químicas. O metal também passou a ser utilizado na indústria de explosivos, na indústria farmacêutica (produção de vacinas, antissépticos e diuréticos) e odontológica (restauração dentária com amálgama), além de ser incluído como componente de fungicidas e inseticidas, largamente utilizados na agricultura no século passado (GIODA *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, os elevados índices de exposição humana ao Hg pela contaminação ambiental foram considerados problema de saúde pública e tornaram-se foco de atenção dos setores públicos. Medidas foram tomadas para reduzir a exposição humana ao metal no Brasil (BERNHOF, 2012), e o Ministério da Saúde proibiu a fabricação e a venda de produtos farmacológicos e medicamentos que continham em sua fórmula, isoladas ou associadas, substâncias compostas de mercúrio, exceto em vacinas para imunização, nas quais o timerosal (etilmercúrio) ainda é utilizado como conservante, por recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS). É este o caso da vacina H₁N₁, das vacinas contra difteria e tétano e em algumas vacinas contra hepatite B (BRASIL, 2010; BARREGARD, *et al.*, 2011). O Ministério da Agricultura, através da Portaria MAPA nº 6 de 29 de abril de 1980, proibiu o uso de fungicidas alquilmercuriais (metil e etil), os quais eram usados na agricultura como desinfetantes no tratamento de sementes destinadas ao plantio (BRASIL, 2010).

Atualmente o mercúrio na forma metálica continua sendo utilizado na fabricação de instrumentos para laboratório, incluindo termômetros, eletrodos, barômetros, instrumentos para medir pressão arterial e como catalisador (células de mercúrio para solda eletrolítica; em energia atômica). Além disso, também está presente na eletrólise para preparação de cloro e soda na indústria de cloro-álcali e como corante na produção de tintas. Outra forma de uso do Hg metálico atualmente é na fabricação de amálgamas dentárias, que consistem de aproximadamente 50% de mercúrio combinado a outros metais (35% de prata e 15% de cobre e vestígios de zinco). Nesta forma, ocorre sua emissão sob a forma de vapor, o qual é inalado e

absorvido. Os profissionais de saúde e a população em geral que entram em contato com esse material ou possuem amálgamas dentárias estão expostos a esta forma de contaminação (GIODA *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2012).

A maior parte dos resíduos industriais desse metal é despejada no meio ambiente e sedimenta-se no fundo dos oceanos onde, pela ação de bactérias processadoras de sulfato, transforma-se em outro composto ainda mais tóxico, o metilmercúrio. Esse pode contaminar o plâncton e os peixes, chegando, por fim, ao topo da cadeia alimentar, ou seja, à espécie humana, podendo promover quadros graves e, muitas vezes, irreversíveis de intoxicação (RISHER, *et al.*, 2003).

1.3 Formas de Intoxicação por mercúrio e limites seguros de exposição

O primeiro desastre ambiental de repercussão mundial que expôs o risco eminente da intoxicação por mercúrio ocorreu em 1953 na Baía de Minamata, no Japão, onde uma indústria química despejou resíduos industriais de metilmercúrio no efluente do rio, contaminando a biota marinha e chegando até a população através da ingestão de peixes e frutos do mar. O número de mortes pela intoxicação chegou a 20% e o de vítimas graves com sequelas neurológicas chegou a mais de 2.000 (BERINGHS-BUENO, 2005). Outros acidentes no Irã, Paquistão e Guatemala causados pelo uso de metilmercúrio como fungicida para tratamento de sementes de grãos permitiram confirmar o problema do uso intensivo do mercúrio e os graves prejuízos decorrentes de sua intoxicação, afetando praticamente todos os sistemas do organismo (AZEVEDO, 2003).

A intoxicação por Hg pode ser de forma aguda ou crônica, por baixas ou altas doses. A forma aguda de contato com compostos mercuriais inorgânicos pode ocorrer quando o indivíduo é submetido a elevadas concentrações. A intoxicação aguda se dá, geralmente, em altas concentrações, após vazamentos em processos industriais, e/ou durante jornadas de trabalho prolongadas, em ambientes fechados e contaminados. Os sinais e sintomas iniciais são a sensação de sabor metálico desagradável na boca, acompanhada da sensação de queimadura e adstringência na garganta, podendo se propagar posteriormente para todo o tubo digestivo, havendo, concomitantemente, processo de inflamação da língua, lábios e partes da mucosa bucal. Esses sinais e sintomas podem ser acompanhados por náusea, vômitos, dor abdominal, diarreia e cefaleia (BERINGHS-BUENO, 2005).

A intoxicação crônica por Hg resulta frequentemente da exposição permanente e por períodos prolongados a pequenas quantidades do metal. Podem ser encontradas em pessoas que trabalham em atividades que utilizam o Hg orgânico ou inorgânico, como em garimpos (AZEVEDO, 2003). O sistema nervoso central (SNC) é especialmente atingido na intoxicação crônica por Hg⁰ e os sinais clínicos relatados são mudança comportamental, tremor, distúrbios sensoriais e dificuldades auditivas e visuais (FRIBERG & VOSTAL, 1972; MILLER *et al.*, 1975; XING, *et al.*, 2009). Nas exposições crônicas, observa-se o quadro clínico denominado mercurialismo crônico, que consiste, essencialmente, em alterações provocadas no SNC (autônomo e periférico) representadas por tremor de extremidades (principalmente dedos), eretismo psíquico e distúrbios vasomotores. Incluem-se também sob esta denominação as alterações da mucosa oral e de glândulas salivares, com gengivites, estomatites e ptialismo (SIKORSKI *et al.*, 1987; SOLEO *et al.*, 1990).

Os valores admissíveis para a presença do Hg no meio ambiente e nos organismos vivos são estabelecidos por normas específicas que determinam limites de tolerância biológica (GRIGOLETTO *et al.*, 2008; GIUBERTI, 2010). O mercúrio é considerado pela *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos da América (EUA) um dos mais nocivos poluentes atmosféricos conhecidos, responsável por inúmeros danos à saúde. Em 1990 foi criada a lei norte-americana *Clean Air Act*, a qual levou a EPA a estabelecer padrões e limites de tolerância à exposição ao mercúrio, a fim de reduzir drasticamente a emissão deste metal pelas principais fontes poluidoras do país, as indústrias de cloro-álcali (AZEVEDO, 2003).

A EPA estabeleceu que as emissões de Hg em locais de processamento de minerais e em indústrias de cloro-álcali não deve ultrapassar o valor de 2.300 g/24h; em zonas de incineradores de lixo e lodo de esgoto, o limite máximo é de 3.200 g/24h (USEPA, 1998). Para o solo e a água potável, o limite máximo do metal, segundo a EPA, é de 0,087 µg/g e de 2 µg/l, respectivamente. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu para a água potável o limite de 0,0002 mg/l de mercúrio e para as salinas e salobras 0,0001 mg/l, para os solos residenciais 36 mg/kg e 70 mg/kg para os industriais. O Brasil também estabeleceu limites para o pescado, fixado em 0,5 mg/kg para peixes não predadores e 1,0 mg/kg para peixes predadores (LEI 685, 1998). Para as vacinas, as concentrações de timerosal (EtHg) variam de 12,5 µg/Hg a 25 µg/Hg para cada dose de 0,5 ml de

vacina. Porém, segundo a EPA, o ideal seria que não ultrapassasse a concentração de 0,1 µg/kg/dia. O Ministério do Trabalho e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 10004, 2004) também normatizaram os valores de tolerância do metal para o ambiente de trabalho, fixando o mesmo em até 0,04 mg/Hg/m³.

Não existe normatização brasileira estabelecendo limites para exposição de Hg por meio de amálgama dentária, porém nos EUA estipulou-se que o nível máximo de exposição ocupacional por manuseio de amálgamas seja de 50 mg/m³. Em indivíduos que fazem uso de restauração de amálgama, a concentração de mercúrio inorgânico no sangue é de cerca de 4 µg/l (VAMNES *et al.*, 2000) e de 2,55 µg/l de mercúrio total em indivíduos com cerca de 19,9 superfícies de amálgama (KINGMAN *et al.*, 1998). A EPA estima que cada amálgama libere de 3 µg a 17 µg de vapor de mercúrio por dia. Já a concentração no sangue relatada em populações não expostas é de aproximadamente 3 µg/l (WHO, 1990).

Para pessoas não expostas ao Hg, a OMS considera como limites seguros a concentração sanguínea média de 5 a 10 µg/l (WHO, 1990). Já o NRC (National Research Council) identifica 2 µg/l como a concentração sanguínea média para populações com pouco ou nenhum consumo de peixe nos EUA (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2000). O nível normal de mercúrio definido para o cabelo é de 1-2 µg/g em pessoas não expostas e concentração de até 5 µg/g de creatinina (WHO, 1990). A EPA considera segura concentração sanguínea de mercúrio de até 5,8 ng/ml, valor significativamente menor que o estipulado pela OMS. Alguns estudos relataram que a concentração de mercúrio no sangue de populações não expostas é de cerca de 1 ng/ml, enquanto que em trabalhadores expostos ao mercúrio ou em residentes de Guizhou (China), uma área que é conhecida por sofrer contaminação por este metal, os níveis são entre 7 e 10 ng/ml. Em um estudo na cidade de Nova York, a população adulta não exposta ao mercúrio apresentou uma concentração sanguínea de 2,73 ng/ml e os consumidores regulares de peixes apresentaram 5,65 ng/ml (USEPA, 1998).

Estes valores de referência são baseados em diversos estudos que demonstram os efeitos deletérios da exposição aguda e crônica ao mercúrio. A maior parte dessas pesquisas utilizam doses elevadas do metal, demonstrando que as mesmas podem ser fatais para o ser humano. Porém, outros estudos em animais têm demonstrado que mesmo doses relativamente baixas, que determinam concentrações sanguíneas similares às apresentadas por humanos expostos ao

metal (em torno de 8 ng/ml) podem ter repercussões adversas graves no organismo, alterando parâmetros fisiológicos e bioquímicos importantes, especialmente no sistema cardiovascular (WIGGERS *et al.*, 2008; PEÇANHA *et al.*, 2010). Este fato evidencia uma preocupação eminente de que tais limites determinados pelas organizações internacionais citadas acima podem não ser considerados seguros para a população e devem ser revistos.

1.4 Mecanismo de toxicidade do mercúrio

A elevada toxicidade do Hg parece estar relacionada ao fato de possuir afinidade aos grupos tiol das diversas enzimas celulares nos microssomas e na mitocôndria, ligando-se covalentemente a eles e promovendo a interrupção do metabolismo e da função celular (STOHS & BAGCHI, 1995). O metal também pode se ligar a outros grupos químicos, embora com uma menor afinidade, como o fosforil (PH_3), carboxil (COOH), amina (R-NH_2 , amina primária) e amida (R-CO-NH_2) (CUNHA, 2008). Entre os possíveis mecanismos de toxicidade encontram-se inativação de enzimas, proteínas estruturais e processos de transporte ou alteração da permeabilidade da membrana celular (STOHS & BAGCHI, 1995). A sua toxicidade parece estar associada também aos seus efeitos pró-oxidantes e, conseqüentemente, a sua capacidade de contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical hidroxil (OH^\bullet), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BRANDÃO *et al.*, 2008). Além de promover o aumento da produção de ROS, a exposição ao Hg também pode ocasionar alterações no sistema de defesa do organismo ao reduzir os níveis enzimáticos das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx), como também da glutatona (GSH), contribuindo para o estresse oxidativo (RIBAROV & BENOVA, 1981).

1.5 Efeitos tóxicos do mercúrio no organismo

Danos resultantes de exposições ao mercúrio têm sido descritos e evidenciam os inúmeros efeitos tóxicos, sendo estes dependentes do tempo, da forma e da concentração ao qual o indivíduo foi exposto (VASSALLO *et al.*, 2011). Em animais neonatos submetidos à exposição aguda a elevadas concentrações do metal foi

observado retardo no ganho de peso corporal e no crescimento (EMANUELLI *et al.*, 1996; PEIXOTO, 2000; PEIXOTO, 2006). Também já foi descrito na literatura danos aos sistemas nervoso (ZHENG *et al.*, 2003a; ZHENG *et al.*, 2003b), renal (ZALUPS & LASH, 1994), pulmonar (SENER *et al.*, 2007), reprodutivo (ANDERSON, 1992), hepático (HUANG, 1996), imunológico (MILLER, 1998) e cardiovascular (VASSALLO *et al.*, 1996).

No SNC, estudos demonstraram que a intoxicação aguda provoca ataxia, disartria, parestesia, perda da audição, cegueira, retardo mental, espasmos mioclônicos e hiperreflexia (VROOM & GREER, 1972). A intoxicação aguda também promove alterações em neurônios ganglionares, aumento do número de mitocôndrias e redução do retículo endoplasmático rugoso no tecido cerebral (FUJIMURA & USUKI, 2012). Com relação à intoxicação crônica, o SNC é especialmente prejudicado neste tipo de exposição, apresentando como sinais e sintomas principais as alterações de comportamento com irritabilidade, tremor anormal e reflexos exagerados. Além disso, distúrbios psíquicos e alterações no ciclo do sono também já foram relatados (WALDRON, 1983).

Um estudo demonstrou correlação entre a exposição ao mercúrio e o baixo quociente de inteligência (QI) em crianças na Nova Zelândia (ECCLES *et al.*, 1982). Outras pesquisas, analisando os mecanismos fisiopatológicos pelos quais o mercúrio promove tais danos, demonstraram que esses efeitos tóxicos no SNC provêm de anormalidades em migrações neuronais, apoptoses e perdas de contato interneuronais (WALDRON, 1983; SOLEO *et al.*, 1990; DE JESUS *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2012).

A intoxicação aguda pelo mercúrio também afeta sobremaneira o sistema renal, o qual pode sofrer extensa necrose de células epiteliais e do túbulo proximal. A filtração glomerular pode ser prejudicada e acarretar perdas de grandes quantidades de moléculas fundamentais ao organismo, como a glicose e aminoácidos. Tais danos podem culminar com insuficiência renal aguda e morte do indivíduo. A forma crônica de exposição pode acarretar reações autoimunes que geram lesão glomerular e dano tubular renal, com perdas de enzimas importantes ao metabolismo, como as lisossomais e a glutamil transferase (BELGHITI *et al.*, 1986).

Foi evidenciada a presença de glomerulonefrite e síndrome nefrótica em animais expostos ao mercúrio na sua forma elementar. O aumento da excreção de proteínas de baixo e alto peso molecular (proteinúria) e o aumento da atividade de

algumas enzimas lisossomais tubulares na urina muitas vezes são os primeiros indicadores de disfunção renal após a exposição ocupacional ao mercúrio elementar (FRANKO *et al.*, 2005).

A exposição aguda e crônica ao mercúrio também promove sérias alterações hepáticas. A exposição aguda pode provocar edema e necrose e a exposição crônica, casos graves de hepatite. Com relação ao sistema respiratório, a intoxicação aguda ao mercúrio elementar, na forma de vapor, provoca bronquiolite e pneumonite, as quais, a longo prazo, geram fibrose pulmonar (AZEVEDO, 2003).

Os efeitos do mercúrio sobre o sistema reprodutor foram particularmente estudados em mulheres, as quais demonstraram, após exposição crônica ao mercúrio elementar, aumento no número de abortos espontâneos, natimortos e malformação congênita dos fetos. O mercúrio causa, tanto em humanos quanto em animais alterações hormonais graves, afetando o eixo hipófise-hipotálamo, alteração nos níveis de estrogênio, promovendo perturbações menstruais, infertilidade e efeitos teratogênicos, de redução das ovulações, além de redução da contagem espermática e dos níveis de testosterona, a produção de espermatozoides defeituosos e, em mulheres (SHEINER *et al.*, 2003; BURDORF *et al.*, 2006; CHALUPKA *et al.*, 2010). Atualmente, maior ênfase tem-se dado aos danos do mercúrio sobre o sistema reprodutor, tanto feminino quanto masculino, e há evidências de que o metal se acumula em praticamente todos os órgãos deste sistema, incluindo ovários, testículos e próstata (JACKSON *et al.*, 2011).

1.5.1 Efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema cardiovascular

O aumento do conhecimento sobre a função vascular, incluindo os mecanismos de regulação do tônus derivados do endotélio e do papel das enzimas, tais como a Sódio-Potássio ATPase (NKA), Enzima Conversora de Angiotensina (ACE), Ciclooxigenase (COX) e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidase (NADPH oxidase), e das espécies reativas de oxigênio tem sido amplamente obtido e relacionado com metais pesados, visto que foi verificada a ocorrência de disfunção endotelial, hipertensão e doenças vasculares associadas à exposição ao Hg (CHEN *et al.*, 2012). Recentemente observou-se que o endotélio vascular é afetado tanto por baixas como por altas concentrações de Hg e isso demonstra a importância e a

necessidade de desvendar os mecanismos pelos quais este metal pode promover o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (VASSALLO *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram a associação da exposição ao mercúrio com o aumento do risco de doença cardíaca coronariana (GANTHER *et al.*, 1972; GUALLAR *et al.*, 2002), arritmias (MASSARONI *et al.*, 1995), infarto do miocárdio (SALONEN *et al.*, 1999), acidentes cerebrovasculares (SALONEN *et al.*, 2000), aterosclerose generalizada (CLARKSON *et al.*, 2002b) e hipertensão (MACHADO *et al.*, 2007). As formas orgânicas e inorgânicas do metal podem acumular-se no coração e causar a elevação da pressão arterial e anormalidades no ritmo cardíaco (NRC, 2000).

Pesquisas sugerem que o Hg administrado de forma aguda a elevadas concentrações promove redução dos níveis de GSH e de outras enzimas antioxidantes no tecido vascular, promovendo estresse oxidativo (HOUSTON, 2007). Na forma aguda, em baixas concentrações este metal tem efeito inotrópico positivo e em altas concentrações atua deprimindo a contratilidade cardíaca (VASSALLO *et al.*, 1999; DA CUNHA *et al.*, 2000). Ashe *et al.* (1953) observaram que em coelhos a exposição a baixas concentrações de vapor de mercúrio promoveu necrose no sistema cardiovascular, e também há relatos de que a exposição aguda ao mercúrio inorgânico (HgCl₂) reduz a atividade eletromecânica, a condução átrio-ventricular, o desenvolvimento de força e da pressão sistólica em corações isolados expostos a baixas concentrações (MASSARONI *et al.*, 1992). Estudos sugerem que o estresse oxidativo promovido pelo Hg também está presente durante exposição crônica a baixas concentrações, atuando de forma deletéria sobre o sistema cardiovascular (VASSALLO *et al.*, 1996).

Além do aumento do estresse oxidativo (DA CUNHA *et al.*, 2000), inflamação, trombose e agregação plaquetária (HOUSTON, 2007) e disfunção do músculo liso vascular e disfunção endotelial (KISHIMOTO *et al.*, 1995; ROSSONI *et al.*, 1999; DA CUNHA *et al.*, 2000; WIGGERS *et al.*, 2008), é descrito na literatura que ratos expostos cronicamente a baixas doses de Hg sofrem alterações nos vasos e no coração, como disfunção mitocondrial, com inibição da atividade da NKA miocárdica (HALBACH *et al.*, 1981; OLIVEIRA & VASSALLO, 1992) e diminuição da hidrólise de ATP (OLIVEIRA *et al.*, 1991) e da atividade da Ca⁺²-ATPase (KABEER *et al.*, 1988), aumento na expressão proteica da NADPH oxidase (WIGGERS *et al.*, 2008; FURIERI *et al.*, 2011), aumento na liberação de prostanóides vasoconstritores

derivados da COX-2 (PEÇANHA *et al.*, 2010; GIUBERTI, 2010), diminuição do conteúdo de GSH (CLARKSON, 1997) e aumento da peroxidação lipídica (WIGGERS *et al.*, 2008).

Para analisar com maior detalhe e precisão os efeitos da exposição crônica a doses extremamente baixas de Hg, recentemente, foi desenvolvido um modelo experimental animal de exposição crônica a baixas doses de HgCl₂, no qual, ao final de 30 dias de tratamento com doses nanomolares do metal, os ratos apresentaram concentrações sanguíneas semelhantes às encontradas em humanos que vivem em regiões contaminadas ou que sofrem exposição ocupacional (8 ng/ml) (WIGGERS *et al.*, 2008). O modelo desenvolvido possui concentrações sanguíneas de Hg muito próximas aos valores considerados seguros pela OMS (5,8 ng/ml), e apesar de não ser observada mudança nos níveis pressóricos sanguíneos dos animais ou em seu ganho ponderal, a exposição a estas doses foi capaz de promover alterações endoteliais importantes, com disfunção endotelial secundária ao aumento do estresse oxidativo, aumento da resposta contrátil a fenilefrina e redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina, redução das defesas antioxidantes e redução da biodisponibilidade de NO. Estas alterações endoteliais desencadeadas pelo mercúrio neste modelo experimental podem explicar o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares promovidas pela exposição crônica, mesmo em concentrações próximas aos limites considerados seguros pelas organizações de saúde e de meio ambiente (WIGGERS *et al.*, 2008; PEÇANHA *et al.*, 2010; FURIERI *et al.*, 2011).

2 Endotélio Vascular

O endotélio vascular era considerado até a década de 80 apenas uma barreira passiva sem funções fisiológicas vasculares (FELIZZOLA *et al.*, 1996). A partir de experimentos utilizando a acetilcolina, Furchgot e Zawadski (1980) demonstraram sua participação na dilatação vascular. Atualmente inúmeras funções para o endotélio estão descritas, como o controle do tráfego de pequenas e grandes moléculas, a manutenção da estrutura da parede vascular, a contribuição na formação do coágulo, a promoção do crescimento de novos vasos sanguíneos e a regulação da dilatação e da contração vascular, seja em resposta a alterações do

fluxo sanguíneo ou a agentes vasoativos (CARVALHO *et al.*, 2001; BATLOUNI, 2001).

O endotélio exerce o controle do tônus vascular por ser um local ativo de síntese de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e considerado um verdadeiro sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo. As principais substâncias vasoconstritoras e agregadoras plaquetárias sintetizadas pelo endotélio são as endotelinas, os endoperóxidos (prostaglandina H₂ e tromboxano A₂), leucotrienos, angiotensina II (Ang II) e ROS. Dentre as substâncias vasodilatadoras e antiplaquetárias encontram-se o óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI₂), outras prostaglandinas (PG) e bradicinina (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A integridade do endotélio é essencial à regulação do tônus vascular e à estrutura dos vasos, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e aterogênese. A disfunção endotelial é um importante evento inicial da aterogênese e do desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar e infarto agudo do miocárdio (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; DA SILVA, 2000; MELO *et al.*, 2004). A disfunção endotelial caracteriza-se como a incapacidade do endotélio em promover o relaxamento vascular, devido à redução da produção ou da biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, principalmente do NO (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

2.1 Óxido Nítrico (NO)

Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (VARGAS E VIEIRA, 2009). Porém, a partir das conclusões de Furchgott e Zawadzki (1980) de que a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, era inteiramente dependente da presença do endotélio intacto e envolvia a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, o qual chamaram de *endothelial-derived relaxing factor* (EDRF), houve o crescimento no interesse a respeito do NO e suas múltiplas funções no endotélio vascular (DUSSE *et al.*, 2003).

