



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOÃO VITOR DOS ANJOS VIEIRA

**EFEITOS AGUDOS DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE O LEITO
VASCULAR RENAL DE RATOS**

VITÓRIA
2015

JOÃO VITOR DOS ANJOS VIEIRA

**EFEITOS AGUDOS DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE O LEITO
VASCULAR RENAL DE RATOS**

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Orientado por: Prof.^o Dr.^o Leonardo dos Santos.

VITÓRIA

2015

JOÃO VITOR DOS ANJOS VIEIRA

EFEITOS AGUDOS DO CLORETO DE MERCÚRIO SOBRE O LEITO VASCULAR RENAL DE RATOS

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em ____ de _____ de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^o Dr.^o Leonardo dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Ms.^a Bruna Fernandes de Azevedo
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - UFES
Avaliador

Renata Andrade Ávila
Universidade Federal de São João del Rei
Avaliador

*A Deus, pela condição que me deu
para chegar até aqui, e aos meus pais,
por tudo o que puderam me oferecer
durante minha vida, sou e serei
eternamente grato.*

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por seu imensurável amor, pelas portas que abriu, pelas pessoas que colocou no meu caminho para me ajudar e auxiliar a conquistar vitórias e concluir as missões que me foram dadas, pelas maravilhosas bênçãos que me concedeu e por tudo o que fizeste por mim.

Aos meus pais (João Carlos e Lidia) por guiarem os meus primeiros passos, por me educarem e concederem tudo aquilo que precisei para chegar até aqui, pelo carinho, amor, proteção, zelo, dedicação, preocupação, e tudo aquilo que um pai e uma mãe podem oferecer de melhor ao seu filho.

A minha família (primos(as), tios(as), avôs(ós)) pelo apoio, pelos momentos felizes e tristes, que me trouxeram experiências marcantes e ao mesmo tempo maravilhosas na minha vida.

Ao Dalton e Ivanita, por terem me concedido a oportunidade de frequentar o Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular e participar das atividades do laboratório.

Ao Leonardo e Bruna, por terem me dado a oportunidade de demonstrar o meu trabalho e dedicação nos experimentos e estudos, e por toda a ajuda que me concederam no decorrer da minha graduação e nos anos de iniciação científica.

A todos os professores que compartilharam as informações e o conhecimento no decorrer da minha graduação, e que me auxiliaram a ser um melhor aluno e profissional.

Aos meus amigos (Cleydiane, Jaderson, Josinei e Wanderson) que estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos durante a graduação, e que foram fundamentais para conclusão deste curso.

A todos do Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular (ICs, MSc e Drs) pelo suporte e apoio durante a graduação.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a semear, cultivar e colher os frutos desses anos de curso, de experiências e de aprendizado.

“...mas também nos gloriamos nas tribulações; sabendo que a tribulação produz a paciência, e a paciência a experiência, e a experiência a esperança; e a esperança não traz confusão, porquanto o amor de Deus está derramado em nossos corações pelo Espírito Santo que nos foi dado.”

Romanos 5: 3-5

*“Não pergunte do que somos capazes.
Dê-nos a missão!”*

RESUMO

Inúmeros estudos já foram realizados com o objetivo de investigar as modificações decorrentes de intoxicação por mercúrio nos diversos sistemas do corpo humano. Com isso, temos cada vez mais assegurado que a exposição ao mercúrio, mesmo em baixas concentrações, é considerada um fator de risco à saúde humana. O rim, órgão de suma importância na função depuradora e na homeostase da pressão sanguínea, é um dos mais afetados nas intoxicações por esse metal, embora pouco se saiba a respeito dos seus impactos sobre a hemodinâmica renal. Com base nessas informações, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da infusão aguda de HgCl_2 a 30nM, concentração normalmente identificada em indivíduos expostos, sobre o leito vascular renal e analisar seus possíveis efeitos tóxicos sobre as respostas vasoconstritoras e vasodilatadoras. Para tanto, removemos e isolamos o rim esquerdo de ratos Wistar, após procedimento cirúrgico, para perfusão do mesmo e análise da reatividade vascular num sistema de perfusão com fluxo constante (5,5 ml/min). Uma vez que o fluxo era constante, as variações na pressão de perfusão indicava mudanças na resistência vascular, de acordo com a $F = P \times R$. Fizemos infusões de 03 e 30 minutos de solução nutriente de Krebs-Helseleit (KH) somente, para os grupos CT, e KH adicionada de HgCl_2 para os grupos Hg. A infusão por 03 minutos de HgCl_2 não alterou a resposta contrátil à fenilefrina (FE), porém reduziu moderadamente o relaxamento endotélio-dependente à acetilcolina (ACh). Todavia, após exposição por 30 minutos de HgCl_2 , houve significativa redução na resposta contrátil à FE e no relaxamento à ACh. Não houve alteração da resposta de contração máxima ao KCl entre os grupos, porém, houve menor resposta dilatadora ao NPS, na presença de HgCl_2 . A inibição da síntese do NO com L-NAME aumentou a resposta contrátil à FE e reduziu o relaxamento à ACh nos rins do grupo CT. Entretanto, reduziu a resposta contrátil à FE e não modificou o reduzido relaxamento à ACh nos rins do grupo Hg. O aumento do fluxo promoveu aumento equivalente da pressão de perfusão em ambos os grupos, mas a perfusão com L-NAME promoveu amplificação desse efeito de maneira mais intensa no grupo Hg. Em conclusão, nossos dados indicam efeitos significantes do HgCl_2 agudamente sobre a reatividade do leito vascular renal, com a sugestão de efeitos diretos sobre a modulação endotelial do tônus vascular, seja durante aquela mediada por agonistas, seja aquela mediada pelo fluxo (isto é, pelo shear stress). Esses efeitos parecem envolver, primariamente, a produção/ação do óxido nítrico.