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina (VIARO *et al.*, 2000). Esta reação é

catalisada pela enzima NO-sintase (NOS). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos, as quais foram agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (ZAGO & ZANESCO, 2006).

A síntese da c-NOS é ativada por diversos agonistas, como acetilcolina, catecolaminas e Ang II, e estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento (VIARO *et al.*, 2000). Já a síntese da isoforma i-NOS é independente de Ca^{++} e induzida por citocinas, expressando-se em macrófagos, células musculares lisas, mesangiais e em células da microcirculação (VIARO *et al.*, 2000).

Dentre as inúmeras as funções do NO, fazem parte a vasodilatação dependente do endotélio, a citotoxicidade mediada por macrófagos, a regulação da pressão arterial, a transmissão sináptica e o controle da adesão dos elementos sanguíneos ao endotélio, diminuindo a permeabilidade vascular. Seus efeitos no endotélio dependem da expressão da NOS, da biodisponibilidade de fatores que regulam a sua atividade e dos ROS (CHATTERJEE & CATRAVAS, 2008).

A redução na produção ou na biodisponibilidade de NO tem sido relatada como a responsável pelo aumento da resistência vascular periférica e pelo surgimento de doenças cardiovasculares em modelos *in vivo* (HIGASHI *et al.*, 2002). A produção excessiva ou não compensada de ROS é considerada a principal promotora das alterações de biodisponibilidade de NO. O endotélio vascular é muito sensível ao estresse oxidativo e a biodisponibilidade de NO pode ser reduzida pela sua ligação ao $\text{O}_2^{\cdot-}$ produzido em excesso durante situações de estresse oxidativo. Grandes quantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$ formadas, principalmente pela enzima NADPH oxidase, captam o NO, promovendo a formação de peróxido de nitrito ($\cdot\text{ONOO}^-$) e reduzindo sua difusão para o músculo liso vascular, gerando diminuição da vasodilatação e alterações de reatividade vascular e pressão arterial (WOLF & BAYNES, 2007; SHARMA, *et al.*, 2009).

Além de ter sido observada em modelos animais de doenças cardiovasculares, como a hipertensão (MCLNTYRE *et al.*, 1999), a redução da biodisponibilidade do NO no leito vascular, verificou-se esta redução também em modelos de exposição aguda e crônica ao mercúrio. Nestes estudos evidenciou-se disfunção endotelial e alterações na reatividade vascular e na pressão arterial como

consequência do estresse oxidativo gerado pelo metal (WIGGERS *et al.*, 2008a; WIGGERS *et al.*, 2008b; PEÇANHA *et al.*, 2010; GIUBERTI, 2010).

3 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e Estresse oxidativo

O acúmulo de metais pesados no organismo humano representa um risco significativo para a saúde, levando a uma grande variedade de doenças, associadas, ao menos em parte, aos efeitos pró-oxidantes destes metais e suas capacidades de contribuírem para a geração de ROS, como o OH^\bullet , o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 . O aumento da produção de ROS pode resultar na extensiva diminuição das defesas antioxidantes, acarretando uma condição conhecida como estresse oxidativo (BRANDÃO *et al.*, 2008).

O termo ROS refere-se a um átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Os ROS são encontrados em todos os sistemas biológicos. Durante a fosforilação oxidativa, a redução do oxigênio molecular (O_2) para água (H_2O) requer quatro elétrons e pode ocorrer por duas vias. A primeira ocorre na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, tendo a reação catalisada pela citocromo oxidase como o passo final desse processo. Nesse caso, nenhum intermediário de O_2 é formado e a redução tetravalente do O_2 é calculada em aproximadamente 95–98% do total de O_2 consumido (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Na segunda via, a fração restante de 2–5% pode dar origem à formação de ROS pela redução univalente do O_2 .

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é um dos principais ROS formados no metabolismo celular. É menos reativo que o H_2O_2 e formado a partir da redução do O_2 com um elétron. Em condições fisiológicas é gerado principalmente nas mitocôndrias, microssomas e peroxissomas através da ação da enzima nicotinamida NADPH oxidase. Apresenta meia-vida mais longa do que o OH^\bullet , sendo capaz de reagir com as moléculas por mais tempo. As reações desencadeadas pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ podem gerar os radicais OH^\bullet e peróxil (ROO^\bullet). Em meio ácido, este ROS rapidamente forma H_2O_2 . Em meio neutro ou de alto pH, a dismutação do superóxido é catalisada pela enzima SOD. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ apresenta pequena reatividade molecular, e é duvidosa a sua capacidade de causar danos significativos às estruturas celulares. Porém, pode reagir com o NO para

formar o $\bullet\text{ONOO}^-$, capaz de oxidar e transferir nitrato para aminoácidos de várias proteínas, causando a inibição dessas (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005).

Um dos principais mecanismos de lesão celular pelo estresse oxidativo é a lipoperoxidação, ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. Além disso, o estresse oxidativo pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos ROS, porém a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (SILVEIRA, 2004).

Embora a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial seja reconhecidamente um dos principais sítios de produção de ROS, outras diferentes fontes podem produzir estas espécies. Estudos apontam múltiplos sistemas enzimáticos produtores de ROS e seus derivados, sendo os principais componentes a NADPH oxidase, a ciclooxigenase (COX), a lipoxigenase, citocromo P450, a xantina oxidase (XO), a mieloperoxidase (MPO) e a óxido nítrico sintase (NOS), as quais produzem diversas espécies de ROS (OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2) (ZHANG *et al.*, 2008a; ZHANG *et al.*, 2008b). Porém, a mais importante fonte destas substâncias, tanto em células endoteliais como musculares lisas é a NADPH oxidase, a qual é a principal produtora do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ (BESWICK *et al.*, 2001), extremamente envolvido na fisiopatologia de inúmeras doenças cardiovasculares, e, principalmente, no mecanismo de disfunção endotelial verificado na exposição ao mercúrio (HAMILTON *et al.*, 2002).

3.1 Enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase

A enzima NADPH oxidase foi originalmente considerada expressa apenas em células fagocíticas envolvidas na defesa do hospedeiro e na imunidade inata. É agora evidente que há uma família de NADPH oxidases, com base nos homólogos da subunidade catalítica fagocítica gp91phox, que são funcionalmente ativos em células não-fagocíticas (RABÊLO *et al.*, 2010). Os novos homólogos, juntamente

com gp91phox, são designados por família Nox de NADPH oxidases e são importantes na produção de ROS vascular. O protótipo da NADPH oxidase fagocítica (agora denominada NOX-2) compreende as seguintes subunidades: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox, e a subunidade catalítica gp91phox. Em condições basais, p47phox, p67phox, e p40phox existem no citosol, enquanto p22phox e gp91phox estão localizadas na membrana, onde ocorrem como uma flavoproteína heterodimérica (citocromo b558). Após a estimulação, p47phox e p67phox formam um complexo que se transloca para a membrana, onde se associa com o citocromo b558 para montar a oxidase ativa, a qual, por fim, transfere elétrons a partir do substrato a O_2 , formando o $O_2^{\cdot-}$ (ALTENHÖFER *et al.*, 2012).

A família NOX em mamíferos compreende sete membros: NOX-1, NOX-2 e NOX-3 E NOX-4 E NOX-5, DUOX-1, E DUOX-2. Todos são proteínas transmembrana que têm uma subunidade catalítica núcleo (NOX) e numerosas subunidades reguladoras. NOX-1, NOX-2, NOX-4, e NOX-5 foram identificadas em tecido cardiovascular e renal. A hiperativação dos NOX leva à excessiva geração de ROS que rompem redes redox, normalmente reguladas por sistemas antioxidantes tiol-dependentes. Isso resulta em estresse oxidativo, desencadeando processos moleculares, os quais, na vasculatura, contribuem para lesão vascular (AFONSO *et al.*, 2010).

O aumento dos níveis de $O_2^{\cdot-}$ por essa enzima no tecido vascular provoca uma perda de NO, conseqüentemente alterando a vasodilatação e o relaxamento do endotélio e contribuindo para a disfunção endotelial. Além disso, em lesões ateroscleróticas mais avançadas, os ROS derivados da NADPH oxidase podem exercer um papel crucial na sua progressão, uma vez que os radicais podem contribuir para a oxidação da lipoproteína de baixa densidade LDL, a produção local da proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), o estímulo das moléculas de adesão, o recrutamento de macrófagos, a disfunção endotelial e o remodelamento da matriz extracelular através da degradação de colágeno, o que favorece uma eventual ruptura da placa aterosclerótica (AFONSO *et al.*, 2010). Apesar de terem sido identificadas quatro subunidades reguladoras no tecido cardiovascular, os principais componentes do complexo enzimático NADPH oxidase expressos nas células vasculares são as subunidades NOX-1 e NOX-4, aumentados durante o processo de remodelamento vascular, como na hipertensão e aterosclerose (RABÊLO *et al.*, 2010).

A NOX-1, originalmente identificada nas células tumorais do cólon, é expressa em células vasculares e cardíacas. Está localizada na membrana celular, em cavéolas lipídicas e endossomas. A produção de $O_2^{\cdot-}$ pela NOX-1 pode ser aumentada dependendo da forma e do estímulo, envolvendo complexas interações entre subunidades reguladoras e a proteína chaperona dissulfeto isomerase (PDI). Esta subunidade tem sido relacionada à migração de células do músculo liso vascular e produção e proliferação de matriz extracelular, efeitos mediados pela cofilina. Em culturas de células musculares lisas e endoteliais, a NOX-1 é regulada por fatores mecânicos (estresse de cisalhamento), agentes vasoativos, como a Ang II e aldosterona, e fatores de crescimento (ALTENHÖFER *et al.*, 2012).

Estudos recentes demonstraram que a expressão e a atividade da NOX-1 está aumentada no tecido vascular de modelos animais de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, aterosclerose, diabetes e hipercolesterolemia. Em camundongos transgênicos NOX-1 *knock-out* sugerem um possível papel para a NOX-1 na hipertensão aguda induzida pela Ang II. Embora existam extensos dados experimentais implicando NOX-1 na doença cardiovascular, há pouca informação em seres humanos, embora já esteja comprovada a expressão aumentada da NOX-1 em vasos humanos ateroscleróticos (ADEAGBO *et al.*, 2005; MALDONADO *et al.*, 2009).

A subunidade NOX-4 é encontrada em células vasculares, fibroblastos, osteoclastos e é abundantemente expressa no rim. Em células musculares lisas do leito vascular, a NOX-4 co-localiza-se com a p22phox e está vinculada a adesões focais, proliferação e migração celular, angiogênese e diferenciação celular. A NOX-4 foi identificada no retículo endoplasmático, mitocôndrias e núcleo de células vasculares. Esta subunidade não parece exigir p47phox, p67phox, p40phox para a sua ativação, como na subunidade NOX-1, embora recentemente foi demonstrada a necessidade de uma polimerase interagindo com a NOX-4 para sua ativação (RABÊLO *et al.*, 2010; BREWER *et al.*, 2011).

Ao contrário da NOX-1 e NOX-2, a NOX-4 é constitutivamente ativa, produzindo principalmente H_2O_2 , em vez de $O_2^{\cdot-}$. A diferença nas espécies geradas fundamentam as ações NOX-específicas na sinalização celular. A NOX-4 contribui para a produção de ROS basal através da sua atividade constitutiva e pode haver, ainda, o aumento da produção de espécies reativas quando estimulada por Ang II, glicose e fatores de crescimento. O papel patológico da NOX-4 não é claro, embora

tenha sido implicada na hipertensão, aterosclerose, nas complicações cardiovasculares e renais decorrentes do diabetes e na remodelação pulmonar de artérias na hipertensão pulmonar (ALTENHÖFER *et al.*, 2012). Além de estudos envolvendo modelos animais de hipertensão, modelos animais de exposição a metais pesados, como mercúrio, já evidenciaram o aumento da atividade da enzima NADPH oxidase com consequente estresse oxidativo e danos endoteliais (HOUSTON *et al.*, 2007). Estes estudos, porém, ainda não estão claros quanto às subunidades afetadas pela exposição ao metal, nem quanto ao mecanismo de atuação do mercúrio sobre estas subunidades.

3.2 Enzima ciclooxigenase (COX)

A ciclooxigenase (COX), também conhecida como PGH sintase, é uma enzima bifuncional ligada à membrana, que catalisa a conversão de ácido araquidônico para prostaglandina G₂ (PGG₂) pela sua atividade de ciclooxigenase, e de PGG₂ a prostaglandina H₂ (PGH₂) pela sua atividade de peroxidase. É o passo limitante da velocidade na biossíntese das prostaglandinas (PG) biologicamente ativas e fisiologicamente importantes (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Duas isoformas de COX foram identificadas, a COX-1 e COX-2, a primeira é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e a segunda opera como uma enzima induzível com níveis baixos ou indetectáveis na maioria dos tecidos, e sua expressão pode ser aumentada por um número de citocinas inflamatórias, fatores mitogênicos e estímulos físicos. Embora a COX-1 e a COX-2 apresentem um nível elevado de homologia (65%), a atividade e expressão destas enzimas são reguladas diferencialmente, podendo funcionar independentemente dentro do mesmo tipo de célula (FÉLÉTOU *et al.*, 2011).

Ácidos graxos, tais como o ácido araquidônico, são o substrato preferencial da COX-1, enquanto que a COX-2 utiliza como substratos tanto ácidos graxos, como também o glicerol 2-araquidonil. Portanto, a COX-2 pode gerar um grupo de produtos que a COX-1 não pode sintetizar. Ambas as COX dependem da presença de peróxidos lipídicos para a sua ativação, mas a ativação da COX-2 requer uma concentração dez vezes menor de hidroperóxido do que a COX-1, sugerindo que a COX-2 pode funcionar na presença de COX-1, sem que esta última seja ativada (SMITH & SONG, 2002).

Vários eicosanoides biologicamente ativos são formados a partir da PGH₂, a qual é um componente de curta duração, mas biologicamente ativo, através da ação de um conjunto de PG-sintases, prostaglandinas D (PGD), E (PGE), F (PGF), IGP e tromboxano sintases. As cinco PGs primárias formadas, PGD₂, PGE₂, PGF_{2a}, PGI₂ e tromboxano A₂ interagem com receptores prostanóides (P) acoplados à proteínas G transmembrana, classificados em cinco subtipos (DP, EP, PF, IP e receptores de TP) em função de sua afinidade preferencial para as PGs (SILVEIRA, 2004).

A ativação da COX também se constitui como fonte de O₂^{-•} devido a sua capacidade de co-oxidar substâncias como o NADPH. A modificação oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados por via não enzimática pode gerar isoprostanos, muitas vezes utilizados como marcadores de estresse oxidativo e associados a várias doenças cardiovasculares, incluindo a estenose coronária (FÉLÉTOU *et al.*, 2011). Além de fonte de ROS, a via da COX também pode alterar o sistema cardiovascular por meio dos prostanóides produzidos por ambas isoformas, principalmente pelas isoformas presentes no endotélio vascular. Estes prostanóides atuam sobre o leito vascular promovendo tanto a vasodilatação como a vasoconstrição, e estão diretamente relacionados ao controle do tônus e da reatividade vascular em situação fisiológica e patológica (ANTMAN *et al.*, 2005).

O tônus vascular é regulado, entre outros fatores, por prostanóides derivados da via da COX produzidos pelo endotélio. Vários autores demonstraram a produção de prostanóides contráteis em resposta a agonistas alfa-adrenérgicos e de outros agentes vasoconstritores. Em vasos sanguíneos saudáveis, os prostanóides são formados predominantemente pela isoforma constitutiva da COX (COX-1). No entanto, estes mediadores podem também ser sintetizados pela isoforma induzível (COX-2); esta isoforma não é normalmente expressa, mas pode ser induzida por agentes tais como lipopolissacárido ou citocinas em diferentes tipos celulares, como células do músculo liso, endotélio e adventícia (DA CUNHA *et al.*, 2000; DIDION *et al.*, 2003; ELIGINI *et al.*, 2005).

Estudos recentes com modelos animais de hipertensão demonstraram existir maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular à fenilefrina. Fatores exógenos, como a exposição ao mercúrio, também já mostraram atuar sobre a via da COX, promovendo o aumento dos prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2

tanto na exposição aguda quanto crônica ao metal (WIGGERS *et al.*, 2008; PEÇANHA *et al.*, 2010).

4 Mecanismos antioxidantes

Para o perfeito equilíbrio no organismo e manutenção de suas atividades fisiológicas, a atividade dos sistemas enzimáticos produtores de ROS é neutralizada por um poderoso e complexo sistema de defesa antioxidante presente em nosso corpo. Estes mecanismos de defesa estão divididos em enzimático e não enzimático. O sistema enzimático inclui as enzimas SOD, CAT e Gpx, as quais desempenham suas funções de forma equilibrada e integrada para a manutenção da funcionalidade celular. A SOD é a enzima responsável pela catálise através da redução e da oxidação univalente do $O^{\cdot -}$ a H_2O_2 e O_2 . Em humanos existem três formas enzimáticas: uma citoplasmática ligada aos íons metálicos cobre e zinco (CuZnSOD), uma mitocondrial ligada ao manganês (MnSOD) e uma extracelular (EcSOD) (AFONSO *et al.*, 2010).

A CAT é uma enzima cuja função principal é a de promover a decomposição H_2O_2 em H_2O e O_2 , protegendo as células do estresse oxidativo, uma vez que o H_2O_2 altera o estado redox da célula reagindo diretamente com resíduos tióis das proteínas redox-sensíveis ou modificando a razão GSH/GSSG (ANDERSON *et al.*, 2009). Já a GPx tem a função bioquímica de reduzir os hidroperóxidos lipídicos em seus alcoóis correspondentes, bem como o H_2O_2 livre em H_2O e GSSG. A família Gpx possui quatro isoformas e integra o grupo de selenoproteínas, pois contém selênio em seu sítio ativo (JAN *et al.*, 2011).

O sistema não enzimático de defesa inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros, ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides) (MONTERA, 2007; AFONSO *et al.*, 2010). Estes dois mecanismos estão constantemente ativos e desempenhando suas funções de forma integrada para a neutralização de espécies reativas de oxigênio que em excesso promovem desequilíbrio e alterações funcionais, contribuindo para a manutenção da integridade de nosso organismo (JAN *et al.*, 2011).

5 Tratamento antioxidante na exposição ao mercúrio

Quando o organismo humano sofre algum tipo de agressão ou é acometido por agentes produtores de ROS, os mecanismos antioxidantes existentes, muitas vezes, não conseguem atuar no combate ao excesso de radicais livres formados, gerando estresse oxidativo e tornando-se necessário o uso de substâncias com potencial antioxidante. Como já descrito anteriormente, o mercúrio é um agente promotor de estresse oxidativo no organismo responsável pelos mais diversos danos em diferentes órgãos e sistemas (MEINERZ *et al.*, 2011). Dessa forma, nos últimos anos alguns estudos analisando diferentes compostos com ação antioxidante já foram testados em modelos experimentais de intoxicação por metais pesados, na tentativa de prevenir ou reverter os prejuízos causados ao organismo, incluindo aqueles promovidos pelo Hg (MALDONADO *et al.*, 2009; DURAK *et al.*, 2009; MEINERZ *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que o Ácido L-ascórbico (vitamina C) e o ácido α -tocoferol (vitamina E) atuam como poderosas substâncias antioxidantes com propriedades anti-cancerígenas, anti-clastogênicas e anti-mutagênicas em uma variedade de modelos *in vivo* e *in vitro* de exposição ao cloreto de mercúrio, sendo capazes de neutralizar diversos ROS e minimizar a peroxidação lipídica em sistemas biológicos (DURAK *et al.*, 2009). Recentemente também foi evidenciada atividade antioxidante do selênio em modelos animais de exposição ao metilmercúrio, sendo visualizada para este composto uma atividade catalítica semelhante à da enzima glutationala peroxidase, envolvendo a redução de peróxidos, à custa de compostos tiol (MEINERZ *et al.*, 2011).

A literatura descreve a administração de inibidores farmacológicos da NADPH oxidase como antioxidantes indiretos em modelos animais de hipertensão, porém não há relatos de seu uso em modelos animais de exposição ao mercúrio (ÁLVAREZ *et al.*, 2005; CHAN *et al.*, 2007; WILLIAMS & GRIENGLING, 2007; CIARCIA *et al.*, 2010). O DIP-difenileneiodônio e 4'-hidroxi-3-metoxiacetofenona (apocinina), têm sido largamente utilizados para bloquear a atividade da NADPH oxidase *in vitro*. (LAFEBER *et al.*, 1999; MALDONADO *et al.*, 2009). A apocinina tem múltiplas ações biológicas além dos efeitos antioxidantes, sendo caracterizada como um inibidor da NADPH oxidase desde a década de 80 e apresentando potencial

terapêutico para atuar contra o estresse oxidativo (REY *et al.*, 2001; MORA-PALE *et al.*, 2009).

5.1 Apocinina

A apocinina foi primeiramente descrita por Schmiedeberg em 1883 e isolada de raízes de *Apocynum cannabinum* (maconha canadense) e extratos que foram utilizados como remédios para problemas cardíacos (PARAVICINI *et al.*, 2002). Em 1971, a apocinina foi identificada durante o isolamento dos componentes imunomoduladores da raiz de *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae), uma planta nativa cultivada nas montanhas da Índia, Nepal, Tibete e do Paquistão, conhecida na medicina tradicional indiana (Ayurveda) (RIGANTI *et al.*, 2008). A apocinina é uma acetofenona com um peso molecular de 166,17, um ponto de fusão de 115 °C e que apresenta leve odor de baunilha. Apresenta baixa toxicidade, com DL50 de 9 g/kg após administração oral em camundongos. Tem sido usada como um eficiente inibidor do complexo NADPH oxidase em muitos modelos experimentais envolvendo células fagocíticas e não fagocíticas (HAMILTON *et al.*, 2002; DODD-O *et al.*, 2004; STEFANSKA & PAWLICZAK, 2008). O mecanismo de inibição não é totalmente conhecido, mas envolve o comprometimento da translocação para a membrana do componente citosólico p47phox do complexo NADPH oxidase (figura 1) (PETERS *et al.*, 2001; BARBIERI *et al.*, 2004).

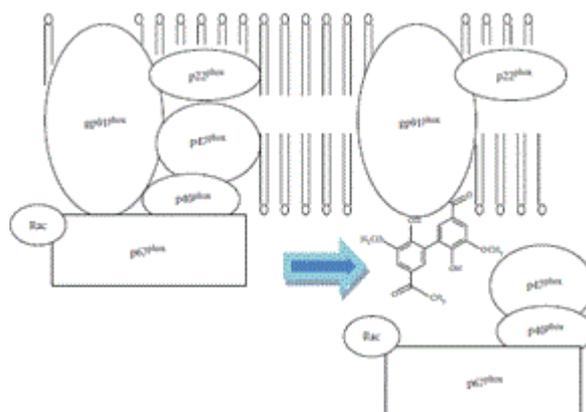


Figura 1: Mecanismo de inibição da NADPH oxidase pela apocinina. Modificada de RABÊLO *et al.*, 2010.

Muitos estudos relatam o uso da apocinina para avaliar o envolvimento do sistema NADPH oxidase em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Em modelos experimentais de suínos com lesão pulmonar causada por circulação extracorpórea (proporcionada pelo aumento de ROS derivados da NADPH oxidase), pré-tratados com altas doses de apocinina (400mg/kg) por via intravenosa, houve menor ativação basal de neutrófilos periféricos e menor geração de ROS nas células endoteliais quando comparados ao grupo controle (DODD-O *et al.*, 2004).

Em outro estudo, células endoteliais de cordão umbilical foram submetidas ao modelo de isquemia/reperfusão, levando à maior produção de ROS e expressão de moléculas de adesão, conhecidas como selectinas. A co-cultura dessas células com apocinina, além de inibir a geração de ROS, mostrou-se capaz de diminuir a expressão de selectinas (RUPIN *et al.*, 2004). A apocinina também foi capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares obtidas de pacientes portadores de artrite reumatoide (LAFEBER *et al.*, 1999). A geração de ROS e a liberação de citocinas podem ser suprimidas pela apocinina, a qual também apresenta propriedades tipicamente relacionadas aos anti-inflamatórios não esteroidais, ou seja, inibição da formação dos mediadores lipídicos da inflamação. Neste contexto, a forma induzível da COX, COX-2, foi inibida pela apocinina (BARBIERI *et al.*, 2004).

Em um modelo experimental da doença de *Huntington*, induzida pela injeção intraestriatal de ácido quinolínico, o aumento da atividade da NADPH oxidase parece estar envolvido nos danos causados por esta doença. Foi observado que a injeção intraperitoneal de apocinina levou à diminuição da atividade enzimática, diminuição da peroxidação lipídica e diminuição do dano histológico (MALDONADO *et al.*, 2009).

A apocinina mostrou ter aplicação promissora em estudos com modelos animais de hipertensão e outras doenças cardiovasculares. Em ratos *Dahl* sensíveis ao sal, a apocinina inibiu a produção de $O_2^{\cdot-}$ na medula renal e diminuiu a hipertensão arterial (BARBIERI *et al.*, 2004). Em ratos tratados com acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e NaCl (DOCA-sal induzidos), há um aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ em artéria aorta e rins, levando à hipertensão, a qual também foi atenuada pelo tratamento com apocinina (BESWICK *et al.*, 2001). Além disso, a apocinina mostrou-se eficaz no tratamento da hipertensão provocada por Ang II e aldosterona (HAMILTON *et al.*, 2002). Em outras pesquisas a apocinina diminuiu os

níveis de mRNA da subunidade p22phox da NADPH oxidase em segmentos de aorta de ratos *Sprague-Dawley* de modelos experimentais sal-aldosterona, e impediu a união da subunidade p47phox com o complexo membranar desta enzima em células endoteliais humanas, inibindo, assim sua produção de $O_2^{\cdot-}$. A apocinina também já demonstrou prevenir e reverter a hipertensão induzida por hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (RIGANTI *et al.*, 2008), indicando que a NADPH oxidase é uma importante fonte enzimática de $O_2^{\cdot-}$ em modelos animais de hipertensão natural e sintética.

6 Justificativa

O mercúrio é um metal tóxico para o ser humano, podendo ser absorvido por várias vias e depositado nos diferentes órgãos, provocando inúmeras alterações e riscos à saúde. Já está bem descrito na literatura que baixas concentrações sanguíneas deste metal, como as adquiridas no consumo de peixes contaminados ou no contato ou uso de amálgamas dentárias, são suficientes para alterar parâmetros fisiológicos importantes, inclusive no sistema cardiovascular. Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas que viabilizem meios para o conhecimento de substâncias capazes de prevenir e tratar os efeitos danosos decorrentes da intoxicação por metais pesados como esse sobre o sistema cardiovascular e, potencialmente, suas consequências clínicas em longo prazo, é necessário e fundamental para o futuro da saúde humana.

Este estudo se propõe verificar se o tratamento antioxidante, através da utilização da apocinina, um inibidor do complexo NADPH oxidase, é capaz de proteger o sistema cardiovascular dos efeitos tóxicos do mercúrio. Para tanto, foi utilizado um modelo experimental de exposição crônica e controlada a baixas concentrações de mercúrio que, ao final do período de exposição, apresentou concentrações sanguíneas de mercúrio semelhantes às encontradas em humanos expostos a este metal (WIGGERS *et al.*, 2008). É importante ressaltar que neste modelo experimental, embora não tenha sido notada alteração da pressão arterial, os ratos desenvolveram importantes alterações vasculares em vasos de condutância e de resistência. Isto indica que estudos complementares para verificar formas de reverter ou impedir estes danos com substâncias antioxidantes são necessários.

7 Objetivos

7.1 Objetivo geral

Verificar se o co-tratamento com o inibidor do complexo NADPH oxidase, apocinina, é capaz de prevenir ou atenuar as alterações na reatividade vascular da artéria aorta de ratos expostos cronicamente a baixas concentrações de cloreto de mercúrio (HgCl_2).

7.2 Objetivos específicos

Verificar se o co-tratamento com apocinina altera a pressão arterial sistólica e diastólica de ratos expostos cronicamente ao mercúrio;

Avaliar, em segmentos de artéria aorta, se este co-tratamento impede ou atenua as alterações promovidas pelo HgCl_2 na resposta contrátil à fenilefrina e na resposta relaxadora à acetilcolina, bem como a participação do endotélio nesta resposta;

Analisar se a apocinina previne as alterações promovidas pelo HgCl_2 na peroxidação lipídica e nos níveis de grupamentos tióis plasmáticos;

Observar o efeito da exposição ao HgCl_2 e do co-tratamento com apocinina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) do tecido aórtico.

PARTE II

APOCYNIN PREVENTS VASCULAR EFFECTS CAUSED BY CHRONIC EXPOSURE TO LOW CONCENTRATIONS OF MERCURY

Rizzetti, D.A.¹; Torres, J.G.D.¹; Escobar, A.G.¹; Peçanha, F.M.¹; Santos, F.W.¹; Puntel, R.L.¹; Alonso, M.J.³; Briones, A.M.⁴, Salaices, M.⁴; Vassallo, D.V.²; Wiggers, G.A.¹

¹ Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil.

² Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

³ Department of Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain.

⁴ Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain.

G.A. Wiggers: Giulia Wiggers: giuliawp@yahoo.com / giuliapecanha@unipampa.edu.br
– Programa de Pós Graduação em Bioquímica - PPGBioq - UNIPAMPA, BR 472 – Km 592 – postal code 118. Zip Code: 97500-970, Uruguaiana – Rio Grande do Sul, Brazil.
Phone: 55-55-34134321.

ABSTRACT

Mercury increases the risk of cardiovascular disease and oxidative stress and alters vascular reactivity. This metal elicits endothelial dysfunction causing decreased NO bioavailability via increased oxidative stress and contractile prostanoid production. NADPH oxidase is the major source of reactive oxygen species (ROS) in the vasculature. Our aim was to investigate whether treatment with apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, prevents the vascular effects caused by chronic intoxication with low concentrations of mercury. Three-month-old male Wistar rats were treated for 30 days with a) intramuscular injections (*i.m.*) of saline; b) HgCl₂ (*i.m.* 1st dose: 4.6 µg/kg, subsequent doses: 0.07 µg/kg/day); c) Apocynin (1.5 mM in drinking water plus saline *i.m.*); and d) Apocynin plus HgCl₂. The mercury treatment resulted in 1) an increased aortic vasoconstrictor response to phenylephrine and reduced endothelium-dependent responses to acetylcholine; 2) the increased involvement of ROS and vasoconstrictor prostanoids in response to phenylephrine, whereas the endothelial NO modulation of such responses was reduced; and 3) the reduced activity of aortic superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) and increased plasma malondialdehyde (MDA) levels. Treatment with apocynin partially prevented the increased phenylephrine responses and reduced the endothelial dysfunction elicited by mercury treatment. In addition, apocynin treatment increased the NO modulation of vasoconstrictor responses and aortic SOD activity and reduced plasma MDA levels without affecting the increased participation of vasoconstrictor prostanoids observed in aortic segments from mercury-treated rats. Conclusions: Mercury increases the vasoconstrictor response to phenylephrine by reducing NO bioavailability and increasing the involvement of ROS and constrictor prostanoids. Apocynin protects the vessel from the deleterious effects caused by NADPH oxidase, but not from those caused by prostanoids, thus demonstrating a two-way action.

Keywords: Mercury, Chronic intoxication, Apocynin, Vascular reactivity

INTRODUCTION

Mercury is a heavy metal that affects the activity of several enzymes, ion channels and receptors [1] by binding to the SH groups [2] that are necessary for normal enzyme function. This metal is a public health problem because many populations worldwide are exposed to mercury at levels that exceed the recommended safety guidelines [3]. Despite attempts to control industrial pollution, mercury poisoning still occurs from exposure to methylmercury (MeHg) from fish, ethylmercury from vaccine products, metallic mercury from dental amalgam fillings, cinnabar from Chinese herbal balls, and other sources of domestic mercury contamination [4,5].

The harmful effects of mercury during its accumulation in humans are mostly due to the excessive release of reactive oxygen species (ROS), the increased lipid peroxidation in the cells and the reduction of antioxidant defenses, thus inactivating important enzymes that are responsible for body's defenses, such as glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and GSH in different organs [6,7]. These effects are capable of damaging the integrity and altering the function of membranes, which can lead to the development of many pathological processes [8]. Because mercury exposure is associated with oxidative stress and endothelial dysfunction, more attention has been paid to its toxic effects on the cardiovascular system and its association with hypertension, carotid atherosclerosis, myocardial infarction, and coronary heart disease [9,10].

Previous studies from our group have demonstrated that oxidative stress caused by mercury exposure decreases the bioavailability of nitric oxide (NO) and alters the expression of NO synthase (NOS), leading to increased vasoconstriction, the reduction of endothelial vasodilator response and the stimulation of cyclooxygenase (COX)-derived vasoconstrictor prostanoids release [11–14]. NADPH oxidase, a multisubunit enzymatic complex, has been considered the major source of ROS in vascular cells [15] and has been suggested to be responsible for the endothelial dysfunction observed in different cardiovascular pathologies [10,16]. Interestingly, previous studies have also reported that the activation of NADPH oxidase may be associated with exposure to mercury in mesenteric and coronary arteries [12,14].

Therefore, the aim of this study was to assess whether treatment with the NADPH oxidase inhibitor apocynin can prevent or mitigate the changes caused by chronic exposure to low doses of mercury on a) the endothelial modulation of vasoconstrictor and vasodilator responses in conductance arteries; b) ROS and COX participation in these vascular responses; and c) ROS production and antioxidant activity.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Three-month-old male Wistar rats (290-310 g) were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. During treatment, rats were housed at a constant room temperature, humidity, and light cycle (12:12 h light-dark), free access to tap water and fed with standard chow *ad libitum*. All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology and approved by a local ethics committee (010/2011 CEUA-EMESCAM, Espírito Santo, Brazil).

Rats were divided into four groups and treated for 30 days as follows: a) Untreated (saline solution, *i.m.*); b) Mercury (HgCl₂) - mercury chloride (1st dose 4.6 µg/kg, subsequent doses 0.07 µg/kg/day, *i.m.*, to cover daily loss, using the model described by Wiggers *et al.* [17]); c) Apocynin (Apo) - apocynin (1.5 mM in drinking water plus saline solution, *i.m.*); and d) Apocynin-mercury (ApoHg) - mercury chloride plus apocynin.

Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure

Rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, *i.p.*), and after loss of the righting reflex, the carotid artery was cannulated with a polyethylene catheter (PE 10, Clay-Adams, NY, USA), filled with saline plus heparin (50 U/ml) to measure arterial pressure. SBP and DBP were measured using a pressure transducer (TSD104A) connected to an amplifier and an acquisition system (MP 150 Biopac Systems, Inc., CA, USA) and were continuously monitored. After a 30-min stabilization period, the SBP and DBP were obtained and recorded.

Blood collection and reactivity experiments

Rats were submitted to a surgical procedure to expose and puncture the renal artery; blood was subsequently collected to obtain plasma for the biochemical experiments. Thereafter, rats were euthanized by decapitation, and the thoracic aorta was carefully dissected out and cleaned of connective tissue. For reactivity experiments, the thoracic aorta was divided into segments that were 2 mm in length. For isometric tension recording, each aortic segment was set up in an organ bath

containing 5 ml of Krebs-Henseleit solution (KHS, in mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄ 7H₂O, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 11.1 glucose and 0.01 Na₂EDTA) at 37°C and continuously gassed with a 95%O₂-5%CO₂ mixture (pH=7.4). Two horizontally arranged stainless steel pins (75 µm in diameter) were passed through the lumen: one was fixed to the organ bath wall, and the other was vertically connected to a force-displacement transducer (TSD125BX8 - Biopac Systems, Inc) and a recorder (MP150WSW-SYS - Biopac Systems, Inc).

Aortic segments were subjected to a tension of 1.5 g that was readjusted every 15 min during a 60-min equilibration period before drug administration. Vessels were initially exposed to 75 mM KCl to check their functional integrity, and the presence of endothelium was confirmed by the ability of acetylcholine (10 µM) to relax segments contracted with phenylephrine at a concentration that produces close to 50% of the contraction induced by 75 mM KCl. After 60 min of washout, a single concentration-response curve to phenylephrine (0.01 nM – 300 µM) was performed.

To evaluate the role of the endothelium in the vasoconstrictor response to phenylephrine, some rings had their endothelium removed mechanically, and its absence was confirmed by the inability of acetylcholine to induce relaxation greater than 10% of the previous contraction to phenylephrine. The effects of N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), indomethacin and apocynin were investigated by their addition 30 min before phenylephrine in vessels with an intact endothelium.

To evaluate the relaxation dependent and independent of the endothelium, concentration-response curves were performed with acetylcholine (0.01 nM – 300 µM) and sodium nitroprusside (SNP, 0.01 nM – 300 µM), respectively.

Lipid peroxidation in plasma

Plasma thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS) are lipid peroxidation products that are considered an expression of systemic oxidative stress and are measured as malondialdehyde (MDA) using a colorimetric method, as previously described by Ohkawa *et al.* [18], with modifications. Blood was collected by renal puncture and transferred into tubes containing the anticoagulant EDTA (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Plasma was obtained by centrifugation (1500xg, 4°C, 15 min). An aliquot of plasma was incubated with thiobarbituric acid 0.8% (TBA), phosphoric acid buffer 1% (H₃PO₄), and sodium dodecyl sulphate 0.8% (SDS) at 100°C for 60

min. The color reaction was measured at 532 nm against blanks (Spectrophotometer *Femto 600 S, FEMTO*, São Paulo, Brazil). The results were expressed as nanomoles of MDA per ml of plasma.

Thiol groups in plasma

The total concentration of thiol groups (SH) was measured using spectrophotometry at 412 nm, according to Ellman's method [19]. An aliquot of blood plasma was mixed with 10% SDS and 1 M phosphate buffer (pH 8), and the absorbance was measured at 412 nm (A0) against blank. Then, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid 10 mM (DTNB) was added followed by incubation at 37°C for 60 min. After incubation, the absorbance of the sample was again measured at 412 nm (A1). The result is the difference between A1-A0 and was expressed as nanomoles of thiol groups per ml of plasma.

Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity in aortas

SOD activity in aorta homogenate was assayed using spectrophotometry, as described by Misra and Fridovich [20]. This method is based on the capacity of SOD to inhibit the autoxidation of adrenaline to adrenochrome. The color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 26°C. Aortas were washed with ice-cold saline and rapidly homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1:10, w/v) and centrifuged at 2400xg for 15 min at 4°C. The supernatants (S1) were then separated. The S1 was diluted 1:10 (v/v) for determination of SOD activity on test day and added to a 50 mM glycine buffer (pH 10.3). The enzymatic reaction was started by adding 60 mM epinephrine, and the enzymatic activity was expressed as Units (U) per mg of protein.

GPx activity in aorta tissue was assayed using spectrophotometry using the method of Wendel [21] through the reduced glutathione (GSH)/ β tetrasodium salt (NADPH)/glutathione reductase system by the dismutation of H_2O_2 at 340 nm. In this assay, the enzyme activity was indirectly measured using an NADPH decay. H_2O_2 was decomposed, generating oxidized glutathione (GSSG) from GSH. GSSG was regenerated back to GSH by glutathione reductase present in the assay medium at the expense of NADPH. S1 was added to the GSH/NADPH/glutathione reductase system, and the enzymatic reaction was initiated by adding H_2O_2 4 mM. The

enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/ per min per mg protein. Proteins for both experiments were measured according to Bradford using bovine serum albumin as a standard.

Drugs and reagents

HgCl₂, apocynin, phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, SNP, urethane, L-NAME and indomethacin were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); heparin was purchased from Roche (São Paulo, SP, Brazil). Salts and reagents, when not specified, were of analytical grade obtained from Sigma and Merk (Darmstadt, Germany).

Data analysis and statistics

All values are expressed as the mean \pm SEM of the number of animals used in each experiment. In the vascular reactivity experiments, vasoconstrictor responses were expressed as the % of contraction induced by 75 mM KCl and vasodilator responses as the % of the previous contraction to phenylephrine. To compare the effect of L-NAME, apocynin and indomethacin on the response to phenylephrine in segments from the different groups, some results were expressed as 'differences of area under the concentration-response curves' (dAUC) in control and experimental situations. AUCs were calculated from the individual concentration-response curve plots; the differences were expressed as the percentage of the AUC of the corresponding control situation. The results were analyzed using either Student's t-test or two-way ANOVA for comparison between groups. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's post hoc test was used to compare individual means. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

No differences in body weight were observed between all groups before and after treatment with mercury, as previously described [17]. Apocynin alone or co-treatment with mercury plus apocynin did not change this parameter (data not shown).

Effect of apocynin treatment on systolic and diastolic blood pressure

Chronic treatment with low doses of mercury did not change either SBP or DBP. Apocynin decreased SBP and DBP in untreated rats; however, it was unable to exert this effect in the group treated concomitantly with mercury (Figure 1).

Apocynin treatment improves endothelium-dependent vasodilator responses and reduces vasoconstrictor responses in mercury-treated rats

Exposure to acetylcholine and SNP produced concentration-dependent relaxation in the aortic rings from all groups. As previously described [12], chronic exposure to mercury reduced the vascular response to acetylcholine and co-treatment with apocynin prevented this reduction (Figure 2A). SNP responses were similar in untreated, mercury-treated and mercury-treated plus apocynin (Figure 2B). Apocynin treatment did not affect the acetylcholine or SNP responses in the absence of mercury (data not shown). These results suggest that chronic exposure to low doses of mercury promoted endothelial dysfunction in the rat aorta, which was prevented by apocynin.

Vasoconstrictor responses to 75 mM KCl were similar ($P > 0.05$) in aortas from mercury (1.52 ± 0.24 g; $n=17$), apocynin (1.48 ± 0.27 g; $n=18$), and apocynin-mercury (1.46 ± 0.17 g; $n=16$) groups compared to the untreated group (1.53 ± 0.24 g; $n=19$). In apocynin-treated rats, the response to phenylephrine was similar to that of untreated rats (data not shown). Treatment with mercury for 30 days increased the vasoconstrictor responses induced by phenylephrine in endothelium-intact aortic rings, as previously described [13,17]. Co-treatment with apocynin partially prevented the increase in contractile response to phenylephrine in these arteries (Figure 3); thus, while mercury treatment increased the maximum response (R_{max}), this increase was not observed in rats co-treated with apocynin (Table 1).

Apocynin treatment diminishes the deleterious effect of mercury on endothelial NO modulation of vasoconstrictor responses

Mechanical removal of the endothelium caused a significant increase in the phenylephrine response in all groups (Figure 4, Table 1). The effect of endothelium removal was smaller in mercury-treated animals, as shown by the dAUC values, indicating that mercury treatment reduced the negative modulation induced by the endothelium of the contractile response to phenylephrine. In apocynin-treated rats, the effect of endothelium removal was similar to untreated rats, while the co-treatment of mercury with apocynin (Figure 4E) prevented the reduction of endothelial modulation.

To verify that the reduction of endothelial modulation in the vascular response to phenylephrine was due to alterations in the effects of NO, we used the NOS inhibitor L-NAME. This drug promoted an increase in the response to phenylephrine in arteries from both untreated and mercury-treated rats (Figure 5, Table 1). However, the dAUC values show that this increase was smaller in rats treated with mercury when compared to untreated (Figure 5E). Co-treatment with apocynin restored the potentiating effect of L-NAME in mercury-treated rats (Figure 5). In the group treated only with apocynin, L-NAME promoted increased sensitivity and maximal response to phenylephrine similar to that observed in the untreated group (Table 1). All of these results suggest that chronic treatment with low doses of mercury reduced NO bioavailability and its modulation of the contractile response to phenylephrine in rat aortas by the increase in superoxide anion production.

Apocynin reduces the increased participation of ROS in vasoconstrictor responses of mercury-treated rats

To further evaluate the contribution of oxidative stress in the vascular alterations induced by mercury, we assessed the role of superoxide anion in phenylephrine responses using apocynin (0.3 mM) *in vitro*. This drug decreased the phenylephrine responses in arteries from both untreated and mercury-treated rats (Figure 6, Table 1). However, this inhibitory effect was higher in rats treated with mercury compared to the effect observed in untreated rats (Figure 6E). Co-treatment with apocynin restored the inhibitory effect of apocynin (*in vitro*) in mercury-treated rats. *In vitro* apocynin incubation in rats treated with apocynin induced a decrease in the response to phenylephrine similar to that observed in untreated rats.

Effect of apocynin on lipid peroxidation and thiol groups in plasma

Chronic treatment with low doses of mercury promoted an increase in oxidative stress and lipid peroxidation, as demonstrated by increased plasma MDA levels. Apocynin co-treatment prevented the increase in plasma MDA levels (Figure 7A), suggesting that the superoxide anion produced by exposure to mercury might be the main ROS involved in this oxidative stress.

Mercury treatment also increased the plasma levels in SH groups (Figure 7B). Co-treatment with apocynin did not alter the increase of thiol groups resulting from exposure to the metal. In addition, SH groups were increased in the apocynin group (Figure 7B).

Effect of apocynin on superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity

Chronic exposure to low doses of mercury caused a reduction in aortic SOD activity (Figure 8A). Apocynin not only prevented this reduction, but it also increased the enzyme activity when compared to untreated animals both in the absence and presence of mercury (Figure 8A). In rats exposed to mercury for 30 days, a reduction in aortic GPx activity was also observed (Figure 8B). Apocynin failed to prevent this reduction caused by the metal (Figure 8B). This result suggests that apocynin does not act on the GPx pathway.