Palavras-chave: Acetilcolina. Cloreto de mercúrio. Fenilefrina. Óxido nítrico. Ratos. Reatividade vascular. Rim.

ABSTRACT

Numerous studies have been conducted with the objective of studying changes induced by mercury poisoning in the various biological systems. In this regard, it is assured that exposure to mercury, even at low concentrations, should be considered a risk factor to human health. The renal system, of importance in purifying function and homeostasis of blood pressure, is one of the most affected by mercury, although little is known about its impact on renal hemodynamics. Thus, our goal was to evaluate the effects of acute infusion HgCl_2 at 30nM, concentration found in exposed people, on the renal vascular bed reactivity. For this purpose, we isolate and remove the left kidney of Wistar rats after surgery, which was perfused by renal artery at a constant flow with a Krebs-Henseleit (KH) nutrition solution for the analysis of the vascular reactivity. Since flow was constant, changes on the perfusion pressure indicated changes on the vascular resistance, according to $F = P \times R$). Then, we infused for 03 or 30 minutes with KH only, in the CT group, and with KH and HgCl_2 in the Hg group. Infusion for 03 minutes did not affect the contractile response to phenylephrine (FE), but moderately reduced the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (ACh). However, after exposure for 30 minutes with HgCl_2 , there was a significant reduction in the contractile response to FE and relaxation to ACh. In the presence of HgCl_2 , there was no change of the maximum contraction to KCl, but there was a reduced dilatory response to NPS. Inhibition of NO synthesis by L-NAME perfusion increased the contractile response to PHE and reduced relaxation to ACh in the CT group. Notwithstanding, in the Hg group, L-NAME reduced the contractile response to PHE and did not change the already impaired relaxation to ACh. At increasing flows, there were equivalent increases in the perfusion pressure in both groups. However, infusion with L-NAME promoted an amplification of this response more intensively on the Hg group. In conclusion, our data indicate significant effects of acute HgCl_2 perfusion on the reactivity of the renal vascular bed, suggesting direct effects on endothelial modulation of the vascular tone, either during those mediated by agonists is that flow-mediated (i.e., shear stress). These effects appear to involve primarily the production/action of nitric oxide by the endothelium and the response of vascular smooth muscle.

Key-words: Acetylcholine. Kidney. Mercuric chloride. Nitric oxide. Phenylephrine. Rats. Vascular reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Local das preparações dos experimentos e equipamentos utilizados	16
Figura 2 - Rim na cuba sendo perfundido	16
Figura 3 - Rim na cuba sendo perfundido	16
Figura 4 - Exposição do rim esquerdo e da artéria renal	17
Figura 5 - Esquema simplificado das preparações dos experimentos	17
Figura 6 - Registro da pressão de perfusão renal; padronização da pré-contração de FE e relaxamento a ACh, e da curva de FE	21
Figura 7 - Resposta contrátil induzida por fenilefrina no leito vascular renal nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg) em dois intervalos de tempos (03 e 30 minutos).....	22
Figura 8 - Controle temporal das curvas dose-resposta a FE.....	23
Figura 9 - Resposta dilatadora dependente do endotélio induzida pela acetilcolina no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg) em dois intervalos de tempos (03 e 30 minutos).....	24
Figura 10 - A - resposta contrátil induzida por cloreto de potássio e, B - resposta dilatadora não dependente do endotélio induzida pelo nitroprussiato de sódio no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg).....	25
Figura 11 - Curva fluxo x pressão no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg).....	26
Figura 12 - Efeito do L-NAME, inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg)..	26
Figura 13 - Efeito do L-NAME, inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta dilatadora induzida pela acetilcolina no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg).....	27
Figura 14 - Curva fluxo x pressão na presença de L-NAME no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg).	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina
CO₂: Dióxido de carbono
CT: Controle
CONCEA: Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais
COX: Ciclooxigenase
ECA : Enzima conversora de angiotensina
EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EPM: Erro padrão da média
EROs: Espécies reativas de oxigênio
FE: Fenilefrina
FeSBE: Federação de Sociedades de Biologia Experimental
FC: Frequência cardíaca
g: grama
Hg: Mercúrio
HgCl₂: Cloreto de mercúrio
Hg₂Cl₂: Cloreto mercurioso
H₂O₂ : Peróxido de Hidrogênio
HgS: Sulfeto de mercúrio
KCl: Cloreto de potássio
Kg: Kilograma
KH: Krebs-Henseleit
L-NAME: L-N^G-Nitroarginina Metil Éster
M: molar
mg: miligrama
MLV: Músculo liso vascular
mM: milimolar
MeHg: Metilmercúrio
NaCl: Cloreto de sódio
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NADPH oxidase: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
nM: nanomolar
NO: Óxido nítrico

NOS: Enzima óxido nítrico sintase

NPS: Nitroprussiato de Sódio

O₂: oxigênio

O₂⁻: Ânion superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAS: Pressão arterial sistólica