Apocynin treatment does not modify the participation of prostanoids on vasoconstrictor responses in mercury-treated rats

Previous studies have shown that the increased participation of COX vasoconstrictor prostanoids may be associated with oxidative stress, hypertension and increased vascular reactivity [22,23]. We found that the COX inhibitor indomethacin (1 μ M) reduced the response to phenylephrine more in arterial segments of mercury-treated than untreated rats (Figure 9, Table 1), as previously described [13]. Apocynin co-treatment of mercury-treated rats did not modify the effect of indomethacin on phenylephrine responses. These results suggest that in rats treated with mercury, there is greater participation of vasoconstrictor prostanoids derived from COX on the vasoconstrictor response to phenylephrine, which was not dependent on the observed increased oxidative stress.

DISCUSSION

The present study shows, for the first time, that apocynin treatment normalizes endothelial dysfunction in the aortas of rats chronically exposed to low doses of mercury chloride. This effect is likely due to its action on NADPH oxidase, preventing mercury-induced oxidative stress, as demonstrated by decreased plasma MDA and the increased activity of SOD, resulting in increased NO bioavailability in the aortic tissue. Our results also show that mercury increases phenylephrine responses by acting on oxidative stress and COX pathways. A blockade of NADPH oxidase partially prevents the mercury-induced phenylephrine hyperresponsiveness by reducing oxidative stress without affecting COX pathways.

Mercury has been identified as a hazard and risk factor for cardiovascular disease in humans [10]. The United States Environmental Protection Agency recommends a maximum blood concentration of mercury of 5.8 ng/ml; below this concentration, mercury exposure is considered to be without adverse effects [3,24]. Several studies have shown blood mercury level in residents of contaminated areas and in mercury-exposed workers ranging from 7 to 10 ng/ml [25]. In the present study, we used a controlled low-dose administration of mercury chloride and attained a blood mercury content of approximately 8 ng/ml [17], close to the human exposure levels.

It has been shown that mercury exposure increases the risk of hypertension, carotid atherosclerosis and coronary heart disease [26]. We have recently described that 30 days of exposure to low doses of HgCl₂ produces important vascular dysfunction in the aorta, coronary and mesenteric resistance arteries [12–14]. These effects can be explained, at least in part, by the oxidative stress caused by mercury, which is responsible for increasing the production of ROS, reduction of NO bioavailability and endothelial dysfunction. In fact, oxidative stress is well documented in mercury poisoning as demonstrated by increased lipid peroxidation [27] and decreased antioxidant defenses of the body [28,29]. The damage caused by this metal on the cardiovascular system can be attributed to the activation of many ROS sources, but to our knowledge, this is the first study demonstrating the essential role of NADPH oxidase in mercury-induced vascular dysfunction.

The effects caused by mercury exposure on blood pressure vary with the dose of metal and exposure time. Acute administration of a high concentration of mercury decreases arterial blood pressure in rats, [30,31] while chronic treatment showed the

opposite effect [9,32]. However, exposure to nanomolar doses of mercury does not promote changes in blood pressure [11–14]. The results obtained in this study confirm and extend previous findings [17], demonstrating that there are no changes in systolic and diastolic blood pressure by exposure to low doses of mercury. Interestingly, apocynin reduced systolic and diastolic blood pressures in the control rats, but it did not do so in the mercury-treated rats. We do not have a clear explanation of these findings, but possibilities include higher resistance to apocynin effects in mercury-treated animals by affecting other organs involved in blood pressure control such as the kidneys or heart. Future studies on these issues will clarify this point.

The exposure to mercury impaired vasodilator responses to acetylcholine, as previously shown [11–13]. Because the vascular response to sodium nitroprusside was unaffected by mercury, these findings suggest the presence of endothelial dysfunction secondary to the metal exposure, independent of smooth muscle sensitivity to NO. Apocynin administration normalized the impaired acetylcholine response in mercury-treated rats, suggesting that vascular NADPH oxidase plays a role in the endothelial dysfunction of conductance arteries in rats chronically exposed to low concentrations of mercury. The ability of apocynin to improve endothelial-dependent vasodilator responses has been described in different hypertension models [23,33,34]. In addition, we have previously demonstrated that when administered *in vitro* in the organ bath, apocynin also improved the impaired response to acetylcholine in aortas from mercury-treated rats [12].

In our study, we also observed an increase in vascular reactivity to phenylephrine in aortas of rats exposed to mercury. Similar findings were reported using either high or low mercury concentrations *in vitro* [11,17]. Furthermore, we observed that endothelium removal abolished this effect, suggesting that mercury produces changes at the endothelial level. This finding is reinforced by the mentioned decrease of the endothelium-dependent vasodilator response induced by acetylcholine. Importantly, co-treatment with apocynin prevents the above-mentioned changes, suggesting that mercury acts mainly through the activation of NADPH oxidase by affecting the endothelial modulation of phenylephrine responses. More specifically, mercury decreased NO availability, as demonstrated by the effect of L-NAME on phenylephrine responses being smaller in mercury-treated animals than in untreated animals and apocynin normalizing this effect.

As expected, the apocynin treatment of rats prevented the increased participation of superoxide anion in the contractile response to phenylephrine in the aortas of rats chronically exposed to HgCl₂. Previous studies have demonstrated that apocynin reverses endothelial NO dysfunction in animals or humans with elevated levels of oxidative stress [35]. Other authors have reported a protective effect of *in vivo* treatment with apocynin in experimental models of vascular injury associated with ROS overproduction [36–38]. Therefore, apocynin appears to be an effective NADPH oxidase inhibitor *in vivo* and acts to prevent vascular damage associated with oxidative stress increases such as chronic mercury exposure.

Although apocynin co-treatment affected phenylephrine responses, only a partial prevention of the mercury-induced effect was observed, indicating that other endothelial factors are also involved in the generation of the harmful effects induced by HgCl₂ intoxication. Indomethacin, a non-selective COX inhibitor, reduced the contractile response to phenylephrine in segments from all groups, but this reduction was greater in the group treated with mercury, showing that in this group, there was increased participation of the COX pathway in vascular responses. In agreement, we previously demonstrated the involvement of COX-derived vasoconstrictor prostanoids in the vascular effects of high concentrations of HgCl₂ [11] or in the same model as used here [13]. Some studies have demonstrated the existence of a reciprocal feed-forward relationship between the NADPH oxidase COX pathway in hypertension [22,34,39]. However, in our experimental conditions, co-treatment with apocynin did not modify the increased participation of the COX pathway in the contractile response to phenylephrine caused by mercury, indicating that activation of COX seems independent of oxidative stress generated by NADPH oxidase.

Exposure to HgCl₂ increases the levels of thiol (SH) groups as well as plasma lipid peroxidation, as evidenced by the increased levels of MDA. It has been described that Hg²⁺ reacts with SH groups, thus depleting intracellular thiols, especially glutathione (GSH), and causing cellular oxidative stress or predisposing cells to it [40] and forming free radicals that may further increase lipid peroxidation. However, in our experimental conditions, the increase in SH groups caused by mercury may be related to the time and concentration used and may generate a compensatory mechanism.

The increase in oxidative stress may be due to a decrease in the antioxidant defenses or to an increase in the production of ROS [41,42]. Our study showed that

exposure to mercury also reduced SOD and GPx activities. Similarly, Benov *et al.* [43] showed that mercury inhibits the activity of several antioxidant enzymes such as CAT, SOD and GPx in the blood, liver and kidneys of mercury-poisoned rats. It was also demonstrated that GPx and SOD activities were significantly lower in erythrocytes from occupationally-exposed workers [44]. Recently, it was further demonstrated that chronic exposure to high doses of methylmercury in drinking water reduced the activity of selenoproteins such as GPx in the cortex and cerebellum of mice, which was attributed to reduced gene expression of these enzymes [45]. In addition, Zalups *et al.* [7] observed that exposure to mercury may also reduce non-enzymatic antioxidant defenses, such as GSH, the major low-molecular-mass thiol compound present in virtually all mammalian tissues [46]. In contrast, in another study with occupational exposure to mercury in elementary form (Hg), increases in GSH, glutathione reductase (GR) and CAT activity were observed in erythrocytes from miners [8], which have been attributed to compensatory mechanisms due to low levels of exposure. The co-treatment with apocynin not only prevented the reduction in SOD activity caused by mercury in aortas but also promoted an increase in its activity. However, this was not the case for GPx, suggesting that NADPH oxidase-derived ROS are able to modulate SOD activity at the vascular level.

In summary, our results demonstrate for the first time that the NADPH oxidase inhibitor apocynin can partially prevent the increase in vascular reactivity to phenylephrine and improve the endothelial dysfunction in aortas of rats chronically exposed to nanomolar concentrations of mercury. This effect is due to the prevention of oxidative stress, lipid peroxidation and depletion of defense mechanisms caused by this metal. In addition, we demonstrated that mercury acts using two different and independent pathways, i.e., NADPH oxidase and COX, whereas only the NADPH oxidase pathway is affected by apocynin treatment. These results suggest that the therapeutic use of apocynin in preventing deleterious effects on the cardiovascular system caused by occupational exposure to mercury may have important clinical implications and should continue to be extensively studied.

Acknowledgements

This study was supported by and by grants from CAPES and CNPq/FAPES/FUNCITEC (39767531/07), Brazil, MICIIN (SAF 2009-07201, PHB2011-0001-PC) and ISCIII (Red RECAVA RD06/0014/0011), Spain. Ana M. Briones is supported through the Ramón y Cajal program (RYC-2010-06473).

REFERENCES

1. Prabhu SD, Salama G (1990) The heavy metal ions Ag⁺ and Hg²⁺ trigger calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 277: 47-55.
2. Yin Z, Milatovic D, Aschner JL, Syversen T, Rocha JB, Souza DO, Sidoryk M, Albrecht J, Aschner M (2007) Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res* 1131: 1-10.
3. Rice DC (2004) The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. *Environ Res* 95: 406-413.
4. Zhang Y, Gao D, Bolivar VJ, Lawrence DA (2011) Induction of autoimmunity to brain antigens by developmental mercury exposure. *Toxicol Sci* 119: 270-280.
5. Nyland JF, Fairweather D, Shirley DL, Davis SE, Rose NR, Silbergeld EK (2012) Low-dose inorganic mercury increases severity and frequency of chronic coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis in mice. *Toxicol Sci* 125: 134-143.
6. Lund BO, Miller DM, Woods JS (1993) Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 45: 2017-2024.
7. Zalups RK (2000) Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 52: 113-143.
8. Kobal AB, Prezelj M, Horvat M, Krsnik M, Gibicar D, Osredkar J (2008) Glutathione level after long-term occupational elemental mercury exposure. *Environ Res* 107: 115-123.
9. Wakita Y (1987) Hypertension induced by methyl mercury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 89: 144-147.
10. Houston MC (2007) The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med* 13: S128-S133.
11. da Cunha V, Souza HP, Rossoni LV, Franca AS, Vassallo DV (2000) Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. *Arch Environ Contam Toxicol* 39: 124-130.
12. Wiggers GA, Pecanha FM, Briones AM, Perez-Giron JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachafeiro V, Alonso MJ, Salaices M (2008) Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1033-H1043.

13. Pecanha FM, Wiggers GA, Briones AM, Perez-Giron JV, Miguel M, Garcia-Redondo AB, Vassallo DV, Alonso MJ, Salaices M (2010) The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. *J Physiol Pharmacol* 61: 29-36.
14. Furieri LB, Galan M, Avendano MS, Garcia-Redondo AB, Aguado A, Martinez S, Cachofeiro V, Bartolome MV, Alonso MJ, Vassallo DV, Salaices M (2011) Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* 162: 1819-1831.
15. Wakisaka Y, Miller JD, Chu Y, Baumbach GL, Wilson S, Faraci FM, Sigmund CD, Heistad DD (2008) Oxidative stress through activation of NAD(P)H oxidase in hypertensive mice with spontaneous intracranial hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1175-1185.
16. Chan EC, Datla SR, Dilley R, Hickey H, Drummond GR, Dusting GJ (2007) Adventitial application of the NADPH oxidase inhibitor apocynin in vivo reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits. *Cardiovasc Res* 75: 710-718.
17. Wiggers GA, Stefanon I, Padilha AS, Pecanha FM, Vassallo DV, Oliveira EM (2008) Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147: 252-260.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
19. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
20. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175.
21. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325-333.
22. Alvarez Y, Perez-Giron JV, Hernanz R, Briones AM, Garcia-Redondo A, Beltran A, Alonso MJ, Salaices M (2007) Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 381-388.
23. Tian XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang YX, Lee HK, Ng CF, Chen ZY, Yao X, Au CL, Lau CW, Vanhoutte PM, Cooke JP, Huang Y (2012) Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2alpha) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal* 16: 363-373.
24. National Academy of Sciences (2000) Toxicological Effects of Methylmercury. National Research Council, Washington, DC, USA .

25. McKelvey W, Gwynn RC, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, Palmer CD, Parsons PJ (2007) A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults. *Environ Health Perspect* 115: 1435-1441.
26. Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Tuomainen TP, Korhonen MJ, Valkonen VP, Seppanen K, Laukkanen JA, Salonen JT (2005) Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 228-233.
27. Huang YL, Cheng SL, Lin TH (1996) Lipid peroxidation in rats administered with mercuric chloride. *Biol Trace Elem Res* 52: 193-206.
28. El-Demerdash FM (2001) Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver, and blood of rats. *J Environ Sci Health B* 36: 489-499.
29. Kobal AB, Horvat M, Prezelj M, Briski AS, Krsnik M, Dizdarevic T, Mazej D, Falnoga I, Stibilj V, Arneric N, Kobal D, Osredkar J (2004) The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol* 17: 261-274.
30. Rhee HM, Choi BH (1989) Hemodynamic and electrophysiological effects of mercury in intact anesthetized rabbits and in isolated perfused hearts. *Exp Mol Pathol* 50: 281-290.
31. Massaroni L, Rossoni LV, Amaral SM, Stefanon I, Oliveira EM, Vassallo DV (1995) Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of mercury in anaesthetized rats and in langendorff perfused rat hearts. *Pharmacol Res* 32: 27-36.
32. Carmignani M, Boscolo P, Artese L, Del RG, Porcelli G, Felaco M, Volpe AR, Giuliano G (1992) Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats. *Br J Ind Med* 49: 226-232.
33. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL (2004) Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 22: 535-542.
34. Martinez-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 (2012) Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Antioxid Redox Signal*.
35. Hamilton CA, Brosnan MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF (2002) NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension* 40: 755-762.

36. Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC (2001) Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension* 37: 781-786.
37. Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC (2001) NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 38: 1107-1111.
38. Jin L, Beswick RA, Yamamoto T, Palmer T, Taylor TA, Pollock JS, Pollock DM, Brands MW, Webb RC (2006) Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 57: 343-357.
39. Sancho P, Martin-Sanz P, Fabregat I (2011) Reciprocal regulation of NADPH oxidases and the cyclooxygenase-2 pathway. *Free Radic Biol Med* 51: 1789-1798.
40. Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P (1983) Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol* 32: 2969-2972.
41. Hussain S, Atkinson A, Thompson SJ, Khan AT (1999) Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *J Environ Sci Health B* 34: 645-660.
42. Durak D, Uzun FG, Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender Y (2009) Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environ Toxicol* 24: 235-242.
43. Benov LC, Benchev IC, Monovich OH (1990) Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chem Biol Interact* 76: 321-332.
44. Bulat P, Dujic I, Potkonjak B, Vidakovic A (1998) Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. *Int Arch Occup Environ Health* 71 Suppl: S37-S39.
45. Zemolin AP, Meinerz DF, de Paula MT, Mariano DO, Rocha JB, Pereira AB, Posser T, Franco JL (2012) Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity in vivo. *Toxicology* 302: 60-67.
46. Clarkson TW, Magos L, Myers GJ (2003) The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* 349: 1731-1737.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of apocynin treatment on systolic and diastolic blood pressure.

Values of (A) systolic (SBP) and (B) diastolic blood pressure (DBP, mmHg) in the aorta of rats untreated (n=9) or treated with mercury (HgCl₂, n=8), apocynin (Apo, n=9) or apocynin plus mercury (ApoHg, n=9). The results are expressed as the mean±SEM, t test *P<0.05 vs. Untreated.

Figure 2. Effect of apocynin treatment on the vascular relaxation response to acetylcholine and sodium nitroprusside.

Concentration-response curves to (A) acetylcholine (ACh) and (B) sodium nitroprusside (SNP) in the aortas of rats untreated, treated with mercury (HgCl₂) or apocynin plus mercury (ApoHg) pre-contracted with phenylephrine. The results (mean±SEM) are expressed as a percentage of the response to phenylephrine. The number of animals used is indicated in parentheses. Two-Way ANOVA *P<0.05.

Figure 3. Effect of apocynin treatment on the vasoconstrictor response to phenylephrine.

Concentration-response curve to phenylephrine (Phe) in the aortas of rats untreated, treated with mercury (HgCl₂), and apocynin plus mercury (ApoHg). The results (mean±SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mmol/l KCl. The number of animals is indicated in parentheses. Two-Way ANOVA *P<0.05.

Figure 4. Effect of apocynin treatment on endothelial modulation of the vasoconstrictor response to phenylephrine.

Effect of endothelium denudation on the concentration-response curve to phenylephrine (Phe) in aortas of rats (A) untreated, (B) treated with apocynin (Apo), (C) mercury (HgCl₂), and (D) apocynin plus mercury (ApoHg). Differences in the area under the concentration-response curves (dAUC) in intact (Ct) and endothelial denuded aortic segments of the four experimental groups (E). The results (mean±SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mmol/l KCl. The number of animals is indicated in parentheses. Two-Way ANOVA *P<0.001, t test * P<0.05 vs. Untreated and # vs. HgCl₂-treated (dAUC).

Figure 5. Effect of apocynin treatment on NO modulation of the vasoconstrictor response to phenylephrine. Effect of L-NAME incubation in the concentration-response curve to phenylephrine in aortas of rats (A) untreated, (B) treated with apocynin (Apo), (C) mercury (HgCl₂), and (D) apocynin *plus* mercury (ApoHg). Differences in the area under the concentration-response curve to phenylephrine (dAUC) in aortic segments incubated in the absence (Ct) and the presence of L-NAME of the four experimental groups (E). The results (mean±SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mmol/l KCl. The number of rats is indicated in parentheses. Two-Way ANOVA *P<0.001, and t test *P<0.05 vs. Untreated and # vs. HgCl₂-treated (dAUC).

Figure 6. Effect of apocynin treatment on ROS modulation of the vasoconstrictor response to phenylephrine. Effect of the NADPH oxidase inhibitor, apocynin (0.3 mM), on the concentration-response curve to phenylephrine in aortas of rats (A) untreated, (B) treated with apocynin (Apo), (C) mercury (HgCl₂), and (D) apocynin *plus* mercury (ApoHg). Differences in the area under the concentration-response curve to phenylephrine (dAUC) in aortic segments incubated in the absence (Ct) and the presence of apocynin of the four experimental groups (E). The results (mean±SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mmol/l KCl. The number of rats is indicated in parentheses. Two-Way ANOVA *P<0.001, and t test *P<0.05 vs. Untreated and # vs. HgCl₂-treated (dAUC).

Figure 7. Effect of apocynin treatment on lipid peroxidation and thiol groups in plasma. Values of (A) TBARS and (B) thiol (SH) groups in the plasma of rats untreated (n=7) and treated with mercury (HgCl₂, n=7), apocynin (Apo, n=6) and apocynin plus mercury (ApoHg, n=9). Data are expressed as the mean±SEM, t test *P<0.05 vs. Untreated and #P<0.05 vs. HgCl₂-treated.

Figure 8. Effect of apocynin treatment on SOD and GPx activity. Values of (A) SOD and (B) GPx activities in the aortas of rats untreated (n=6) and treated with mercury (HgCl₂, n=6), apocynin (Apo, n=6) and apocynin plus mercury (ApoHg, n=6). Data are expressed as the mean±SEM. Student's t-test *P<0.05 vs. Untreated and #P<0.05 vs. HgCl₂-treated.

Figure 9. Effect of apocynin treatment on prostanoid modulation of the vasoconstrictor response to phenylephrine. Effect of the non-selective COX inhibitor, indomethacin (1 μ M) on the concentration-response curve to phenylephrine in the aortas of rats (A) untreated, (B) treated with apocynin (Apo), (C) mercury (HgCl_2), and (D) apocynin *plus* mercury (ApoHg). Differences in the area under the concentration-response curve to phenylephrine (dAUC) in aortic segments incubated in the absence (Ct) and the presence of indomethacin of the four experimental groups (E). The results (mean \pm SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mmol/l KCl. The number of rats is indicated in parentheses. Two-Way ANOVA *P<0.001, and t test *P<0.05 vs. Untreated (dAUC).

TABLE

Table 1: Effects of apocynin treatment on maximum response (R_{max}) and sensitivity (pD2) to phenylephrine

	Untreated		HgCl ₂		Apo		ApoHg	
	R_{max}	pD2	R_{max}	pD2	R_{max}	pD2	R_{max}	pD2
Ct	75.6 ± 5.4	-6.9 ± 0.2	98.3 ± 6.8 [#]	-7.0 ± 0.2	90.3 ± 5.7	-8.5 ± 1.4	84.7 ± 4.9	-6.9 ± 0.2
E-	135.5 ± 5.9*	-14.8 ± 1.9*	142.9 ± 6.3*	-13.4 ± 1.6*	139.9 ± 4.9*	-14.2 ± 2.5*	152.5 ± 7.1*	-16.3 ± 1.8*
L-NAME	159.3 ± 6.7*	-10.3 ± 1.4*	145.7 ± 5.0*	-10.3 ± 1.3*	155.7 ± 8.1*	-11.8 ± 1.6*	153.6 ± 8.3*	-9.7 ± 1.1*
Apocynin	31.8 ± 4.6*	-6.6 ± 0.1	25.8 ± 4.7*	-6.5 ± 0.2	37.0 ± 5.7*	-6.6 ± 0.2	40.9 ± 6.4*	-6.7 ± 0.2
Indomethacin	46.5 ± 5.6*	-6.8 ± 0.1	35.6 ± 5.6*	-6.7 ± 0.1	51.8 ± 5.3*	-6.9 ± 0.1	30.9 ± 1.9 ^{*#}	-6.7 ± 0.2

Parameters of maximal response (R_{max}) and sensitivity (pD2) of the concentration-response curves to phenylephrine in aortas from four groups control (Ct), after endothelium removal (E-), after L-NAME (100 μ M), apocynin (0.3 mM) and indomethacin (10 μ M) incubation. Results are expressed as mean \pm SEM. R_{max} , maximal effect (expressed as a percentage of maximal response induced by 75mM KCl) and pD2 expressed as -log one-half R_{max} ; t test: *P<0.05 compared to the corresponding control in each group; [#]P <0.05 compared with the untreated group.