SH: Grupo sulfidrila

SHR: ratos hipertensos

SOD: Enzima superóxido dismutase

u: Unidade de massa atômica

µg: micrograma

µM: micromolar

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 O MERCÚRIO E SUA APLICAÇÃO.....	01
1.2 MERCÚRIO: METAL TÓXICO E POLUENTE AMBIENTAL.....	01
1.3 CLASSIFICAÇÃO DO MERCÚRIO.....	03
1.4 EFEITOS TOXICOLÓGICOS NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS DOS MAMÍFEROS.....	04
1.4.1 Efeitos sobre o sistema cardiovascular.....	04
1.4.2 Efeitos sobre o sistema renal.....	05
1.5 FISILOGIA DA CIRCULAÇÃO RENAL.....	06
1.5.1 Anatomia dos rins.....	06
1.5.2 Circulação renal.....	07
1.6 ENDOTÉLIO VASCULAR.....	07
1.6.1 Regulação endotelial do tônus vascular.....	07
1.6.2 Vasodilatadores.....	08
1.6.2.1 Óxido nítrico.....	08
1.6.2.2 Prostaciclina.....	09
1.6.2.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio.....	09
1.6.3 Vasoconstritores.....	10
1.6.3.1 Endotelina.....	10
1.6.3.2 Prostaglandinas.....	10
1.6.3.3 Angiotensina II.....	11
1.6.3.4 Espécies reativas do oxigênio.....	12
1.7 MÚSCULO LISO VASCULAR.....	12
1.8 CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES.....	13
2 OBJETIVO.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	15
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	15
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	17
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19

4 RESULTADOS.....	20
4.1 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO RENAL.....	20
4.1.1 Padronização dos protocolos e das curvas dose-resposta à fenilefrina e à acetilcolina.....	20
4.1.2 Efeitos da exposição aguda ao HgCl ₂ sobre a resposta contrátil à fenilefrina no leito vascular renal de ratos.....	21
4.1.3 Efeitos da exposição aguda ao HgCl ₂ sobre a resposta dilatadora à acetilcolina no leito vascular renal de ratos.....	23
4.1.4 Efeitos da exposição aguda ao HgCl ₂ sobre a resposta contrátil e dilatadora, ao cloreto de potássio e nitroprussiato de sódio respectivamente, no leito vascular renal de ratos.....	24
4.1.5 Efeitos da exposição aguda ao HgCl ₂ na curva fluxo x pressão.....	25
4.1.6 Participação do óxido nítrico sobre a resposta contrátil à fenilefrina no leito vascular renal de ratos.....	26
4.1.7 Participação do óxido nítrico sobre a resposta dilatadora à acetilcolina no leito vascular renal de ratos.....	27
4.1.8 Participação do óxido nítrico na curva fluxo x pressão.....	27
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	33
7 REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 O MERCÚRIO E SUA APLICAÇÃO

O termo “metais pesados” compreende aqueles metais de alto/médio peso molecular como cobre, cádmio, prata, arsênio, cromo, estanho, selênio, antimônio, chumbo e mercúrio, e que são tóxicos em concentrações relativamente baixas. O uso de metais pesados como, por exemplo, o mercúrio, está ligado à história dos seres humanos. Há mais de 2.500 anos atrás os homens utilizavam o cinábrio (sulfeto de mercúrio), para desenhar nas paredes das cavernas e realizar pinturas faciais (Hylander & Meili, 2003; Clarkson et al., 2007, Ekino et al., 2007).

Nesse sentido, desde a antiguidade até os dias de hoje, o mercúrio é empregado em vários processos. Durante muitos anos o mercúrio foi usado como ingrediente de numerosos medicamentos, como, por exemplo, os diuréticos, os bactericidas, os antissépticos, os laxantes e os unguentos, no entanto, os sinais de intoxicação causados por estes medicamentos são relativamente raros. Em contrapartida, os casos de intoxicação por mercúrio devido à poluição ambiental têm trazido maior preocupação tal como revisado por Vassalo et al. (1996). Com a utilização intensificada do mercúrio pelo homem nas diversas áreas tecnológicas e científicas, como por exemplo, na produção de gás cloro e soda cáustica, em termômetros e pilhas, e principalmente na atividade mineradora, houve-se um grande aumento nas taxas de intoxicação de pessoas e animais. Conseqüentemente, isso trouxe uma maior demanda de pesquisas e estudos, devido ao alto poder de intoxicação que o mercúrio pode trazer para a população mundial.

1.2 MERCÚRIO: METAL TÓXICO E POLUENTE AMBIENTAL

Segundo Alexandre (2006), o mercúrio é considerado atualmente como um poluente ambiental de alto risco à saúde pública devido a sua elevada toxicidade e mobilidade nos ecossistemas. Sua exposição pode ocorrer por meio de origens naturais, como, por exemplo, liberação de gás da crosta terrestre, evaporação dos oceanos e queima de combustível fóssil; e artificiais, como, por exemplo, produzido por mineradoras, refinarias, indústria de cosméticos, despoldamento de madeira, amálgama dentário, hospitais, medicamentos, entre outros (Davidson et al., 2006; Lindberg et al., 2007; Vassalo et al., 1996; WHO, 1990). O mercúrio, uma vez

despejado no ambiente, não pode ser destruído e é altamente reativo do ponto de vista químico, o que explica a dificuldade de encontrá-lo em estado puro na natureza. Quando lançado em rios, é absorvido pelos tecidos dos animais e vegetais. Uma vez que os rios deságuam no mar, este poluente pode alcançar as águas salgadas e, em parte, depositar-se no leito oceânico. Além disso, este metal contido nos tecidos dos organismos vivos que habitam os mares acaba também se depositando, cedo ou tarde, nos sedimentos, representando um estoque permanente de contaminação para a fauna e a flora aquáticas, conseqüentemente, causando a morte de espécies ou a bioacumulação, que potencializa o efeito nocivo desta substância através das cadeias alimentares. O mercúrio também deposita-se no solo ou em corpos d'água de regiões mais distantes, graças à movimentação das massas de ar. Assim, ele pode se acumular em todos os organismos que constituem a cadeia alimentar do homem (Mendonça, 2010).

Acerca do ciclo do mercúrio no meio ambiente, tanto a Agência de Proteção Ambiental dos EUA - EPA (1997) quanto Boening (2000), mostram que, compreende desde a sua emissão por meio de processos naturais ou artificiais, até a sua circulação atmosférica por meio de seus vapores e pela precipitação que ocorre com as chuvas, realizando o seu retorno às terras e às águas.

Por causa de sua alta toxicidade, a exposição ao mercúrio tem trazido efeitos maléficos à saúde humana desde os tempos antigos, todavia as alterações resultantes da exposição dos seres humanos ao mercúrio só atraíram a atenção da sociedade científica após eventos trágicos que marcaram o mundo. Um exemplo claro foi o acidente em Minamata na década de 1950, no Japão, o qual causou a contaminação das águas e dos animais marinhos pelos dejetos de resíduos industriais (metilmercúrio, a espécie mais tóxica do mercúrio) lançados na baía de Minamata, tendo como consequência a morte de mais de mil pessoas, principalmente aquelas que residiam próximo à baía (Alexandre, 2006; Vassalo et al., 1996). Neste ocorrido, foi diagnosticado o primeiro caso de lesão do sistema nervoso central causado por mercúrio, além de enfermidades neurológicas congênitas, denominadas “doença de Minamata” ou “mal de Minamata”.

No Brasil, podemos citar, de acordo com Passos e Mergler (2008), que especialmente na região amazônica, a intoxicação por mercúrio iniciou-se por intermédio da utilização de métodos primitivos e perigosos na atividade descontrolada de mineração e extração de ouro. Esse tipo de atividade culminou

com o lançamento de mercúrio no meio ambiente, aumentando o nível desse metal nas águas e nos solos. Sabe-se que aproximadamente mais de 650 mil pessoas estão ou já estiveram envolvidas nos processos de garimpo na Amazônia, resultado uma descarga anual de aproximadamente 90 a 120 toneladas de mercúrio lançados no ecossistema local (Nriagu et al., 1992).

1.3 CLASSIFICAÇÃO DO MERCÚRIO

O mercúrio é um elemento químico de número atômico 80 (80 prótons e 80 elétrons) e massa atômica 200,59 u. É um dos seis elementos que se apresentam líquidos à temperatura ambiente ou a temperaturas próximas; pertence ao grupo (ou família) 12 (anteriormente chamada 2B) e faz parte da classe dos metais de transição (Webelements, 2015). No que diz respeito a sua categorização, o mercúrio é classificado em três principais grupos: elementar, orgânico e inorgânico. Sendo os orgânicos também chamados de organometálicos, originados da ligação covalente entre o mercúrio e o carbono; e os inorgânicos, oriundos da junção do mercúrio com o cloro, enxofre ou oxigênio (HSDB, 2004).

O mercúrio elementar é o mais volátil e a via mais importante de captação é a respiratória, sendo que 80% do vapor inalado é retido no organismo. Na forma de vapor é rapidamente absorvido através dos pulmões, podendo levar a danos no organismo (Clarkson et al., 1997; ATSDR, 1999). Sofre completa absorção pelas membranas alveolares, devido às suas características de alta difusibilidade e solubilidade em lipídios. Grande quantidade do vapor inalado permanece na corrente sanguínea e atravessa as barreiras hemato-encefálica e placentária. Em sua forma líquida é pouco absorvido e representa pequeno risco à saúde. Por possuir expansão volumétrica uniforme, alta tensão superficial e não possuir aderência às superfícies vítreas é utilizado em esfignomanômetro e termômetros. Por possuir baixa resistência elétrica e alta condutividade térmica é empregado em materiais eletro-eletrônicos. Devido ao seu alto poder de oxidação é usado em operações eletroquímicas como na indústria de cloro e soda. Devido à facilidade de formação de amálgamas com outros metais, é utilizado na indústria metalúrgica, na odontologia e no garimpo (Micaroni et al., 2000).

O mercúrio orgânico é encontrado em compostos de mercúrio que possuem uma ligação covalente a um átomo de carbono. Trata-se de grupo bastante heterogêneo, cuja potência varia de um composto para outro. A forma mais nociva

são os sais alquilados (metil-mercúrio). São mais absorvidos através do trato gastrointestinal do que os inorgânicos, porque possuem maior solubilidade em lipídios e exercem ação corrosiva menos intensa sobre a mucosa do intestino. Alguns já foram usados como pesticidas e antissépticos. (WHO, 1990).

O mercúrio inorgânico, antigamente usado como componente dos diuréticos, atualmente é usado em larga escala na indústria, fábricas de matéria plástica, fungicidas e germicidas, assim como na confecção de amálgama dentário. Após ser absorvido, distribui-se de forma bastante heterogênea, sendo encontrado em níveis mais altos nos rins (Vassalo et al. 1996). Pode ser encontrado em diferentes estados quando combinado com outros elementos químicos, dentre eles se destacam o cloreto de mercúrio (HgCl_2 , utilizado em nossos estudos), que é altamente tóxico e corrosivo; o cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2); o sulfeto de mercúrio (HgS) que possui coloração vermelha e devido a isso é utilizado como pigmento de tintas e o fulminato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{CNO})_2$) utilizado como detonador em explosivos (HSDB, 2004, Azevedo, 2003; ATSDR, 1999).