FIGURES

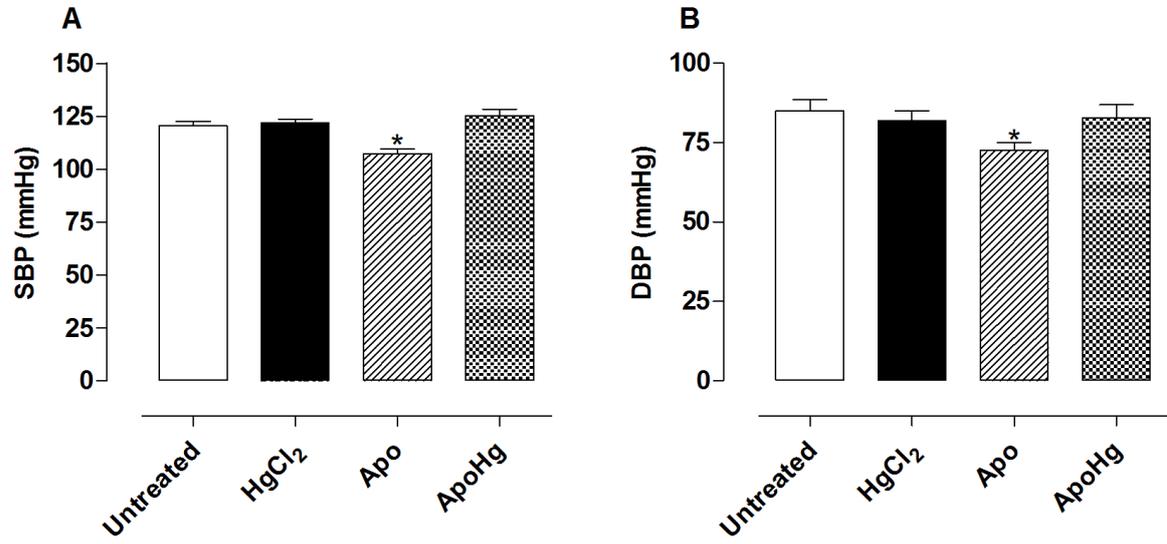


Figure 1. Effect of apocynin treatment on systolic and diastolic blood pressure.

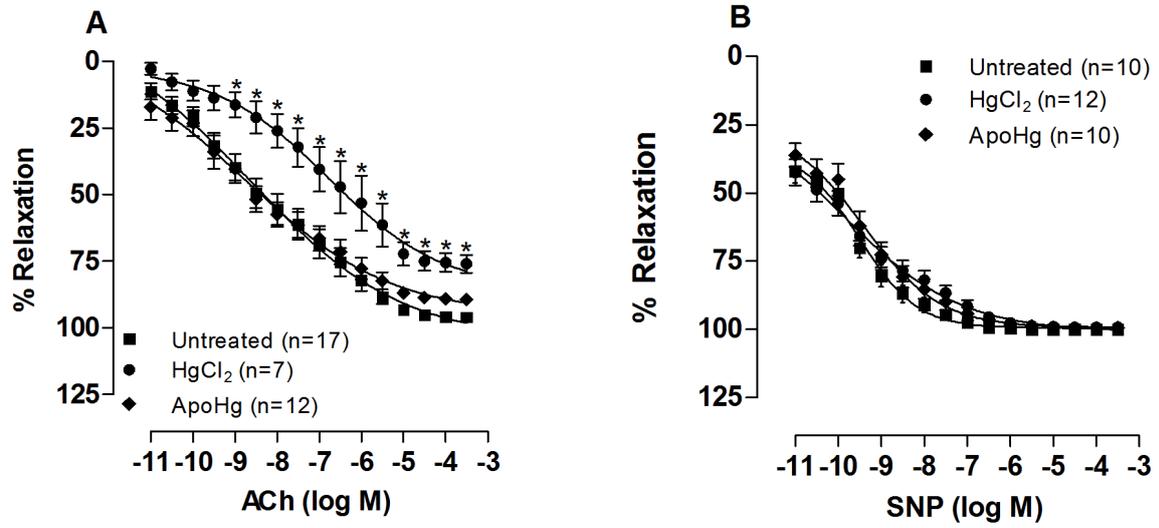


Figure 2. Effect of apocynin treatment on the vascular relaxation to acetylcholine and sodium nitroprusside.

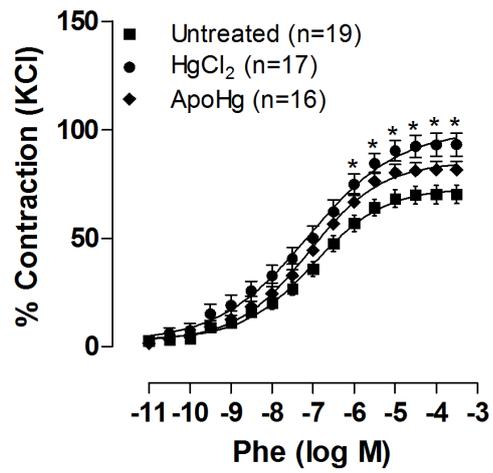


Figure 3. Effect of apocynin treatment on vasoconstrictor response to phenylephrine.

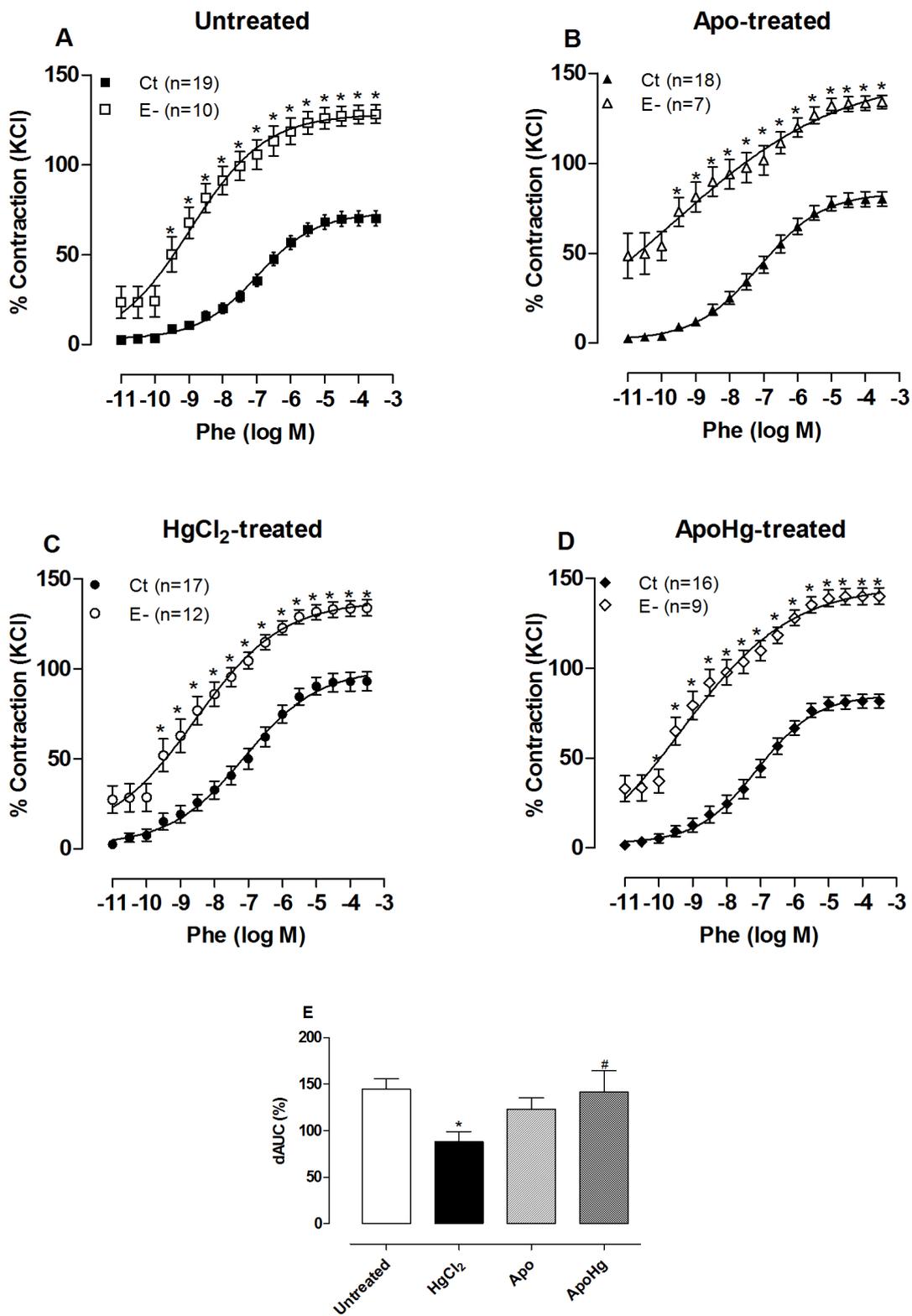


Figure 4. Effect of apocynin on endothelial modulation of vasoconstrictor response to phenylephrine.

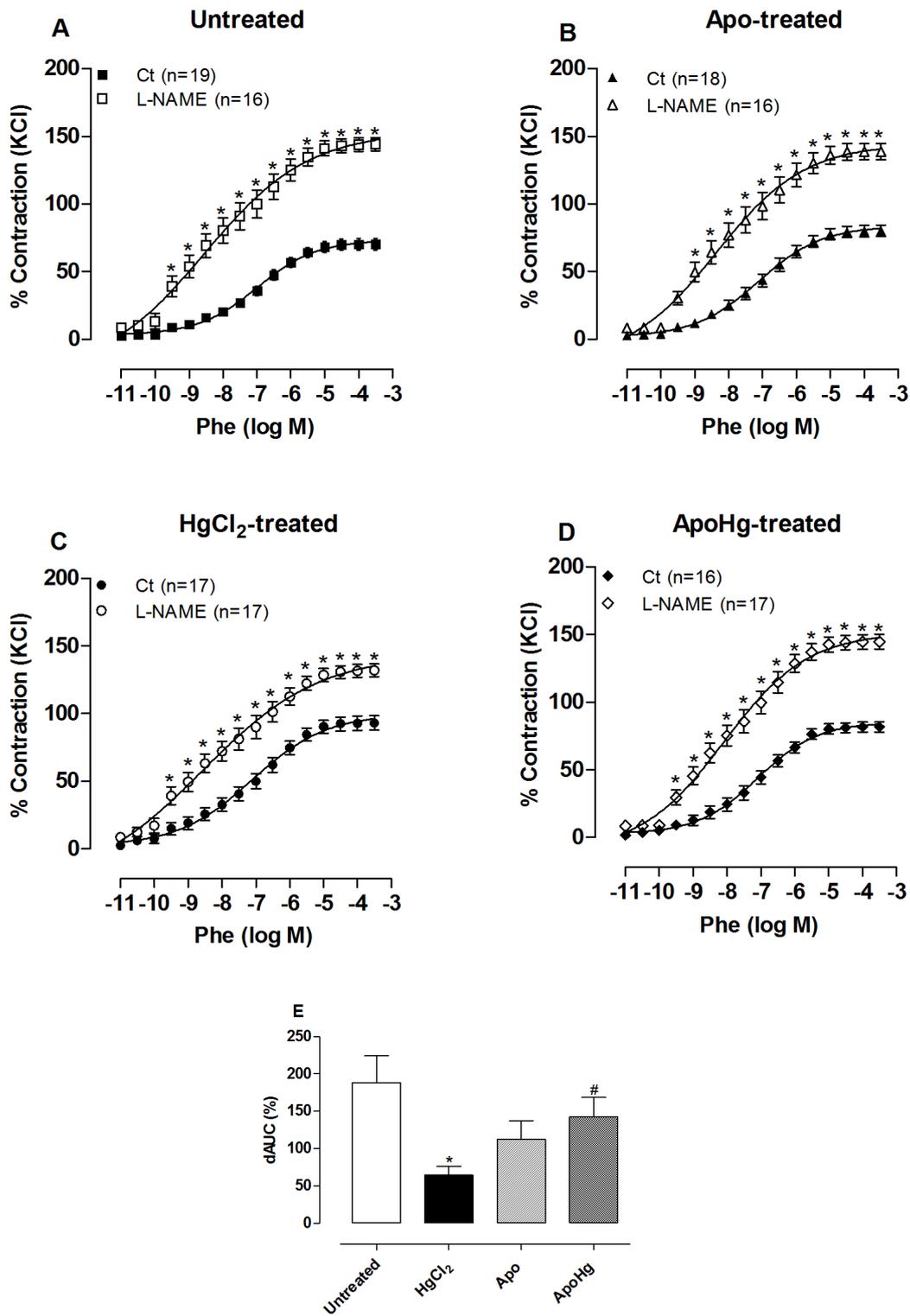


Figure 5. Effect of apocynin treatment on NO modulation of vasoconstrictor response to phenylephrine.

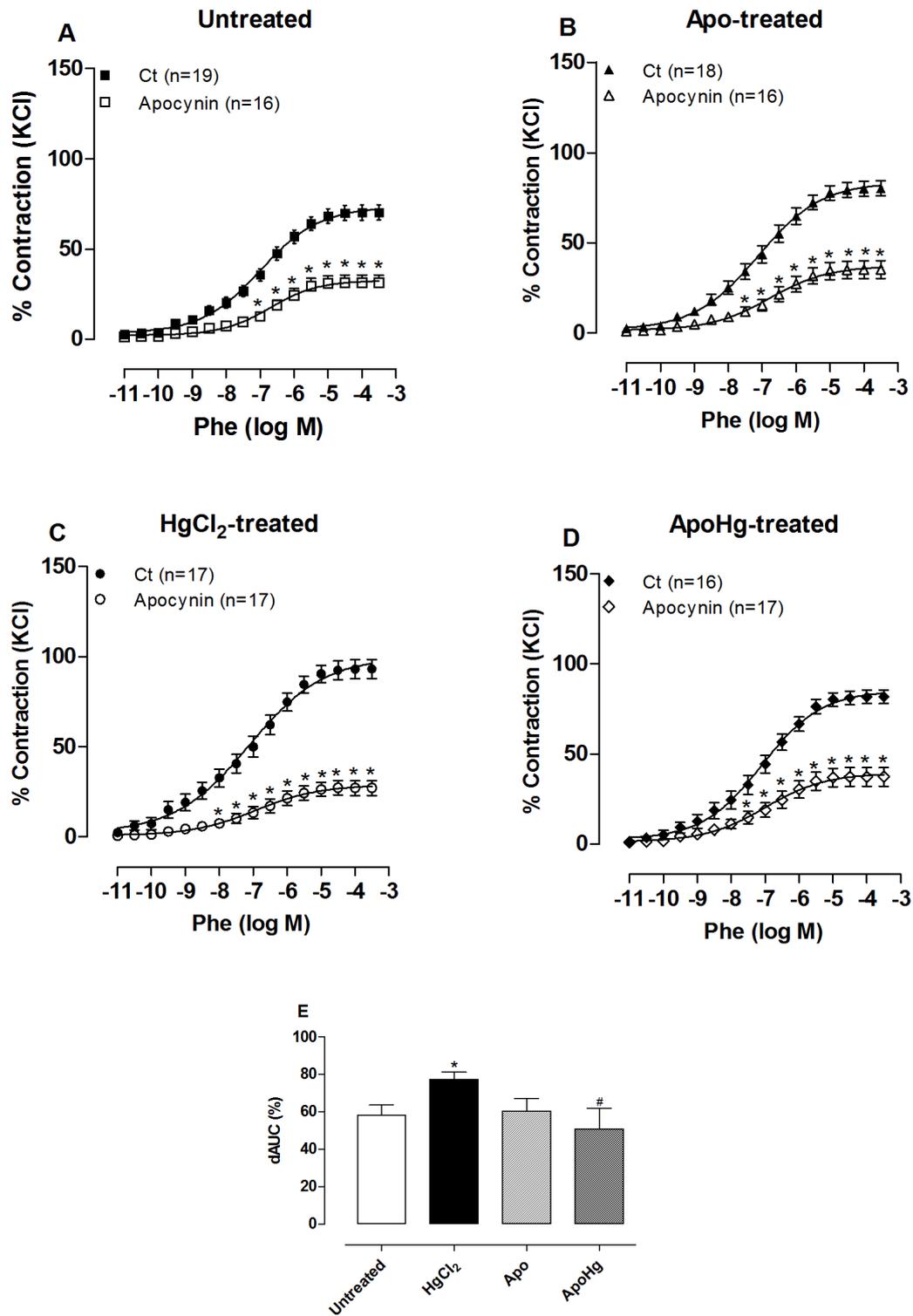


Figure 6. Effect of apocynin treatment on ROS effects of vasoconstrictor response to phenylephrine .

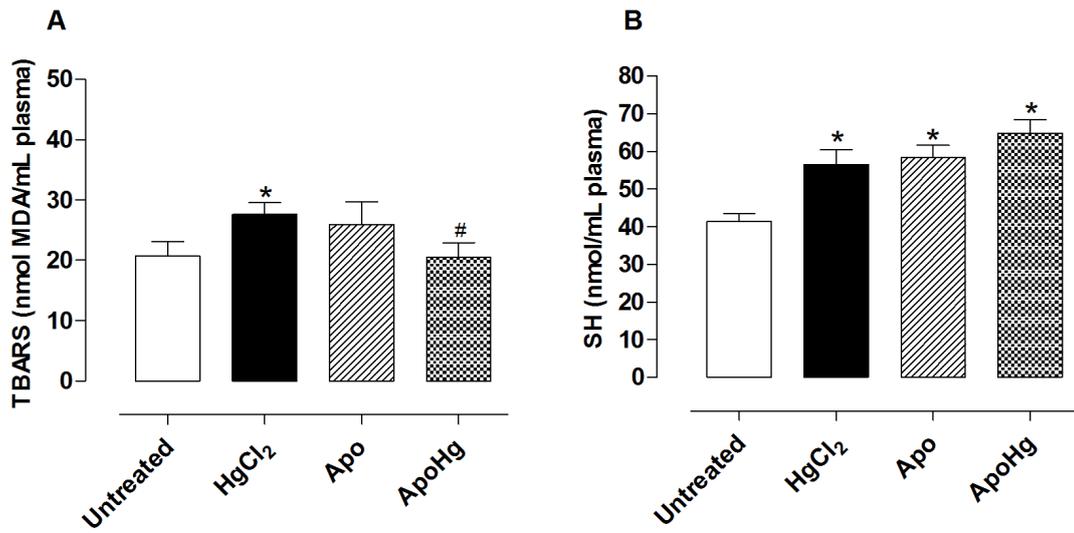


Figure 7. Effect of apocynin treatment on lipid peroxidation and thiol groups in plasma.

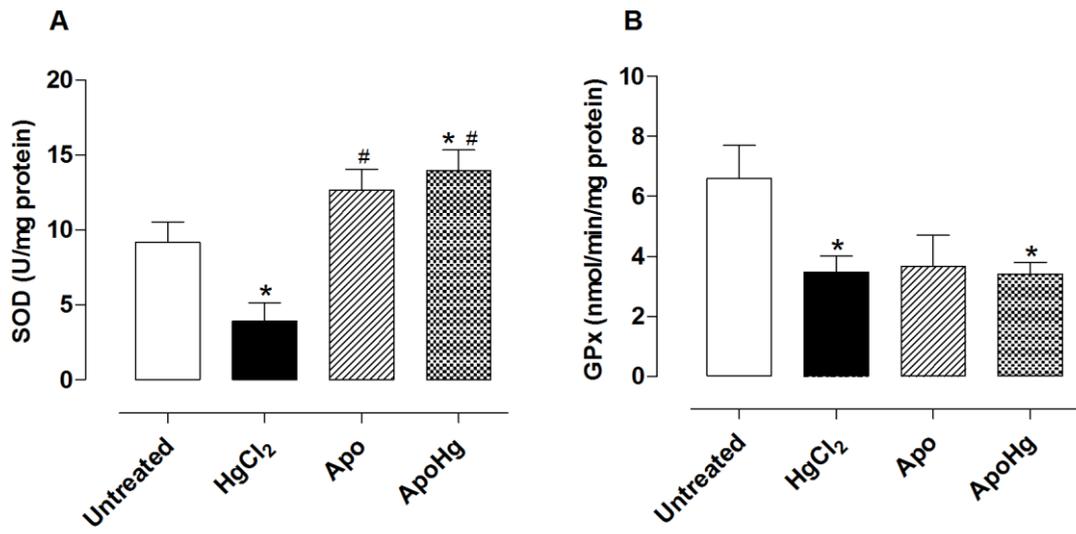


Figure 8. Effect of apocynin treatment on SOD and GPx activity.

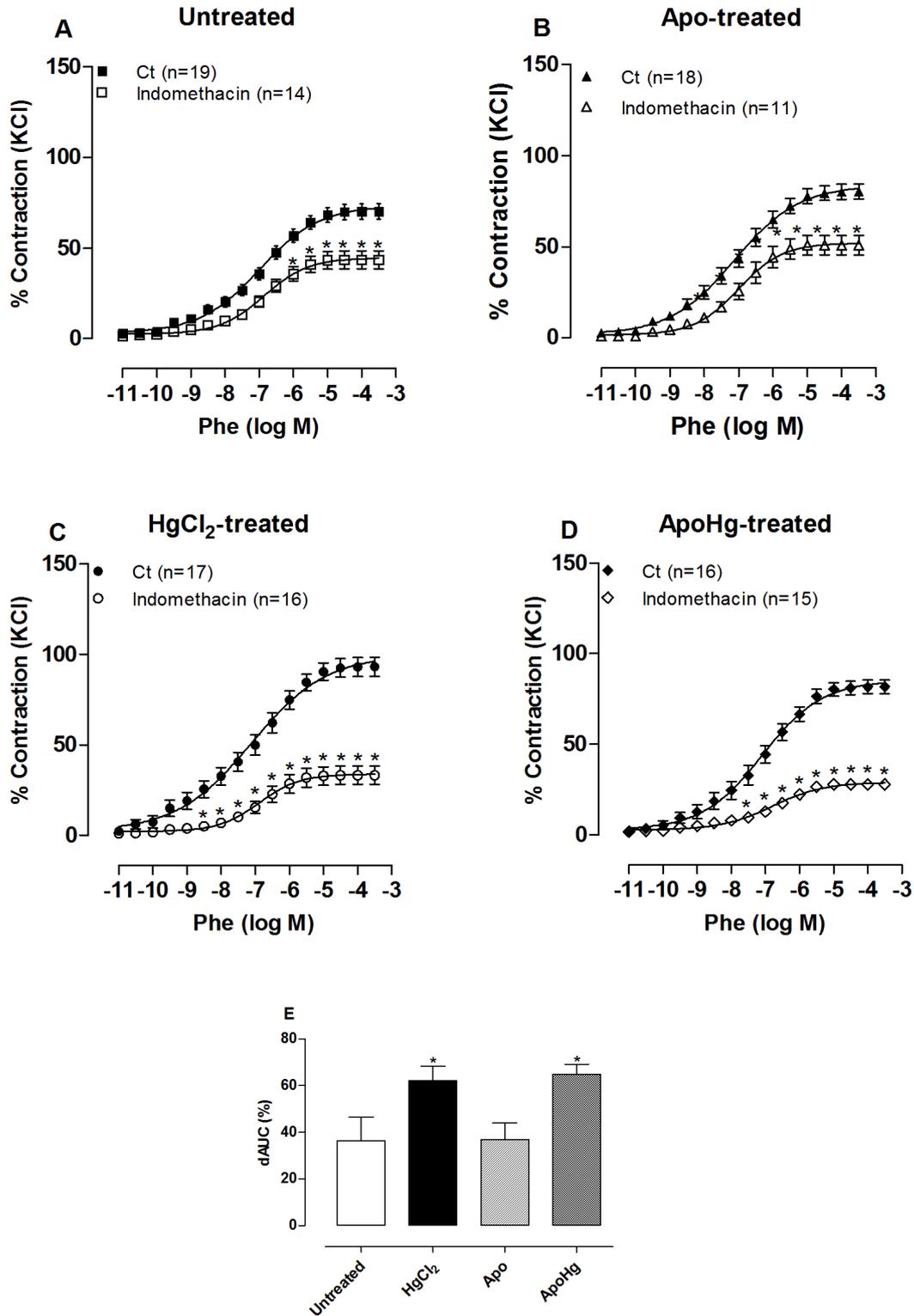


Figure 9. Effect of apocynin treatment on prostonoids modulation of vasoconstrictor response to phenylephrine.