1.4 EFEITOS TOXICOLÓGICOS NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS DOS MAMÍFEROS

1.4.1 Efeitos sobre o sistema cardiovascular

Inúmeros estudos já mostram que as alterações cardiovasculares decorrentes do efeito do mercúrio, como, por exemplo, o aparecimento de arritmias, redução da atividade eletromecânica do coração (condução atrioventricular e desenvolvimento de força) e a da pressão sistólica em corações isolados expostos a concentrações micromolares (Massaroni et al., 1992 e 1995; Vassallo et al., 1999). Em concentrações mais altas de HgCl_2 (5 mg/kg) os estudos mostraram um aumento da resistência vascular pulmonar e redução da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) em ratos anestesiados expostos agudamente (Rossoni et al., 1999). Contraditoriamente, outros estudos demonstram que o mercúrio administrado agudamente em doses baixas provoca aumento da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) de ratos (Machado et al., 2007).

Pesquisas envolvendo ratos expostos cronicamente com baixas doses de mercúrio têm demonstrado que ele afeta a estrutura dos vasos de resistência e induz alteração na reatividade vascular em artérias mesentéricas e cerebrais,

decorrente da redução da biodisponibilidade do NO pelo aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$, derivada da NADPH oxidase (Peçanha et al., 2008).

Estudos também relatam que a exposição ao cloreto de mercúrio em baixas concentrações representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em ratos normotensos (Wistar) e um fator agregante aos riscos pré-existentes em ratos hipertensos (SHR), e que produz condensação da cromatina, indicando dano irreversível nas células musculares lisas de aorta de ratos Wistar (Giuberti et al., 2010).

Furieri et al (2011) demonstraram que a exposição ao mercúrio em doses baixas promove disfunção endotelial em artérias coronárias, evidenciado pela redução da biodisponibilidade de NO relacionado ao aumento do estresse oxidativo.

Em suma, sabe-se que este metal potencialmente induz disfunção endotelial, como resultado da diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) por aumentar o estresse oxidativo e produção de prostanóides contráteis, tendo a enzima NADPH oxidase a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) na vasculatura (Rizzetti et al., 2012).

1.4.2 Efeitos sobre o sistema renal

O mercúrio é uma substância particularmente nefrotóxica, que induz a degeneração de células glomerulares (Carmignani et al., 1989), com consequente perda da função glomerular (Carmignani et al., 1992); além da formação de glomerulonefrite auto-imune (Pesce et al., 1977). Também é referida necrose tubular, principalmente dos túbulos proximais (Clarkson, 1997; Zallups, 2000; Stacchiotti et al., 2004). Sabidamente, todas as lesões renais são dose-dependentes (Bohets et al., 1995; Burton et al., 1995; Pelletier et al., 1987 e Bagenstose et al., 1999). As alterações relacionadas à nefrotoxicidade renal são atribuídas à capacidade do mercúrio em ligar-se aos grupos tiol na membrana plasmática levando a uma redução deste grupamento intracelular, predispondo a alterações no metabolismo celular e aumento do estresse oxidativo (Girardi & Elias, 1995), disfunção mitocondrial, mudanças no metabolismo heme, apoptose e necrose celular (Zalups, 2000; Carranza-Rosales et al., 2005; Stacchiotti et al., 2006). Curiosamente, não há registros de estudos envolvendo os efeitos tóxicos sobre a hemodinâmica renal.

Devido à característica lipossolúvel do mercúrio, ele é altamente difusível, passando pelas membranas celulares, barreira hemato-encefálica e placentária,

chegando facilmente aos órgãos alvo. Quando presente na corrente sanguínea, o mercúrio sofre rápida oxidação nas hemácias e nos tecidos por meio da catalase e peroxidase transformando-se em mercúrio inorgânico (mercúrio mercúrio - Hg^{++}) e mercúrio mercurioso (Hg^+), limitando sua absorção (Halbach & Clarkson, 1978; Hursh et al., 1988; Asano et al., 2000; Clarkson et al., 2007). O mercúrio oxidado une-se fortemente ao grupamento $-\text{SH}$ e como consequência, inativa enzimas por sua toxicidade, o que pode levar a lesão tecidual além de interferir em vários processos metabólicos (Malmström et al., 1992; Asano et al., 2000; Gilman et al., 2007).

1.5 FISILOGIA DA CIRCULAÇÃO RENAL

O sistema renal também é conhecido com excretor ou excretório. Tem como órgãos principais os rins, e estes, por sua vez, têm quatro funções principais:

- 1) Depurar o sangue e promover excreção de metabólitos proteicos;
- 2) Controlar o pH sanguíneo;
- 3) Controlar o volume sanguíneo e assim controlar pressão arterial;
- 4) Secretar dois hormônios: eritropoietina (induz produção de hemácias na medula óssea) e renina-angiotensina (promove vasoconstrição e aumento de pressão arterial).

1.5.1 Anatomia dos rins

O ser humano possui dois rins que trabalham concomitantemente. Cada rim pesa cerca de 250 g e é composto pela pelve e os cálices renais, a medula e o córtex renal. Este último é o local onde são secretados os hormônios produzidos nos rins. O sangue vai entrar nos rins através das artérias renais; estas se subdividem em artérias arqueadas que vão dar origem a minúsculos vasos, as arteríolas aferentes, que, por sua vez, vão servir como porta de entrada de milhares de pequenas estruturas tubulares chamadas néfrons, localizados nas pirâmides da medula renal. Os néfrons são a unidade de filtração e funcionamento dos rins. Pode-se dizer que cada néfron tem uma função autônoma e é capaz de filtrar alguns mililitros de sangue. Portanto, se cada néfron filtrar alguns ml de sangue, milhares de néfrons trabalhando juntos podem limpar todos os 5 litros de sangue que possuímos, em média. Após a passagem pelos néfrons, a urina aí formada segue pelo túbulo coletor até os cálices e a pelve renal, onde é levada até os ureteres.

Estes deságuam na bexiga, que armazena a urina até sua excreção pela uretra (Santos, 2012).

1.5.2 Circulação renal

Pode-se afirmar que a principal função dos rins é a depuração ou filtração do sangue. A depuração serve para que os rins, mais especificamente os néfrons, possam retirar do sangue e excretar todos compostos nitrogenados resultantes da metabolização das proteínas. Os principais compostos excretados são a ureia, o ácido úrico e a creatinina. Além disso, ao realizar essa depuração os rins excretam íons H^+ e controlam pH sanguíneo e excretam mais ou menos água, regulando o volume de sangue. Para tanto, passam pelos nossos rins cerca de 180 litros de sangue por dia, o que equivale dizer que todo nosso sangue é purificado cerca de 36 vezes por dia. Assim o sistema renal trabalha com sobras, já que não seria a depuração de tal quantidade de sangue diariamente. São excretados cerca de 60 ml de ureia e 1,5 litros de urina todos os dias, medidas que evidentemente são dependentes da quantidade de água, Na^+ e proteínas ingeridas por dia.

1.6 ENDOTÉLIO VASCULAR

O endotélio vascular é uma camada de células finas que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. Sabe-se que sua função não é de simples barreira de difusão passiva entre os elementos do sangue circulante e o tecido intersticial. O endotélio intacto favorece a vasodilatação em diferentes condições de fluxo e estresse parietal e sua integridade é essencial à regulação do fluxo sanguíneo. Pode ser considerado um órgão endócrino, que responde a vários estímulos, produzindo e secretando localmente compostos metabolicamente ativos, que atuam nas células vizinhas; tem a capacidade de modular a motricidade vascular, a coagulação sanguínea e o crescimento e proliferação vascular (Aires et al., 2008; Cardoso et al., 1994; Furchgott et al. 1980, 1984).

1.6.1 Regulação endotelial do tônus vascular

O endotélio controla o tônus da musculatura lisa vascular pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. O endotélio vascular é capaz de produzir tanto substâncias vasodilatadoras (óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio), como também

substâncias vasoconstritoras (endotelina, prostaglandinas, angiotensina II e espécies reativas do oxigênio) (Aires et al., 2008; Cardoso et al., 1994).

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio preciso entre a liberação desses fatores, sendo mais importante a produção dos fatores relaxantes, superando o efeito dos agentes contráteis (Cardoso et al., 1994).

1.6.2 Vasodilatadores

1.6.2.1 Óxido nítrico

O principal fator vasodilatador de ação fisiológica liberado pelo endotélio é o óxido nítrico (NO). Este é liberado em situações em que existe aumento da tensão de cisalhamento exercida pelo sangue na parede das células endoteliais como, por exemplo, em situações de aumento do fluxo sanguíneo para um determinado território (Aires et al., 2008). Além de vasodilatação dependente do endotélio, o NO tem como função a regulação da pressão arterial, a transmissão sináptica e o controle da adesão dos elementos sanguíneos ao endotélio, diminuindo a permeabilidade vascular (Rizzetti et al., 2012).

O NO desempenha um papel de fundamental importância na regulação do tônus vascular e da homeostasia, o que pode ser verificado através de várias observações, como, por exemplo, na inibição da sua síntese, que cursa com diminuição drástica da vasodilatação dependente de endotélio e aumento da vasoconstrição (Cardoso et al., 1994).

A biossíntese do NO é feita pela óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima dimérica que contém um grupamento heme e requer as flavinas FAD e FMN, bem como o cofator pteridina para catalisar a oxidação da L-arginina (Cardoso et al., 1994). O NO depende da expressão da NOS e da biodisponibilidade de fatores que regulam a sua atividade (Chatterjee & Catravas, 2008). A diminuição na produção ou na biodisponibilidade de NO sugere ser o responsável pelo aumento da resistência vascular periférica e pelo surgimento de doenças cardiovasculares em modelos experimentais *in vivo* (Higashi et al., 2002). A produção excessiva ou não compensada de espécies reativas de oxigênio (EROs) 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 ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produzido em excesso durante situações de

estresse oxidativo. Grandes quantidades de $O_2^{\cdot -}$ formadas, principalmente pela enzima NADPH oxidase, captam o NO, promovendo a formação de peróxido de nitrito ($ONOO^-$) 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).

1.6.2.2 Prostaciclina

A prostaciclina (PGI_2) é uma prostaglandina derivada da clivagem do ácido araquidônico por ação da enzima ciclooxigenase (COX). A PGI_2 possui discreta ação fisiológica vasodilatadora, porém tem potente ação de antiagregante plaquetária (Aires et al., 2008). Sua ação depende da presença de receptores específicos (receptores IP) na parede das células musculares lisas vasculares. A estimulação dos receptores da prostaciclina leva a uma estimulação da adenilil ciclase produzindo um aumento de AMP cíclico e estimulação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) no músculo liso vascular. A PKA tem um efeito semelhante à PKG, podendo ativar canais de K^+ sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização e estimula a saída de Ca^{2+} do citosol inibindo a maquinaria contrátil (Cardoso et al., 1994).

1.6.2.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

O fator hiperpolarizante derivado do endotélio ou simplesmente EDHF possui uma origem ainda desconhecida e tem gerado controvérsias, pois parece ser representado por diferentes elementos na dependência do tipo de artéria e do modelo animal estudado. Como seu próprio nome diz, o EDHF induz hiperpolarização das células do músculo liso vascular, principalmente via aumento da probabilidade de abertura de canais para K^+ e/ou ativação da Na^+/K^+ -ATPase, entre outros mecanismos (Aires et al., 2008). Essa hiperpolarização do músculo liso vascular é geralmente resistente a inibidores da COX e inibidores da NOS. Entretanto, em alguns tipos de leitos vasculares, o próprio NO pode promover relaxamento por hiperpolarização dependente da abertura de canais para K^+ , indicando sua atuação como EDHF. De maneira geral, sua contribuição para a vasodilatação dependente do endotélio é maior nos vasos sanguíneos de resistência do que nas grandes artérias (Cardoso et al., 1994).