PARTE III

DISCUSSÃO

Os resultados indicam que a apocinina impede parcialmente o aumento da reatividade vascular à fenilefrina e previne completamente a disfunção endotelial em artéria aorta de ratos expostos cronicamente a baixas doses de HgCl₂. Este efeito está relacionado à ação da apocinina sobre a NADPH oxidase, impedindo a formação de O₂^{•-} por esta via, e, assim, aumentando a biodisponibilidade do NO. Os resultados também indicam que a ativação da COX, provocada pela exposição ao mercúrio, não é prevenida pelo co-tratamento com apocinina. Os achados também indicam que a apocinina impede o aumento do estresse oxidativo causado pela exposição ao metal.

O mercúrio é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em seres humanos (GRUPTA *et al.*, 1996; MCKELVEY *et al.*, 2007; HOUSTON, 2007), o nível sanguíneo deste metal não deve ultrapassar o limite de 5,8 ng/ml segundo a EPA, pois até este limite a exposição é considerada segura e não aumenta o risco de efeitos adversos. Valores sanguíneos elevados podem causar danos para a saúde da população (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2000; RICE, 2004; STERN, 2005).

Neste estudo os ratos foram expostos a cronicamente ao HgCl₂ e ao final de 30 dias apresentavam concentração sanguínea de 8 ng/ml, valor este próximo ao considerado seguro. O modelo experimental utilizado neste estudo é o primeiro a demonstrar a ocorrência de alterações vasculares em animais expostos a doses de mercúrio próximas das consideradas seguras pelas agências reguladoras (Wiggers *et al.*, 2008),

Já foi relatada a associação entre a exposição ocupacional ao mercúrio e o aumento da sua concentração plasmática (HALBACH, 1990; SANDBORGH-ENGLUND *et al.*, 1998). Após a exposição ao vapor de mercúrio, foi observada concentração sanguínea de até 18 nmol/l (LANGWORTH *et al.*, 1997) e concentração plasmática de 5 nmol/l após remoção de amálgama dentária (BJORKMAN *et al.*, 1997).

A intoxicação por mercúrio causa danos ao SNC (CLARKSON, 1997), sistemas respiratório (SIGEYUKI *et al.*, 2000), reprodutivo (UNDERWOOD, 1977,

ANDERSON *et al.*, 1992), hepático (HUANG *et al.*, 1996), renal (CLARKSON, 1997; PEROTTONI *et al.*, 2004) e cardiovascular (SALONEN *et al.*, 2000). Recentemente, estudos demonstraram efeitos sobre as células sanguíneas e sistema imunológico (HANNA *et al.*, 2012; NYLAND *et al.*, 2012).

No sistema cardiovascular, a exposição ao mercúrio aumenta o risco de hipertensão arterial, aterosclerose de carótidas e doença arterial coronariana (SALONEN *et al.*, 2000; VIRTANEN *et al.*, 2005). O processo fisiopatológico destas alterações está relacionado ao aumento do estresse oxidativo causado pelo mercúrio, aumento da produção de ROS, redução das defesas antioxidantes (GSTRAUNTHALER *et al.*, 1983; DA CUNHA *et al.*, 2000; WOLF & BAYNES, 2007) e aumento da peroxidação lipídica (STACEY E KAPPUS, 1982).

Neste estudo a exposição ao mercúrio não alterou a pressão arterial dos ratos e a apocinina exerceu um efeito hipotensor quando administrada isoladamente, porém, quando associada ao mercúrio, nos animais que receberam ambos os tratamentos concomitantemente, não promoveu o mesmo efeito. Este achado sugere que o mercúrio pode estar reduzindo a ação da apocinina sobre a NADPH oxidase ou pode estar ativando outras vias fisiológicas que evitam a queda da pressão arterial promovida pela apocinina.

Estudos prévios demonstraram que a administração aguda de alta concentração de mercúrio na forma iônica (Hg^{2+}) diminui a pressão arterial em ratos, associada à ocorrência de insuficiência cardíaca diastólica e hipertensão pulmonar (ROSSONI *et al.*, 1999). No entanto, o tratamento crônico com doses elevadas (0,5 mg/kg/dia ou 200 ug/ml de $HgCl_2$ na água de beber por 180 dias) demonstrou efeito oposto, ou seja um aumento na pressão arterial (CARMIGNANI *et al.*, 1992). Em concordância com nossos achados, estudos utilizando modelos animais de exposição crônica a baixas doses de mercúrio não verificaram alterações na pressão arterial de ratos, apesar de as doses nanomolares acarretarem disfunção endotelial e resposta vasoconstritora aumentada em artéria aorta e em artérias mesentéricas de resistência (DA CUNHA *et al.*, 2000; WIGGERS *et al.*, 2008; PEÇANHA *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que os efeitos do mercúrio sobre a pressão arterial são dependentes da forma do metal, da dose e do tempo de exposição.

Não existem relatos na literatura sobre a atuação da apocinina em modelos animais de exposição a metais pesados, porém o papel deste composto sobre a pressão arterial já foi demonstrado em modelos animais de hipertensão. A

administração crônica de apocinina em água de beber preveniu o aumento da pressão arterial de ratos hipertensos DOCA-sal (GHOSH *et al.*, 2004) e reduziu a geração de $O_2^{\cdot -}$ em artérias isoladas (BESWICK *et al.*, 2001; GOSH *et al.*, 2002; CHAN *et al.*, 2007). Também foi observado que a hipertensão dependente de mineralocorticoide foi reduzida pela administração de apocinina (1,5 mmol/l em água de beber) (SCHLÜTER *et al.*, 2008) e que este composto atenuou a elevação da pressão arterial e aboliu as alterações na função, composição e estrutura das pequenas artérias mesentéricas de modelos animais de hipertensão induzidos por Ang II (VIRDIS *et al.*;2004). Por outro lado foi observado que em ratos com hipertensão induzida por endotelina-1, a administração oral de apocinina (1,5 mM) não promoveu efeito anti-hipertensivo (SCHLÜTER *et al.*, 2008) e que administração oral 16 mg/kg/dia, não reduziu a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (CIARCIA *et al.*, 2010). Estes resultados divergentes sugerem que o efeito da apocinina sobre a pressão arterial está diretamente relacionado à concentração da droga e ao modelo animal utilizado.

Considerando que, neste modelo experimental, já foram observadas alterações vasculares caracterizadas pelo aumento da resposta contrátil à fenilefrina e disfunção endotelial, desenvolvemos experimentos para avaliar a reatividade vascular e o possível efeito protetor da apocinina sobre estas alterações. Observamos que houve aumento na reatividade vascular da aorta dos ratos expostos ao mercúrio, indicado pelo aumento da resposta máxima (R_{max}) à fenilefrina. O co-tratamento com apocinina exerceu uma prevenção parcial ao aumento da reatividade vascular, sugerindo que a NADPH oxidase tem importante participação nas alterações vasculares promovidas pelo Hg. A ação do metal sobre este complexo enzimático foi previamente sugerida, demonstrada pelo aumento na expressão das subunidades NOX-1 e NOX-4 em artérias de resistência (WIGGERS *et al.*, 2008) e coronárias (FURIERI *et al.*, 2011) de ratos expostos cronicamente ao mercúrio.

Da Cunha *et al.* (2000) e Wiggers *et al.* (2008) observaram que o $HgCl_2$ promove um aumento na reatividade à fenilefrina, tanto em elevadas (0,5 a 10 mM) como em baixas (6 nM) concentrações de mercúrio. O primeiro autor observou aumento da R_{max} e da sensibilidade (pD_2) à fenilefrina. O segundo demonstrou, em artérias de resistência, o aumento da reatividade vascular pelo aumento da sensibilidade à fenilefrina. Em nosso estudo, foi observado aumento da R_{max} à

fenilefrina, o que está em concordância com achado de Peçanha *et al.* (2010) que utilizou o mesmo modelo experimental.

O papel da NADPH oxidase sobre o aumento da reatividade vascular já foi estudado em modelos animais de hipertensão, nos quais a administração da apocinina diminuiu as respostas vasoconstritoras à fenilefrina em aorta de ratos SHR (ÁLVAREZ *et al.*, 2008). Além disso, também foi observado que a apocinina reduziu as respostas contráteis à noradrenalina em artérias femorais de ratos de SHR (MIYAGAWA *et al.* 2007). Pesquisas também demonstraram que a apocinina diminuiu os níveis de mRNA da subunidade p22phox da NADPH oxidase e inibiu o aumento da reatividade vascular em segmentos de aorta de ratos *Sprague-Dawley* de modelos experimentais sal-aldosterona (RIGANTI *et al.*, 2008).

Para verificar se as alterações na reatividade vascular promovidas pelo mercúrio dependiam de componentes endoteliais, como demonstrado anteriormente, (WIGGERS *et al.*, 2008; PEÇANHA *et al.*, 2010) e se a apocinina era eficaz em atuar sobre tais componentes, realizou-se a remoção do endotélio e foi notada redução da participação do endotélio na reatividade vascular. Foi verificado também que o relaxamento independente do endotélio, na presença do doador de NO, nitroprussiato de sódio, foi similar em ambos os grupos, demonstrando que o músculo liso vascular permaneceu inalterado e os efeitos na reatividade vascular devem-se principalmente a alterações endoteliais. O co-tratamento com apocinina preveniu a redução da participação endotelial na reatividade vascular dos ratos tratados com mercúrio, sugerindo que os componentes endoteliais responsáveis pela manutenção do tônus vascular foram preservados pela administração da substância.

Para detalhar qual dos componentes endoteliais é alterado pela apocinina nos animais expostos ao mercúrio, foi utilizado o L-NAME, um inibidor da enzima NOS, a qual é responsável pela produção de NO, principal componente vasodilatador do endotélio vascular. Como relatado previamente (ROSSONI *et al.*, 1999a; DA CUNHA *et al.*, 2000; WIGGERS *et al.*, 2008), o efeito do L-NAME na presença do mercúrio apresentou menor magnitude quando comparado ao grupo controle, demonstrando que a diminuição do envolvimento endotelial na reatividade vascular em aorta durante exposição ao mercúrio é devido à redução de NO. A administração oral de apocinina impediu a redução da participação do NO na reatividade vascular da aorta neste modelo experimental, sugerindo que o déficit de NO deve-se à geração de $O_2^{\cdot-}$

pela NADPH oxidase, espécie reativa que apresenta grande afinidade pelo NO para formação de $\bullet\text{ONOO}^-$ e provoca a redução da biodisponibilidade do NO.

Estudo prévio utilizando este modelo de exposição verificou que o mercúrio não promoveu redução da expressão proteica da isoforma endotelial da NOS, porém promoveu aumento da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, concluindo que a redução da participação do NO na reatividade vascular deveu-se a uma redução da sua biodisponibilidade de NO e não da produção (DA CUNHA *et al.*, 2000; PEÇANHA *et al.*, 2010). Esta redução da biodisponibilidade de NO vascular causada pelo estresse oxidativo tem sido bem descrita em modelos animais de hipertensão, os quais podem contribuir, devido a algumas semelhanças fisiopatológicas, para elucidar os mecanismos envolvidos nas alterações cardiovasculares decorrentes da intoxicação por metais pesados. Estudos evidenciam este mecanismo em modelos SHR, DOCA-sal e Ang II (BESWICK *et al.*, 2001; CIARCIA *et al.*, 2010; MARTINEZ-REVELLEZ *et al.*, 2011). A produção excessiva de $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode diminuir a biodisponibilidade de NO, e desta forma alterar as respostas vasculares, muitas vezes gerando a hipertensão (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996).

Para reforçar a hipótese de que o estresse oxidativo estaria promovendo a redução da biodisponibilidade do NO, realizou-se a incubação *in vitro* de anéis de aorta com apocinina, na qual se evidenciou que a exposição ao mercúrio aumenta a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e este, por sua vez, é responsável pelo aumento da resposta contrátil a fenilefrina. O co-tratamento com apocinina preveniu o aumento da participação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ na reatividade vascular da aorta de ratos cronicamente expostos ao HgCl_2 , demonstrando que o $\text{O}_2^{\bullet-}$ é o principal ROS envolvido nas alterações vasculares decorrentes da exposição ao Hg, provavelmente por este metal ativar diretamente a enzima NADPH oxidase. Porém, não podemos descartar a participação do $\bullet\text{ONOO}^-$ no aumento da reatividade vascular, visto que estudos prévios também demonstram aumento na sua formação quando há ativação da NADPH oxidase (FRISBEEM *et al.*, 2002).

Os ROS são conhecidos por aumentar a reatividade à fenilefrina em vasos de condutância e de resistência e sua participação nas alterações vasculares promovidas pelo mercúrio já foi bem descrita (DA CUNHA *et al.*, 2000; KOBAL *et al.*, 2004; HAO *et al.*, 2006; WIGGERS *et al.*, 2008). MacKenzie e Martin (1998) observaram que o tratamento com TEMPOL, substância mimética da SOD, aboliu as ações do mercúrio na reatividade vascular à fenilefrina, demonstrando que o metal

pode atuar na depleção da SOD, gerando estresse oxidativo, principalmente através do excesso de $O_2^{\cdot-}$, e que este é intimamente associado às alterações de reatividade e elevações pressóricas observadas neste tipo de intoxicação.

Tem sido demonstrado que a apocinina impede a redução de NO em animais e humanos sujeitos a estresse oxidativo (HAMILTON *et al.*, 2002). Foi relatado o efeito protetor do tratamento *in vivo* com apocinina em modelos experimentais de lesão vascular associada à superprodução de ROS (CHAN *et al.*, 2007), evidenciando que este composto parece ser eficaz na inibição da NADPH oxidase *in vivo* e no impedimento do dano vascular associado ao estresse oxidativo.

Nosso estudo observou que a exposição crônica ao mercúrio promoveu redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina, evidenciando a ocorrência de disfunção endotelial. A administração de apocinina promoveu melhora da resposta vasodilatadora à acetilcolina, sugerindo que a NADPH oxidase vascular desempenha um papel crucial na disfunção endotelial deste modelo experimental.

A disfunção endotelial secundária à elevada produção de $O_2^{\cdot-}$ foi demonstrada em exposição crônica a baixas e altas doses de mercúrio (DA CUNHA *et al.*, 2000, WIGGERS *et al.*, 2008; PEÇANHA *et al.*, 2010) e em modelos animais de intoxicação por metais pesados, tais como o mercúrio e o chumbo, a ativação da NADPH oxidase desempenhou um papel-chave na geração de estresse oxidativo e lesão vascular (PATRICK, 2006; FURIERI *et al.*, 2011). Também já foi notado que o tratamento, de artérias de ratos, com apocinina provocou melhora da vasodilatação dependente do endotélio (HAMILTON *et al.*, 2002), evidenciando a atuação da NADPH oxidase na disfunção endotelial.

Utilizando modelo animal de hipertensão, Viridis *et al.* (2004) demonstraram que a vasodilatação em resposta à acetilcolina em artérias de resistência foi significativamente atenuada em ratos com hipertensão induzida por Ang II, o que foi totalmente prevenido pela apocinina. Também foi demonstrado que a apocinina foi capaz de reverter os danos ao relaxamento dependente do endotélio em artérias renais de ratos com hipertensão renovascular (TIAN *et al.*, 2012).

Para testar o envolvimento da via da COX, extensamente relatada em outros estudos disfunção vascular em modelos animais de hipertensão e também identificada como alvo da ação tóxica de alguns metais pesados, como o mercúrio, os anéis de artéria aorta foram incubados com indometacina, um inibidor não-seletivo da via da COX. Verificou-se um aumento na participação da COX na

reatividade vascular causada pelo mercúrio e o co-tratamento com apocinina não promoveu alterações nesta resposta. Esta descoberta indica que, além da NADPH oxidase estar atuando nos efeitos deletérios promovidos pelo metal na vasculatura, a atividade da COX também está envolvida na geração desses danos e sobre os quais a apocinina não exerce efeito.

Estudos examinaram a possibilidade de fatores derivados da COX desempenharem um papel nas ações do mercúrio. Da Cunha *et al.* (2000) mostraram que concentrações elevadas de HgCl₂ produziram vasoconstrição nas artérias caudais de ratos, a qual foi mediada pela formação de O₂^{•-} e pela estimulação da produção de prostanoídes vasoconstritores derivados da COX, promovendo uma redução da atividade vasodilatadora endotelial. Foi demonstrada a liberação de vasoconstritores derivados da COX-2 no tratamento crônico com doses baixas de mercúrio, a qual aumentou a resposta vasoconstritora à fenilefrina em artéria aorta de ratos (PEÇANHA *et al.*, 2010). Este estudo atribui o aumento da atividade da COX-2 a uma maior ativação do sistema renina-angiotensina, com aumento da produção de Ang II após o tratamento com mercúrio. No entanto, um estudo realizado por Wiggers *et al.* (2008) não verificou envolvimento da via da COX no aumento da resposta contrátil à fenilefrina em artérias de resistência de ratos cronicamente expostos a baixas doses de mercúrio. Os autores sugerem que o aumento da reatividade vascular observada pode estar relacionada à ativação da ACE pelo mercúrio, com conseqüente aumento da produção de Ang II, atuando diretamente sobre o vaso, fato que também foi encontrado em outros estudos (SALONEN *et al.*, 1995; HOUSTON, 2007; VIRTANEN *et al.*, 2007).

Usando modelos animais de hipertensão, alguns estudos demonstraram a participação da via da COX nas alterações vasculares durante o curso da doença. Tem sido demonstrado que a COX-1 e seus derivados prostanoídes estão envolvidos na progressão da lesão aterosclerótica vascular (LI *et al.*, 2009). A COX-1 mostrou-se superexpressa em pequenos vasos mesentéricos de ratos tratados com Ang II, e a sua atividade aumentada, produzindo prostanoídes contráteis atuantes sobre os receptores TP. Este mecanismo representa uma das principais vias de ação da Ang II durante a hipertensão (VIRDIS *et al.*, 2011).

Tian *et al.* (2012) mostraram que os inibidores seletivos da COX-1 impedem as contrações endotélio-dependentes em aorta de ratos SHR e melhoram o relaxamento dependente de endotélio em artérias mesentéricas de ratos hipertensos

infundidos por Ang II, sugerindo que os fatores endoteliais derivados da COX-1 podem prejudicar a função endotelial. Em artérias mesentéricas de resistência, foi evidenciado que o H_2O_2 induz a uma resposta contrátil maior em vasos de ratos hipertensos do que de normotensos (GARCÍA-REDONDO *et al.*; 2009). Esta resposta contrátil é mediada principalmente pelo tromboxano A2 (TXA2) derivado da COX-1 em artérias de ratos normotensos e por TXA2 e $O_2^{\cdot-}$ em artérias de ratos hipertensos (FLAVAHAN, 2007).

Muitos estudos têm demonstrado especificamente a ação de prostanoídes vasoconstritores da COX-2 na reatividade vascular aumentada, pressão arterial e disfunção endotelial em modelos animais de hipertensão (ADEAGBO *et al.*, 2005; ÁLVAREZ *et al.* 2005; ÁLVAREZ *et al.*, 2007). Em ratos SHR e em modelos DOCA-sal, o inibidor seletivo da COX-2, NS 398, reduziu a resposta contrátil à fenilefrina, demonstrando que os prostanoídes vasoconstritores da COX-2 atuam no aumento da reatividade vascular durante a hipertensão (ADEAGBO *et al.*, 2005; ÁLVAREZ *et al.* 2005). Alguns autores sugeriram participação dos derivados contráteis da COX-2 na disfunção do endotélio (WONG *et al.*, 2009) e nas respostas contráteis vasculares (ADEAGBO *et al.*, 2005; ÁLVAREZ *et al.*, 2005) observadas na hipertensão e no envelhecimento.

Alguns estudos têm demonstrado a existência de uma relação entre o NADPH oxidase, Ang II e COX na hipertensão (ÁLVAREZ *et al.*, 2007; DIKALOVA *et al.*, 2010; SANCHO *et al.*, 2011; MARTINEZ-REVELLES *et al.*, 2012; DIKALOV & NAZAREWICZ, 2012). Esses autores demonstraram que a hipertensão induzida por Ang II está relacionada com a ativação da NADPH oxidase e geração de ROS, que, por sua vez, ativam a via da COX, gerando prostanoídes vasoconstritores e novos ROS, que, por fim, ativam a NADPH oxidase criando um ciclo vicioso que se retroalimenta. No entanto, em nossas condições experimentais, o co-tratamento com apocinina não modificou o aumento da participação da via COX na resposta contrátil à fenilefrina causada pelo mercúrio, indicando que a ativação da COX parece não ser dependente do estresse oxidativo gerado pela NADPH oxidase. Sugerimos, assim, que estas vias podem estar agindo de forma independente.

Observamos a ocorrência de estresse oxidativo plasmático e no tecido aórtico durante a exposição crônica ao mercúrio, com peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento nos níveis de MDA, e depleção de defesas antioxidantes, verificada pela redução da SOD e da GPx na aorta. A administração de apocinina preveniu a

ocorrência de estresse oxidativo, impedindo a peroxidação lipídica plasmática e promovendo o aumento da atividade da SOD na aorta. No entanto, este composto não atuou sobre a GPx, e a redução da atividade desta enzima causada pela exposição ao mercúrio na artéria aorta persistiu após o co-tratamento com apocinina. Este fato sugere que a união do metal ao grupamento selênio desta enzima, o qual é fundamental a sua ativação, não tenha sido impedida pela apocinina.

Nosso estudo verificou também o aumento dos níveis de grupos tiol (SH) do plasma dos ratos durante a exposição crônica a baixas doses de HgCl₂. Este aumento de grupamentos tióis sugere a ocorrência de um fenômeno chamado *hormese*, o qual significa que a ação do mercúrio, em baixas concentrações durante períodos prolongados, em vez de causar o esgotamento de grupos SH, pode gerar um mecanismo compensatório no corpo, promovendo seu aumento como estratégia de defesa.

Estudos prévios evidenciaram aumento no estresse oxidativo em modelos animais de exposição aguda e crônica ao mercúrio, devido tanto à diminuição das defesas antioxidantes como ao aumento dos mecanismos oxidantes (LUND *et al.*, 1993; DURAK *et al.*, 2010; POLLACK *et al.*, 2012). Benov *et al.* (1990) mostraram que o mercúrio inibe a atividade de várias enzimas como CAT, SOD e GPx. A exposição ao metal também pode reduzir as defesas antioxidantes não enzimáticas, tais como GSH, principal composto tiol de baixa massa molecular presente em praticamente todos os tecidos de mamíferos (CLARKSON, 1997; ZALUPS *et al.*, 2000).

O aumento de ROS, principalmente H₂O₂ e O₂^{•-}, foi evidenciado em monócitos tratados com MeHg (INSUG *et al.*, 1997). Outros demonstraram a relação inversa entre conteúdo celular de GSH e toxicidade do mercúrio (HU *et al.*, 1997). Estudo sobre os efeitos da exposição ocupacional de longo prazo ao mercúrio na forma elementar (Hg) em mineiros demonstrou que houve redução da atividade da GPx e da SOD em eritrócitos após a exposição ao metal (BULAT *et al.*, 1998).

Este é o primeiro estudo que analisa os efeitos da apocinina sobre o estado antioxidante do plasma e da artéria aorta de ratos cronicamente expostos ao mercúrio. Entretanto, em modelos animais de hipertensão por Ang II que cursam com disfunção endotelial e aumento da resposta vascular a fenilefrina, indicam que também existe redução da atividade da GSH e GPx e que este efeito é atenuado

pela inibição da NADPH oxidase com apocinina, impedindo a produção de ROS, principalmente de $O_2^{\cdot-}$ (DIKALOV E NAZAREWICZ, 2012).

Em resumo, os nossos resultados sugerem, pela primeira vez, que o inibidor da NADPH oxidase, apocinina, previne o estresse oxidativo, o aumento da reatividade vascular à fenilefrina e a disfunção endotelial em artéria aorta de ratos cronicamente expostos a concentrações nanomolares de mercúrio. Além disso, demonstrou que o mercúrio age por duas vias distintas e independentes, NADPH oxidase e COX. Sabe-se que a exposição ao mercúrio é um importante fator de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, este estudo ajuda a esclarecer as vias através das quais o mercúrio promove alterações cardiovasculares e, por sua vez, possibilitará o desenvolvimento de arsenal terapêutico para prevenir e tratar estas alterações.

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu chegarmos às seguintes conclusões:

- O inibidor da NADPH oxidase, apocinina, exerceu efeito hipotensor em ratos normotensos quando administrado isoladamente, porém não foi capaz de exercer o mesmo efeito na presença do mercúrio, sugerindo que o metal esteja impedindo a ação da apocinina sobre a pressão arterial ou que outras vias geradoras de ROS tenham sido ativadas pela exposição ao mercúrio;
- A apocinina preveniu parcialmente o aumento da reatividade vascular em artéria aorta de ratos cronicamente expostos a concentrações nanomolares de mercúrio, semelhantes às observadas após a exposição ocupacional e remoção de restaurações de amálgama dentária;
- Esta substância impediu o aumento de $O_2^{\cdot-}$ e a redução na biodisponibilidade de NO no tecido vascular, porém não impediu o aumento da participação de prostanoídes derivados da COX causado pela exposição ao mercúrio;
- A prevenção parcial ao aumento da reatividade vascular da aorta demonstrou que existem outros fatores endoteliais envolvidos no mecanismo de reatividade vascular alterados pela intoxicação ao mercúrio além da enzima NADPH oxidase, e sobre os quais a apocinina não exerce efeito, sendo a via da COX extremamente relacionada a isso;
- A administração oral de apocinina mostrou impedir completamente a disfunção endotelial causada pelo mercúrio, sugerindo que esta alteração ocorre principalmente pela produção de $O_2^{\cdot-}$ derivado da NADPH oxidase;
- A apocinina, por fim, é capaz de prevenir o estresse oxidativo causado pelo mercúrio, impedindo a peroxidação lipídica e a depleção dos mecanismos de defesa do organismo.

Estes resultados sugerem que o uso terapêutico da apocinina na prevenção de efeitos deletérios para o sistema cardiovascular causados pela exposição ocupacional ao mercúrio pode ter importantes implicações clínicas e deve continuar sendo extensivamente estudado.

REFERÊNCIAS

ADEAGBO, A. S.; ZHANG, X.; PATEL, D.; *et al.* Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 23:1025-36, 2005.

AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. Brazilian Soc. Food Nutr.* 35(1):129-48, 2010.

ALTENHÖFER, S.; KLEIKERS, P. W. M.; RADERMACHER, K. A.; SCHEURER, P.; HERMANS, J. J. R.; SCHIFFERS, P.; *et al.* The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:2327–43, 2012.

ÁLVAREZ, Y.; BRIONES, A. M.; BALFAGÓN, G.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 23:767–77, 2005.

ÁLVAREZ, Y.; BRIONES, A. M.; HERNANZ, R.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; ALONSO, M. J.; *et al.* Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *British Journal of Pharmacology.* 153, 926–35, 2008.

ÁLVAREZ, Y.; PEREZ-GIRON, J. V.; HERNANZ, R.; *et al.* Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 321:381-8, 2007.

ANDERSON, M. B.; PEDIGO, N. G.; KATZ, R. P.; GEORGE, W. J. Histopathology of testis from mice chronically treated with cobalt. *Reprod. Toxicol.* 6:41-50, 1992.

ANTMAN, E. M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation.* 112:759-70, 2005.

ASHE, W.F.; LARGENT, E.J.; DUTRA, F.R.; HUBBARD, D.M.; BLACKSTONE, M. Behavior of mercury in the animal organism following inhalation. *A M A Arch Ind Hyg Occup Med.* 7(1):19-43, 1953.

AZEVEDO, B. F. A.; FURIERI, L. B.; PEÇANHA, F. M.; WIGGERS, G. A.; VASSALLO, P. F.; SIMÕES, M. R.; *et al.* Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012.

AZEVEDO, F. A. *Toxicologia do mercúrio.* São Carlos: RiMa. 1ª ed., 2003.

BARBIERI, S. S.; CAVALCA V.; ELIGINI, S.; BRAMBILLA, M.; CAIANI, A.; TREMOLI, E.; *et al.* Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human

monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 37(2):156-65, 2004.

BARREGARD, L.; REKIC, D.; HORVAT, M.; ELMBERG, L.; LUNDH, T.; *et al.* Toxicokinetics of mercury after long-term repeated exposure to thimerosal-containing vaccine. *Toxicological Sciences.* 120(2):499–506, 2011.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 8(3), 2001.

BECKER, A.; SOLIMAN, K. F. A. The Role of Intracellular Glutathione in Inorganic Mercury-Induced Toxicity in Neuroblastoma Cells. *Neurochem Res.* 34(9):1677-84, 2009.

BELGHITI, D.; PATEY, O.; BERRY, J. P.; ANTELIN, C.; HIRBEC, G.; LAGRUE, G. Néphrose lipoïdique d'origine "toxique". Deux cas. *Presse medicale.* 15(39):1953-5, 1986.

BELTRAN, A. E.; BRIONES, A. M.; GARCIA-REDONDO, A. B.; *et al.* p38MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens.* 27:142-54, 2009.

BENOV, L. C.; BENCHEV, I. C.; MONOVICH, O. H. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chem Biol Interact.* 76:321, 1990.

BERINGHS-BUENO, L. A. Contaminação por metais tóxicos: medicação homeopática como quelante de mercúrio. Tese apresentada ao Centro de Ensino Superior de Homeopatia IBEHE da Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo para obtenção do título de mestre em Homeopatia. São Paulo, SP, 2005.

BERNHOF, R. A. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. *Journal of Environmental and Public Health.* 2012.

BESWICK, R. A.; DORRANCE, A. M.; LEITE, R.; WEBB, R. C. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension.* 38(5):1107–11, 2001.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta *Rev. Nutr.* 12(2):123-30, 1999.

BJORKMAN, L.; SANDBORGH-ENGLUND, G.; EKSTRAND, J. Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. *Toxicol Appl Pharmacol.* 144:156–62, 1997.

BRANDÃO, R.; BORGES, L. P.; DE OLIVEIRA, R.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide protects against hematological and immunological alterations induced by mercury in mice. *J Biochem Mol Toxicol.* 22(5):311-9, 2008.

BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; PAGLIOSA, L. B.; SOARES, F. A.; ROCHA, J. B. T.; *et al.* Hemolytic effect of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. *Drug Chem Toxicol.* 28:397-407, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Coletânea de Informações sobre o Mercúrio Incluindo padrões ambientais no Brasil. 27 de Janeiro de 2010.

BREWER, A. C.; MURRAY, T. V.; ARNO, M.; ZHANG, M.; ANILKUMAR, N. P.; *et al.* Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes in vivo. *Free Radic Bio Med.* 51:205–15, 2011.

BRIONES, A. M.; TOUYZ, R. M. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Curr Hypertens Rep.* 12:135–42, 2010.

BULAT, P.; DUJIĆ, I.; POTKONJAK, B.; VIDAKOVIĆ, A. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. *Int Arch Occup Environ Health.* 71(Suppl):S37-9, 1998.

BURDORF, A.; FIGA-TALAMANCA, I.; JENSEN, T. K.; THULSTRUP, A. M. Effects of occupational exposure on the reproductive system: core evidence and practical implications. *Occupational Medicine.* 56:516–20, 2006.

CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P.; ARTESE, L.; *et al.* Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats. *Br J Ind Med.* 49:3226-32, 1992.

CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens.* 8(1), 2001.

CHAN, E. C.; DATLA, S. R.; DILLEY, R.; HICKEY, H.; DRUMMOND, G. R.; *et al.* Adventitial application of the NADPH oxidase inhibitor apocynin in vivo reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits. *Dusting Cardiovascular Research.* 75:710–8, 2007.

CHALUPKA, S.; CHALUPKA, A. N. The Impact of Environmental and Occupational Exposures on Reproductive Health. *JOGNN,* 39(1):84-102, 2010.

CHATTERJEE, A.; CATRAVAS, J. D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology.* 49(4-6):134-40, 2008.

CHEN, A. F.; CHEN, D-D.; DAIBER, A.; FARACI, F. M.; LI, H.; *et al.* Free Radical Biology of the Cardiovascular System. *Clin Sci (Lond)* [In press]. 2012.

CIARCIA, R.; DAMIANO, S.; PANICO, C.; SCANNI, R.; FIORITO, F.; *et al.* Apocynin activity in spontaneously hypertensive rats (SHR): preliminary studies in vivo. *Vet Res Commun.* 34(Suppl 1):S83-6, 2010.

CLARKE, S. J.; KHALIULIN, I.; DAS, M.; PARKER, J. E.; HEESOM, K. J.; *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic

preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ Res.* 102:1082-90, 2008.

CLARKSON, T. W. The pharmacology of mercury compounds. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 12:375–406, 1972.

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

CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 34(4):369-403, 1997.

CUNHA, M. E. S. Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas. Portugal, 2008.

DA CUNHA, V.; ROSSONI, L. V.; OLIVEIRA, P. A.; POTON, S.; PRETTI, S. C.; *et al.* Cyclooxygenase inhibition reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Clin Exp Hypertens.* 22:203-15, 2000.

DA CUNHA, V.; SOUZA, H. P.; ROSSONI, L. V.; FRANÇA, A. S.; VASSALLO, D. V. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. *Arch Environ Contam Toxicol.* 39(1):124-30, 2000.

DA SILVA, P. M. Modulação da função endotelial: um objetivo a prosseguir na terapêutica cardiovascular. *Rev Port Clin Geral.* 16:293-311, 2000.

DE CAVANAGH, E. M.; INSERRA, F.; FERDER, M.; FERDER, L. From mitochondria to disease: role of the reninangiotensin system. *Am J Nephrol.* 27:545–53, 2007.

DE JESUS, L. F.; MARINHA, M. S; MOREIRA, F. R. Amálgama dentário: fonte de contaminação por mercúrio para a Odontologia e para o meio ambiente. *Cad. Saúde Colet.* 18(4):509-15, 2010.

DE OLIVEIRA, S. F.; DA LUZ, P. L.; RAMIRES, J. A. F. Disfunção vascular no diabetes melito. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 8(5), 1998.

DIDION, S. P.; FARACI, F. M. Angiotensin II produces superoxide-mediated impairment of endothelial function in cerebral arterioles. *Stroke.* 34:2038–42, 2003.

DIKALOV, S. I.; NAZAREWICZ, R. R. Angiotensin II-Induced Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Potential Mechanisms and Relevance for Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal [In Press]*, 2012.

DIKALOVA, A. E.; BIKINEYEVA, A. T.; BUDZYN, K.; NAZAREWICZ, R. R.; MCCANN, L.; *et al.* Therapeutic Targeting of Mitochondrial Superoxide in Hypertension. *Circ Res.* 107(1):106–16, 2010.

DODD-O, J. M.; WELSH, L. E.; SALAZAR, J. D.; WALINSKY, P. L.; PECK, E. A.; SHAKE, J. G.; *et al.* Effect of NADPH oxidase inhibition on cardiopulmonary bypass-induced lung injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(2):H927-36, 2004.

DREIEM, A.; SEEGAL, R. F. Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calciumdependent and ROS-independent. *Neurotoxicology.* 28(4):720–6, 2007.

DURAK, D.; KALENDER, S.; UZUN, F. G.; DEMIR, F.; KALENDER, Y. Mercury chloride-induced oxidative stress in human erythrocytes and the effect of vitamins C and E in vitro. *African Journal of Biotechnology.* 9(4):488-95, 2010.

DUSSE, L.M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Rio de Janeiro.* 39(4):343-50, 2003.

DUTTA, S.; RITTINGER, K. Regulation of NOXO1 activity through reversible interactions with p22 and NOXA1. *PLoS One.* 5:e10478, 2010.

ECCLES, C. U.; ANNAU, Z. Prenatal methyl mercury exposure: II. Alterations in learning and psychotropic drug sensitivity in adult offspring. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4:377-82, 1982.

ECKHARDT, W.; BELLMANN, K.; KOLB, H. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in β cells by environmental factors: heavy metals. *Biochem J.* 338:695–700, 1999.

EL-DEMERDASH, F. M. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver and blood of rats. *J Environ Sci Health.* 36:489-99, 2001.

ELIGINI, S.; BARBIERI, S. S.; CAVALCA, V.; CAMERA, M.; BRAMBILLA, M.; *et al.* Diversity and similarity in signaling events leading to rapid Cox-2 induction by tumor necrosis factor-alpha and phorbol ester in human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 65:683–93, 2005.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; PORCIUNCULA, L. O.; MORSCH, V. M.; MARTINS, A. F.; SOUZA, D. O. G. Effect of mercury chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol. Toxicol.* 79:136-43, 1996.

FÉLÉTOU, M; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British Journal of Pharmacology.* 164:894–912, 2011.

FELIZZOLA, L. R.; SOBRINHO, J. R. R.; ZORN, W. W.; BELIEN, B. V. O papel do endotélio vascular na fisiologia circulatória. *Cir Vasc Angiol.* 12:129-36, 1996.

FERREIRA, A.L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil.* 43(1):61-8, 1997.

FLAVAHAN, N. A. Balancing prostanoid activity in the human vascular system. *Trends Pharmacol Sci.* 28:106–10, 2007.

FRANKO, A.; BUDIHNA, M. V.; DODIC-FIKFAK, M. Long-Term Effects of Elemental Mercury on Renal Function in Miners of the Idrija Mercury Mine. *Ann. occup. Hyg.* 49(6):521–7, 2005.

FRIBERG, L.; VOSTAL, J. Mercury in the environment: an toxicological Appraisal. Cleveland: CRC Press., Inc., 1972.

FRISBEEM, J. C.; MAIER, K. G.; STEPP, D. W. Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:H2160–8, 2002.

FUJIMURA, M.; USUKI, F. Differing effects of toxicants (Methylmercury, Inorganic Mercury, Lead, Amyloid b, and Rotenone) on cultured rat cerebrocortical neurons: differential expression of Rho proteins associated with neurotoxicity. *Toxicological Sciences,* 126(2):506–14, 2012.

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

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

FURST, A.; RADDING, S. B. Mercury (Hg). *Encyclopedia of Toxicology.* San Diego: Academic Press. 2:288-9, 1998.

GALVÃO, L. A. C.; COREY, G. Mercurio. Metepec, México: ECO – Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/OPS/OMS, 82 p. Série Vigilância, n. 7, 1987.

GANTHER, H. F.; GOUDIE, C.; SUNDE, M. L.; KOPECKY, M. J.; WAGNER, P. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Scienc.* 175:1122-4, 1972.

GARCÍA-REDONDO, A. B.; BRIONES, A. M.; AVENDAÑO, M. S.; HERNANZ, R.; ALONSO, M. J.; *et al.* Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. *Journal of Hypertension.* 27:1814–22, 2009.

GHOSH, M.; DI WANG, H. D.; MCNEILL, J. R. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*. 141:562-73, 2004.

GIODA, A.; HANKE, G.; ELIAS-BONETA, A.; JIMÉNEZ-VELEZ, B. A pilot study to determine mercury exposure through vapor and bound to PM10 in a dental school environment. *Toxicology and Industrial health*. 23:103-13, 2007.

GIUBERTI, K. Efeitos da exposição crônica a baixas concentrações de cloreto de mercúrio (20 η M) sobre o sistema cardiovascular de ratos. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular. Vitória, ES, 2010.

GOYER, R. A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. (Eds.) *Casarett and Doull's toxicology – the basic science of poisons*. 3. ed. New York: Macmillan Publication. Co., 1986, p. 605-09.

GRIENDLING, K. K.; MINIERI, C. A.; OLLERENSHAW, J. D.; ALEXANDER, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 74:1141–8, 1994.

GRIGOLETTO, J. C.; OLIVEIRA, A. S.; MUÑOZ, S. I. S.; ALBERGUINI, L. B. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Exposição ocupacional por uso de mercúrio em odontologia: uma revisão bibliográfica. *Ciênc. Saúde Coletiva*. 13(2):533-42, 2008.

GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W.; KOTANKO, P. Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol*. 32:2969-72, 1983.

GUALLAR, E.; SANZ-GALLARDO, I.; VAN'T VEER, P.; BODE, P.; ARO, A.; GÓMEZ-ARACENA, J.; KARK, J. D.; RIEMERSMA, R. A.; MARTÍN-MORENO, J. M.; KOK, F. J. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 347:1747-54, 2002.

GUZIK, T. J.; CHEN, W.; GONGORA, M. C.; GUZIK, B.; LOB, H. E.; *et al.* Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 52:1803–9, 2008.

HALBACH, S. Mercury compounds: lipophilicity and toxic effects on isolated myocardial tissue. *Archives of Toxicology*. 64:315-9, 1990.

HALBACH, S.; SCHONSTEINER, G.; EBNER, F.; REITER, M. The effects of pchloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBS) on force of contraction of mammalian myocardium and on ATP hydrolysis by sarcolemmal ATPase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 318:121-29, 1981.

HAMILTON, C. A.; BROSNAN, M. J.; AL-BENNA, S.; BERG, G.; DOMINICZAK, A. F. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*. 40(5):755-62, 2002.

HANNA, C. W.; BLOOM, M. S.; ROBINSON, W. P.; KIM, D.; PARSONS, P. J.; *et al.* DNA methylation changes in whole blood is associated with exposure to the environmental contaminants, mercury, lead, cadmium and bisphenol A, in women undergoing ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction*. 27(5):1401–10, 2012.

HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NADAGAWA, K.; MATSUURA, H. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*. 346:1954-62, 2002.

HIRAOKA, W.; VAZQUEZ, N.; NIEVES-NEIRA, W.; CHANOCK, S. J.; POMMIER, Y. Role of oxygen radicals generated by NAD(P)H oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J Clin Invest*. 102:1961–8, 1998.

HOCH, N. E.; GUZIK, T. J.; CHEN, W.; DEANS, T.; MAALOUF, S. A.; *et al.* Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 296:R208–16, 2009.

HOUSTON, M. C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med*. 13:S128-33, 2007.

HOUSTON, M. C. Role of Mercury Toxicity in Hypertension, Cardiovascular Disease, and Stroke. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2011.

HU, H.; MOLLER, G.; ABEDI-VALUGERDI, M.; Thiol compounds inhibit mercury-induced immunological and immunopathological alterations in susceptible mice. *Clin Exp Immunol*. 107:68–75, 1997.

HUANG, CS; NARAHASHI, T. Mercury chloride modulation of the GABAA receptorchannel complex in rat dorsal root ganglion neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 140:508-20, 1996.

HUANG, Y. L.; CHENG, S. L.; LIN, T. H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercury chloride. *Biol Trace Elem Res*. 52:193-206, 1996.

INSUG, O.; DATAR, S.; KOCH, C. J.; SHAPIRO, I. M.; SHENKER, B. J. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology*. 124:211–24, 1997.

JACKSON, L. W.; HOWARDS, P. P.; WACTAWSKI-WENDE, J.; SCHISTERMAN, E. F. The association between cadmium, lead and mercury blood levels and reproductive hormones among healthy, premenopausal women. *Human Reproduction*. 26(10):2887–95, 2011.

JAN, A. T.; ALI, A.; HAQ, Q. M. R. Glutathione as an antioxidant in inorganic mercury induced nephrotoxicity. *Journal of Postgraduate Medicine* 57(1):72-7, 2011.

KABEER, I. A. S.; MOORTHY, K. S.; CAMERON, J. A.; DESALAH, D. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 40:249-54, 1988.

KIM, S. H.; JOHNSON, V. J.; SHARMA, R. P. Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. *Nitric Oxide*. 7:67-74, 2002.

KIMURA, S.; ZHANG, G. X.; NISHIYAMA, A.; SHOKOJI, T.; YAO, L.; *et al.* Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension*. 45:438-44, 2005.

KINGMAN, A.; ALBERTINI, T.; BROWN, L. J. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US military population. *J Dent Res*. 77(3): 461-71, 1998.

KIRITOSHI, S.; NISHIKAWA, T.; SONODA, K.; KUKIDOME, D.; SENOKUCHI, T.; *et al.* Reactive Oxygen Species from Mitochondria Induce Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Human Mesangial Cells Potential Role in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 52, 2003.

KISHIMOTO, T.; OGURI, T.; ABE, M.; KAJITANI, H.; TADA, M. Inhibitory effect of methylmercury on migration and tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Arch Toxicol*. 69(6):357-61, 1995.

KOBAL, A. B.; HORVAT, M.; PREZELJ, M.; *et al.* The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol*. 17:261-74, 2004.

KOBAL, A. B.; PREZELJ, M.; HORVAT, M.; KRSNIK, M.; GIBICAR, D.; *et al.* Glutathione level after long-term occupational elemental mercury exposure. *Environmental Research*. 107:115-23, 2008.

LACERDA, L.D. Contaminação por mercúrio no Brasil: fontes industriais vs garimpo de ouro. *Química Nova*. 20(2):196-9, 1997.

LAFEBER, F. P.; BEUKELMAN, C. J.; VAN DEN WORM, E.; VAN ROY, J. L.; VIANEN, M. E.; VAN ROON, J. A.; *et al.* Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 38(11):1088-93, 1999.