1.6.3 Vasoconstritores

1.6.3.1 Endotelina

A endotelina (ET) é o mais potente fator vasoconstritor liberado pelo endotélio, sendo capaz de induzir contração lenta, porém sustentada. A ET é um peptídeo formado por 21 aminoácidos, produzido e liberado pelas células endoteliais quando estimuladas via tensão de cisalhamento, hipóxia, angiotensina II e espécies reativas do oxigênio, entre outros (Aires et al., 2008).

Existem três isoformas de ET: ET-1, ET-2 e ET-3, porém o endotélio vascular é capaz de sintetizar somente a ET-1. A ET é sintetizada a partir da pré-pró-endotelina, que é clivada por uma endopeptidase formando a pró-endotelina, a qual sofre ação da enzima conversora de endotelina (ECE) formando a ET (Aires et al., 2008).

A ET pode mediar efeitos vasodilatadores ou vasoconstritores, na dependência da localização de seus receptores na parede vascular. Via receptores ET_A e ET_B , localizados no músculo liso vascular, ela induz contração e proliferação celular; porém esses mesmos receptores, quando localizados nas células endoteliais, determinam a produção de NO e PGI_2 , os quais induzem vasodilatação. O balanço das ações da ET em seus receptores endoteliais e na musculatura lisa vascular é que determina um efeito contrátil de maior ou de menor magnitude (Aires et al., 2008).

1.6.3.2 Prostaglandinas

Pela ação da COX, além de prostaglandina vasodilatador (PGI_2), existem também a formação de pequenas quantidades de prostanóides vasoconstritores, como, por exemplo, a prostaglandina H_2 (PGH_2), o tromboxano A_2 (TXA_2) e a prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$). Em circunstâncias normais, o efeito vasoconstritor da PGH_2 e do tromboxano A_2 é mascarado pelo efeito vasorelaxante da PGI_2 , do NO e do EDHF. Entre os vários estímulos que liberam TXA_2 e PGH_2 a partir das células endoteliais, destacam-se a noradrenalina, a serotonina, a histamina, a trombina e a hipóxia. Estes prostanóides agem em receptores específicos de membrana do músculo liso vascular, ativando a contração, e na membrana das plaquetas, ativando a agregação plaquetária (Aires et al., 2008).

1.6.3.3 Angiotensina II

A angiotensina II (Angio II) é formada por oito aminoácidos e assim como a endotelina, é um potente vasoconstritor além de induzir crescimento e proliferação celular. É um peptídeo derivado da proteína precursora angiotensinogênio através da ação sequencial de várias enzimas. Na via clássica do sistema renina-angiotensina (SRA), o angiotensinogênio é clivado pela enzima renina gerando angiotensina I (Angio I) que, por sua vez, sofre ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) originando a Angio II. Essas reações ocorrem no plasma e em vários tecidos como rins, cérebro, glândulas adrenais, ovários, músculo liso vascular e células endoteliais (Cardoso et al., 1994).

Existem três subtipos de receptores para Angio II conhecidos até o momento: AT_{1A} , AT_{1B} e AT_2 . A maioria dos efeitos fisiológicos da Ang II é mediada pela ativação de receptores do subtipo AT_1 , enquanto poucos efeitos, geralmente opostos àqueles desencadeados pela ativação de AT_1 , têm sido atribuídos à ativação de receptores AT_2 (Cardoso et al., 1994).

As ações da Angio II são dependentes de sua ligação a receptores específicos. Através do receptor AT_1 , localizado no músculo liso vascular, a Angio II induz contração e proliferação celular. Através do receptor AT_2 , localizado no endotélio, a Angio II exerce suas ações antiproliferativas e de vasodilatação, mediadas pela formação de óxido nítrico. Além das ações vasoconstritoras diretas, a Angio II, via receptor AT_1 , também ativa a síntese de endotelina, ativa a NADPH oxidase (aumentando a produção do $O_2^{\cdot-}$, o qual inativa o NO) e libera noradrenalina das terminações nervosas simpáticas. Além disso, como a enzima conversora de angiotensina está posicionada na superfície luminal da célula endotelial, ela também age sobre a bradicinina circulante (potente vasodilatador endógeno), clivando este peptídeo ativo em outro peptídeo sem atividade biológica. Assim, através de ação muscular direta, do aumento da produção e liberação de fatores vasoconstritores e da redução de mediadores vasodilatadores, a Angio II induz seu potente efeito contrátil (Aires et al., 2008).

1.6.3.4 Espécies reativas do oxigênio

O nosso organismo utiliza o O_2 e reações de oxidação para o fornecimento de energia e para a defesa contra invasores. A maioria do O_2 utilizado no metabolismo aeróbico é reduzida diretamente a H_2O pelo complexo citocromo oxidase, que evita

a formação de produtos intermediários. No entanto, uma série de intermediários oxigenados reativos é formada através de uma outra via que envolve a produção do radical livre $O_2^{\cdot -}$ (ânion superóxido) pela redução de um elétron do oxigênio molecular. O $O_2^{\cdot -}$ pode agir como um agente oxidante, sendo reduzido a H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), ou como agente redutor, doando o seu elétron extra ao NO para formar ONOO⁻ (peroxinitrito) (Cardoso et al., 1994).