LANGWORTH, S.; SALLSTEN, G.; BARREGARD, L.; CYNKIER, I.; LIND, M. L.; *et al.* Exposure to mercury vapor and impact on health in the dental profession in Sweden. *J Dent Res*. 76:1397-404, 1997.

- LANZAFAME, F. M.; VIGNERA, S. L.; VICARI, E.; CALOGERO, A. E. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 19(5):638–59, 2009.
- LETO, T. L.; MORAND, S.; HURT, D.; UEYAMA, T. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal*. 11:260, 2009.
- LI, W.; JI, Z. L.; ZHUO, G. C.; XU, R. J.; WANG, J.; *et al.* Effects of a selective cyclooxygenase-1 inhibitor in SKOV-3 ovarian carcinoma xenograft-bearing mice. *Med Oncol*. 27:98–104, 2009.
- LIM, W. C.; PARK, J. B.; LEE, Y. J. Analysis of angiotensin II mediated COX-2 downregulation in angiotensin II- or aldosterone-infused hypertensive rat. *Biol Pharm Bull*. 26:1086–8, 2003.
- LU, X.; GUO, X.; WASSALL, C. D.; KEMPLE, M. D.; UNTHANK, J. L.; KASSAB, G. S. Reactive oxygen species cause endothelial dysfunction in chronic flow-overload. [In Press] *J Appl Physiol*, 2010.
- LUND, B. O.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg (II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 45:2017- 24, 1993.
- LUND, B. O.; MILLER, M. D.; WOODS, J. S. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 42:181-7, 1991.
- MACHADO, A. C.; PADILHA, A. S.; WIGGERS, G. A.; SIMAN, F. D. M.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V. Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 24:92-7, 2007.
- MACKENZIE, A.; MARTIN, W. Loss of endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta by oxidant stress: restoration by superoxide dismutase mimetics. *Br J Pharmacol*. 124:719–28, 1998.
- MADAMANCHI, N. R.; RUNGE, M. S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*. 100:460–73, 2007.
- MAILMAN, R. B. Heavy metals. In: GUTHRIE, F. E.; PERRY, J. J. (Eds.) *Introduction to environmental toxicology*. New York: Oxford, Elsevier, North Holland, Inc., 1980, p. 37-9.
- MALDONADO, P. D.; MOLINA-JIJÓN, E.; VILLEDA-HERNANDEZ, J.; GALVÁN-ARZATE, S.; SANTAMARÍA, A.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J. NADPH oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/ prooxidant model of Huntington's 76 disease in rats: protective role of apocynin. *J Neurosci Res*. 2009.

MANEA, A.; TANASE, L. I.; RAICU, M.; SIMIONESCU, M. Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 396:901–7, 2010.

MASSARONI, L.; OLIVEIRA, E. M.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V. Effects of mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Braz J Med Biol Res.* 25(8):861-4, 1992.

MASSARONI, L.; ROSSONI, L. V.; AMARAL, S. M.; STEFANON, I.; OLIVEIRA, E. M.; VASSALLO, D. V. Haemodynamic and electrophysiological acute toxic effects of mercury in anaesthetized rats and in langendorff perfused rat hearts. *Pharmacol Res.* 32(1-2):27-36, 1995.

MELO, L. G.; GNECCHI, M.; PACHORI, A. S.; KONG, D.; WANG, K.; LIU X.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J. Endothelium-targed gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1761-74, 2004.

MCKELVEY, W.; GWYNN, R. C.; JEFFRY, N.; *et al.* A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York City adults. *Envirom Health Perspect.* 115:1435-41, 2007.

MILLER, J. M.; CHAFFIN, D. B.; SMITH, R. G. Subclinical psychomotor and neuromuscular changes in workers exposed to inorganic mercury. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 36:725-33, 1975.

MIYAGAWA, K.; OHASHI, M.; YAMASHITA, S.; KOJIMA, M.; SATO, K.; *et al.* Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 25:415–21, 2007.

MOLLNAU, H.; WENDT, M.; SZOCS, K.; LASSEGUE, B.; SCHULZ, E.; *et al.* Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 90:e58-65, 2002.

MONTERA, V. S. P. Benefícios dos nutrientes antioxidantes e seus cofatores no controle do estresse oxidativo e inflamação na insuficiência cardíaca. *Revista da SOCERJ.* 20(1), 2007.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: Experimental evidence and clinical controversies. *Annals of Medicine* 44(Suppl 1):S2–16, 2012.

MORA-PALE, M.; WEÏWER, M.; YU, J.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Inhibition of human vascular NADPH oxidase by apocynin derived oligophenols. *Bioorg Med Chem.* 17(14):5146-52, 2009.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Toxicological Effects of Methylmercury. National Research Council, Washington, DC, USA, 2000.

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

NEVES, M. F.; ENDEMANN, D.; AMIRI, F.; VIRDIS, A.; PU, Q.; *et al.* Small artery mechanics in hyperhomocysteinemic mice: effects of angiotensin II. *J Hypertens.* 22:959–66, 2004.

NIELSEN, K. C.; OWMAN, C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.* 27(1):33-42, 1971.

NYLAND, J. F.; FAIRWEATHER, D.; SHIRLEY, D. L.; DAVIS, S. E.; ROSE, N. R.; *et al.* Low-dose inorganic mercury increases severity and frequency of chronic coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis in mice. *Toxicological Sciences* 125(1):134–43, 2012.

OLIVEIRA, E. M.; MOREIRA, F. A.; SALEH, A. S.; ROCHA, J. B. T.; SARKIS, J. J. F. Anais da VI reunião anual da FESBE, abstract, 1.92:42, 1991.

OLIVEIRA, E. M.; VASSALLO, D. V. Effects of mercury on the contractility of isolated rat cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res.* 25(10):1037-40, 1992.

OLIVEIRA, E. M.; VASSALLO, D. V.; SARKIS, J. J.; MILL, J. G. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. *Toxicol Appl Pharmacol.* 128:86-91, 1994.

OROSZ, Z.; CSISZAR, A.; LABINSKY, N.; *et al.* Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292:H130–9, 2007.

PARAVICINI, T. M.; GULLUYAN, L. M.; DUSTING, G. J.; DRUMMOND, G. R. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ Res.* 91:54-61, 2002.

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. *Altern Med Rev.* 11:114-27, 2006.

PEÇANHA, F. M.; WIGGERS, G. A.; BRIONES, A. M.; PEREZ-GIRON, J. V.; MIGUEL, M.; GARCIA-REDONDO, A. B.; VASSALLO, D.V.; ALONSO, M. J.; SALICES, M. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. *J Physiol Pharmacol.* 61(1):29-36, 2010.

PEIXOTO, N. C. Atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (d-ALA-D) (E.C.: 4.2.1.24) como indicador da intoxicação de ratos jovens com metais pesados nas três principais fases de crescimento cerebral rápido pós-natal. 161f.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2000.

PEIXOTO, N. C. Prevenção dos efeitos tóxicos do cloreto de mercúrio em ratos jovens pelo cloreto de zinco: papel das metalotioneínas. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica Toxicológica. Santa Maria, RS, 2006.

PEROTTONI, J.; RODRIGUES, O. E. D.; PAIXÃO, M. W.; ZENI, G.; LOBATO, L. P.; *et al.* Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem Toxicol.* 42:17-28, 2004.

PETERS, E. A.; HILTERMANN, J. T. N.; STOLK, J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radical Biology and Medicine.* 31(11):1442-7, 2001.

PETRY, A.; WEITNAUER, M.; GÖRLACH, A. Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal.* 13:467, 2010.

POLLACK, A. Z.; SCHISTERMAN, E. F.; GOLDMAN, L. R.; MUMFORD, S. L.; PERKINS, N. J.; *et al.* Relation of blood cadmium, lead, and mercury levels to biomarkers of lipid peroxidation in premenopausal women. *Am J Epidemiol.* 175(7):645–52, 2012.

PRADO, M. J. V.; DE OLIVEIRA, R. C.; FERREIRA, R. S. F.; VIEIRA, R. C. P. A.; DE PINHO, J. J. R. G. The withdrawal of thimerosal from pharmaceutical market and its substitution by quaternary ammonium derivatives. Evaluation of risk/benefit. *Lecta.* 22(1/2):37-47, 2004.

PUDDU, P.; PUDDU, G. M.; GALLETTI, L.; CRAVERO, E.; MUSCARI, A. Mitochondrial dysfunction as an initiating event in atherogenesis: a plausible hypothesis. *Cardiology.* 103:137–41, 2005.

RABÊLO, L. A.; DE SOUZA, V. N.; DA FONSECA, L. J. S.; SAMPAIO, W. O. Redox Unbalance: NADPH Oxidase as Therapeutic Target in Blood Pressure Control. *Arq Bras Cardiol.* 94(5):643-51, 2010.

RAJAGOPALAN, S.; KURZ, S.; MUNZEL, T.; TARPEY, M.; FREEMAN, B. A.; *et al.* Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 97:1916–23, 1996.

REY, F. E.; CIFUENTES, M. E.; KIARASH, A.; QUINN, M. T.; PAGANO, P. J. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂⁻ and systolic blood pressure in mice. *Circ Res.* 89:408–14, 2001.

RIBAROV, S. R.; BENOVA, L. C. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 640:721-6, 1981.

RICE, D. C. The US EPA reference dose for methylmercury: sources of uncertainty. *Environ Res.* 95: 406-13, 2004.

RIGANTI, C.; COSTAMAGNA, C.; DOUBLIER, S.; *et al* . The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 228(3):277-85, 2008.

RISHER, J. F.; NICKLE, R. A.; AMLER, S. N. Elemental mercury poisoning in occupational and residential settings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 206:371-9, 2003.

ROSSONI, L. V.; AMARAL, S. M. C.; VASSALLO, P. F.; FRANÇA, A.; OLIVEIRA, E. M.; VARNER, K. J.; VASSALLO, D. V. Effects of mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. *Braz J Med Biol Res.* 32(8):989-97, 1999.

ROSSONI, L. V.; CUNHA, V.; FRANÇA, A.; VASSALLO, D. V. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses in modulated by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 34:887–92, 1999a.

RUPIN, A.; PAYSANT, J.; SANSILVESTRI-MOREL, P.; LEMBREZ, N.; LACOSTE, J. M.; CORDI, A.; *et al*. Role of NADPH oxidase-mediated superoxide production in the regulation of E-selectin expression by endothelial cells subjected to anoxia/reoxygenation. *Cardiovasc. Res.* 63:323-30, 2004.

SALGADO, P. E. T. Metais em alimentos. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo, Atheneu Ed., 2003. Cap. 5, p. 405-26.

SALONEN, J. T.; MALIN, R.; TUOMAINEN, T. P.; NYSSONEN, K.; LAKKA, T. A.; LEHTIMAKI, T. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *BMJ.* 319(7208): 487-8, 1999.

SALONEN, J. T.; SEPPANEN, K.; LAKKA, T. A.; SALONEN, R.; KAPLAN, G. A. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis.* 148:265-73, 2000.

SANDBORGH-ENGLUND, G.; ELINDER, C. G.; JOHANSON, G.; LIND, B.; SKARE, I.; *et al*. The absorption, blood levels, and excretion of mercury after a single dose of mercury vapor in humans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 150:146–53, 1998.

SCHLÜTER, T.; STEINBACH, A. C.; STEFFEN, A.; RETTIG, R.; GRISK, O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. *Cardiovascular Research.* 80:271–9, 2008.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 10(4), 2004.

SCHULZ, E.; WENZEL, P.; MÜNDEL, T.; DAIBER, A. Mitochondrial redox signaling: interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* [In press], 2012.

SEDEEK, M.; HÉBERT, R. L.; KENNEDY, C. R.; *et al.* Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 18:122–7, 2009.

SENEJOUX, F.; GIRARD-THERNIER, C.; BERTHELOT, A.; BÉVALOT, F.; DEMOUGEOT, C. New insights into the mechanisms of the vasorelaxant effects of apocynin in rat. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2012.

SENER, G.; SEHIRLI, O.; TOZAN, A.; VELIOGLU-ÖVUNÇ, A.; GEDIK, N.; OMURTAG, G. Z. Ginkgo biloba extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food Chem. Toxicol*. 45:543-550, 2007.

SHARMA, M.; ZHOU, Z.; MIURA, H.; PAPAPETROPOULOS, A.; MCCARTHY, E. T.; SHARMA, R.; *et al.* ADMA injures the glomerular filtration barrier: role of nitric oxide and superoxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 296:F1386–95, 2009.

SHEINER, E. K.; SHEINER, E.; HAMMEL, R. D.; POTASHNIK, G.; CAREL, R. Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Ind Health*. 41(2):55-62, 2003.

SIGEYUKI, A.; ETO, K.; KURISAKI, E.; GUNJI, H.; HIRAIWA, K.; *et al.* Acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathol Int*. 50:169-74, 2000.

SIKORSKI, R.; JUSZKIEWICZ, T.; PASZKOWSKI, T.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T. Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational exposure to metallic mercury. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 59(6):551-7, 1987.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 48(6), 2004.

SIROIS, J.; RICHARDS, J. S. Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J Biol Chem*. 267:6382–8, 1992.

SKERFVING, S. B.; COPPLESTONE, J. F. Poisoning caused by the consumption of organomercury-dressed seed in Iraq. *Bull. World Health Organ*. 54:101-12, 1976.

SMITH, W. L.; SONG, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases 1- and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:115-28, 2002.

SOLEO, L.; URBANO, M. L.; PETRERA, V.; AMBROSI, L. Effects of low exposure to inorganic Mercury on psychological performance. *Br. J. Ind. Med.* 47(2):105-9, 1990.

STACEY, N. H.; KAPPUS, H. Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 63:29-35, 1982.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of Inflammation.* 2008.

STERN, A. H. Balancing the risks and benefits of fish consumption. *Ann Intern Med.* 142:949, 2005.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol Med.* 18:321-36, 1995.

SWIFT, J. A. Morphology and histochemistry of human hair. *Exs.* 78:149-75, 1997; TAYLOR, N. E.; GLOCKA, P.; LIANG, M.; COWLEY JR, A. W. NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to salt-sensitive hypertension in Dahl S rats. *Hypertension.* 47(4):692-8, 2006.

TIAN, X. Y.; WONG, W. T.; LEUNG, F. P.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; *et al.* Oxidative Stress-Dependent Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin F2a Impairs Endothelial Function in Renovascular Hypertensive Rats. *Antioxid Redox Signal.* 16(4), 2012.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M.; SEDEEK, M.; BURGER, D.; MONTEZANO, A. C. NOX Isoforms and Reactive Oxygen Species in Vascular Health. *Mol Interv.* 11:27-35, 2011.

TSCHUDI, M. R.; MESAROS, S.; LUSCHER, T. F.; MALINSKI, T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension.* 27:32-5, 1996.

UNDERWOOD, E. J. Trace elements in human and animal nutrition. New York: Academic Press, 1977.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Mercury health effects. Washington, 1998. (EPA 600/8-84-019F).

VAMNES, J. S.; EIDE, R.; ISRENN, R.; HÖL, P. J.; GJERDET, N. R. Diagnostic value of a chelating agent in patients with symptoms allegedly caused by amalgam fillings. *J Dent Res.* 79(3):868-74, 2000.

VARGAS, M. F.; VIEIRA, D. O papel do óxido nítrico na proteção dos vasos sanguíneos. *Revista Mineira de Ciências da Saúde.* 1(1):101-9, 2009.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; DA SILVA, M. A. M.; GOMES, A. C. M. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. *Rev Bras Hipertens.* 14(4):269-74, 2007.

VASSALLO, D. V.; MASSARONI, L.; OLIVEIRA, E. M.; ROSSONI, L. V.; AMARAL, S. M.; VASSALLO, P. F. Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. *Arq. Bras. de Cardiologia.* 67(1), 1996.

VASSALLO, D. V.; MOREIRA, C. M.; OLIVEIRA, E. M.; BERTOLLO, D. M.; VELOSO, T. C. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 156(2):113-8, 1999.

VASSALLO, D. V.; SIMÕES, M. R.; FURIERI, L. B.; FIORESI, M.; FIORIM, J.; *et al.* Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res.* 44(x), 2011.

VAZIRI, N. D.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:582–93, 2006.

VIARO, F.; NOBRE, F.; EVORA, P. R. B. Expressão das óxido nítrico sintetases na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. *Arq Bras Cardiol.* 74(4), 2000.

VIRDIS, A.; COLUCCI, R.; FORNAI, M.; DURANTI, E.; GIANNARELLI, C.; *et al.* Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice. *Hypertension.* 49:679–86, 2007.

VIRDIS, A.; COLUCCI, R.; NEVES, M. F.; RUGANI, I.; AYDINOGLU, F.; *et al.* Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused mice: effects of cyclooxygenase-1 inhibition. *European Heart Journal Advance Access published [In Press]*, 2012.

VIRDIS, A.; NEVES, M. F.; AMIRI, F.; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *Journal of Hypertension.* 22:535–42, 2004.

VIRTANEN, J. K.; VOUTILAINEN, S.; RISSANEN, T. H. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:228-33, 2005.

VROOM, F. Q.; GREER, M. Mercury vapor intoxication. *Brain.* 95:305-18, 1972; WAKISAKA, Y.; MILLER, J. D.; CHU, Y.; BAUMBACH, G. L.; WILSON, S.; *et al.* Oxidative stress through activation of NAD(P)H oxidase in hypertensive mice with spontaneous intracranial hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28(6):1175-85, 2008.

WALDRON, H. A. Did the mad hatter have mercury poisoning? *Br. Med. J.* 287(6409):1961, 1983.

WHO - World Health Organization. Methylmercury. Environmental Health Criteria. International Program on Chemical Safety. 101-44, 1990.

WHO. Children's Exposure to Mercury Compounds. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2010.

WIDDER, J. D.; FRACCAROLLO, D.; GALUPPO, P.; HANSEN, J. M.; JONES, D. P.; *et al.* Attenuation of Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction and Hypertension by Overexpression of Thioredoxin 2. *Hypertension*. 54:338–44, 2009.

WIGGERS, G. A.; PEÇANHA, F. M.; BRIONES, A. M.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; MIGUEL, M.; VASSALLO, D. V.; CACHOFEIRO, V.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295:H1033-43, 2008a.

WIGGERS, G. A.; STEFANON, I.; PADILHA, A. S.; PEÇANHA, F. M.; VASSALLO, D. V.; OLIVEIRA, E. M. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 147(2):252-60, 2008b.

WILLIAMS, H. C.; GRIENGLING, K. K. NADPH Oxidase Inhibitors: New Antihypertensive Agents? *J Cardiovasc Pharmacol*. 50(1), 2007.

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

WONG, S. L.; LEUNG, F. P.; LAU, C. W.; *et al.* Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F₂α mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res*. 104:228-35, 2009.

XING, X. J.; RUI, Q.; DU, M.; WANG, D. Y. Exposure to lead and mercury in young larvae induces more severe deficits in neuronal survival and synaptic function than in adult nematodes. *Arch Environ Contam Toxicol*. 56(4):732-41, 2009.

XU, S.; ZENG, B.; DASKOULIDOU, N.; CHEN, G.; ATKIN, S. L.; LUKHELE, B. Activation of TRPC Cationic Channels by Mercurial Compounds Confers the Cytotoxicity of Mercury Exposure. *Toxicological sciences*. 125(1):56–68, 2012.

ZAFARI, A. M.; USHIO-FUKAI, M.; AKERS, M.; YIN, Q.; SHAH, A.; *et al.* Role of NADH/NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 32:488–95, 1998.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq Bras Cardiol* 87: e227-33, 2006.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev.* 52:113-43, 2000.

ZALUPS, R. K.; LASH, L. H. Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J Toxicol Environ Health.* 42(1):44, 1994.

ZHANG, L.; SHEPPARD, O. R.; SHAH, A. M.; BREWER, A. C. Positive regulation of the NADPH oxidase NOX4 promoter in vascular smooth muscles cells by E2F. *Free Radic Biol Med.* 45(5):679-85, 2008b.

ZHANG, Q.; MALIK, P.; PANDEY, D.; GUPTA, S.; JAGNANDAN, D.; CHANTEMELE, E. B.; *et al.* Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1627-33, 2008a.

ZHANG, Y.; GAO, D.; BOLIVAR, V. J.; LAWRENCE, D. A. Induction of autoimmunity to brain antigens by developmental mercury exposure. *Toxicological Sciences* 119(2):270–80, 2011.

ZHENG, W.; ASCHNER, M.; GHERSI-EGEA, J. F. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol Appl Pharmacol.* 192(1):1-11, 2003a.

ZHENG, Y.; MONESTIER, M. Inhibitory signal override increases susceptibility to mercury-induced autoimmunity. *J Immunol.* 171(3):1596-601, 2003b.

ZOLLA, L.; LUPIDI, G.; BELLELLI, A.; AMICONI, G. Effect of mercury ions on human erythrocytes. Relationships between hypotonic swelling and cell aggregation. *Biochim Biophys Acta.* 1328:273-80, 1997.

ANEXO - I



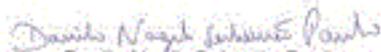
EMESCAM

Trabalhos e Conhecimento em Saúde

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 010/2011, relativo ao projeto intitulado "Efeito do Tratamento Antioxidante sobre a Reatividade Vascular da Artéria Aorta de Ratos Expostos Cronicamente ao Cloreto de Mercúrio (HgCl₂)", que tem como responsável **Giulia Alessandra Wiggers Peçanha** está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, Adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-EMESCAM), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 22/09/2011. Este certificado expira-se em 22/09/2015.

We hereby certify that the Protocol nº 010/2011, related to the project entitled **Effect of Antioxidant Treatment on The Vascular Reactivity of Aortic Artery of Rats Chronically Exposed to Mercury Chloride (Hgcl₂)**, under the supervision of **Giulia Alessandra Wiggers Peçanha**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA-EMESCAM), and was approved in 22/09/2011.


Danilo Nagib Salomão Paulo
Coordenador do CEUA-EMESCAM



ANEXO - II



Danize Rizzetti <danize.rizzetti@gmail.com>

PLOS ONE: Notification of co-authorship on manuscript [Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low Concentrations of Mercury.]

1 mensagem

PLOS ONE <plosone@plos.org>

30 de outubro de 2012 11:43

Para: Danize Aparecida Rizzetti <danize.rizzetti@gmail.com>

*Do not reply directly to this email.

Dear Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Danize Rizzetti,

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to PLOS ONE and entitled "Apocynin Prevents Vascular Effects Caused by Chronic Exposure to Low Concentrations of Mercury."

The corresponding author is: Dr. Giulia A. Wiggers

The full author list for the submission is: Danize Aparecida Rizzetti; João Guilherme Dini Torres; Alyne Goulart Escobar; Franck Maciel Peçanha; Francielli Webber Santos; Robson Luiz Puntel; Maria Jesús Alonso; Ana María Briones; Mercedes Salsicidas; Dalton Valentim Vassallo; Giulia A. Wiggers

If you are not aware of this submission, or if you should not be listed as a co-author, then please contact the journal office at plosone@plos.org.

Kind regards,
PLOS ONE

<http://plosone.edmgr.com/>