Em condições fisiológicas, a quantidade de enzima superóxido dismutase (SOD) assegura que a primeira reação ocorra preferencialmente. Contudo, em condições de estresse oxidativo quando as células são expostas a níveis excessivos de espécies oxigenadas reativas, quantidades significativas de $O_2^{\cdot -}$ reage com o NO para formar ONOO⁻. Nesse caso, haverá uma diminuição da biodisponibilidade de NO endotelial, diminuindo o seu efeito vasorelaxante, somado ao próprio efeito vasoconstritor do $O_2^{\cdot -}$, além das consequências deletérias do ONOO⁻ (Cardoso et al., 1994).

1.7 MÚSCULO LISO VASCULAR

O músculo liso é formado por células fusiformes, núcleo central e maquinaria contrátil. Estão descritos dois tipos de células musculares lisas: as do músculo liso visceral, existente no tubo digestivo e demais órgãos musculares, e as do músculo liso vascular (Aires et al., 2008).

O músculo liso vascular possui grande importância na regulação da pressão arterial e na hipertensão. As membranas das células musculares contêm vários tipos de canais de K^+ , Ca^{2+} , e Cl^- . A contração é produzida principalmente pelo mecanismo de fosforilação da cadeia leve de miosina, no entanto, existem formas de contração prolongadas que determinam o tônus vascular (Ganong et al., 2012).

Fatores endoteliais estão correlacionados com o músculo liso vascular, como o NO, a PGI_2 e o EDHF derivados do endotélio. No caso do NO e PGI_2 , atuam ativando uma guanilato ciclase solúvel e a acoplada a receptor, respectivamente, que leva à redução do cálcio intracelular e promove o aumento da permeabilidade de canais de potássio, hiperpolarizando a célula muscular lisa. Além disso, também modificam a atividade de moléculas que, em última instância, reduzem o cálcio e a fosforilação da cadeia leve da miosina. A endotelina, a angiotensina II produzida localmente e os prostanóides vasoconstritores (TXA_2 e a PGH_2), atuam através de

receptores próprios, que ativam proteínas G e a fosfolipase C (Aires et al., 2008), que promovem efeitos opostos aos descritos acima.

1.8 CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES

Sabendo que:

- 1) O mercúrio é extremamente tóxico ao sistema cardiovascular e renal;
- 2) Administrado agudamente em doses baixas causa aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos, bem como alterações na reatividade de vasos sistêmicos como aorta, artéria mesentérica, cerebral e coronária;
- 3) A função hemodinâmica renal é imprescindível não só para depuração do plasma como também para homeostase do sistema cardiovascular.

Nosso trabalho buscou investigar as possíveis alterações no leito vascular renal de ratos, causadas pela infusão aguda do cloreto de mercúrio numa concentração normalmente encontrada em indivíduos expostos a esse metal.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como finalidade avaliar, pela técnica de perfusão do leito vascular renal isolado, os efeitos da infusão aguda de HgCl_2 (cloreto de mercúrio) sobre a reatividade vascular avaliada *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos da infusão aguda com HgCl_2 sobre a pressão de perfusão e na curva fluxo x pressão;
2. Avaliar os efeitos da infusão aguda HgCl_2 sobre a resposta vasoconstritora e vasodilatadora, dependentes ou não do endotélio vascular;
3. Verificar a participação do NO nas alterações vasculares renais promovidas pela infusão aguda com HgCl_2 .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 250 g e 300 g, disponibilizados pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS – UFES). Tais animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água tratada e a ração especial para roedores. Todos os procedimentos experimentais e o uso e cuidado com esses animais foram realizados de acordo com as normas para pesquisa biomédica que determinam os cuidados para o uso do animal de laboratório em ensaios experimentais, como indicado pela Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) e estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Todos os protocolos foram analisados e aprovados pela CEUA-UFES nº 051/2011.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

No presente estudo os ratos tiveram seus rins esquerdos isolados e perfundidos para análise da reatividade vascular renal. Utilizamos a técnica de perfusão de leitos vasculares descrita por França et al (1997) e dos Santos et al (2006), que foi adaptada e novamente padronizada para as metodologias presentes hoje em nosso laboratório. Com o animal anestesiado com tiopental sódico na dose de 50 mg/kg, e heparinizado (500 UI, ip), foi realizado laparotomia mediana por uma incisão xifo-púbica para adequada visualização e isolamento da aorta e órgãos retroperitoneais esquerdos. Em seguida, uma cânula PE50 preenchida com solução salina heparinizada foi colocada dentro da artéria renal esquerda, via aorta abdominal, para perfusão do rim esquerdo. Prontamente, o rim era cuidadosamente separado, retirado e colocado em banho com temperatura controlada, onde era perfundido via cânula com solução nutritiva de Krebs-Henseleit, cuja composição em mM (milimolar) é NaHCO₃ 27; NaCl 119; NaH₂PO₄ 1; MgSO₄ 1,2; KCl 5; CaCl₂ 1,25; Glicose 11; EDTA 0,03. Esta solução era mantida à temperatura constante de 36± 0,5 °C, mantendo o pH estável em 7,4 pelo borbulhamento constante de mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). O fluxo foi mantido constante em 5,5 ml/min por

meio de uma bomba peristáltica (Milan, Colombo, Paraná, Brasil). A pressão de perfusão do leito renal era constantemente captada por um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA, USA), que ficava situado entre a bomba peristáltica e a cânula arterial.

Considerando a relação $P = F \times R$ (P = pressão, F = fluxo e R = resistência), e sendo o fluxo constante, as variações de P indicavam as variações da resistência vascular.



Figura 01: Local das preparações dos experimentos e equipamentos utilizados (foto do autor, 2014).



Figura 02 e 03: Rim na cuba sendo perfundido (foto do autor, 2014).

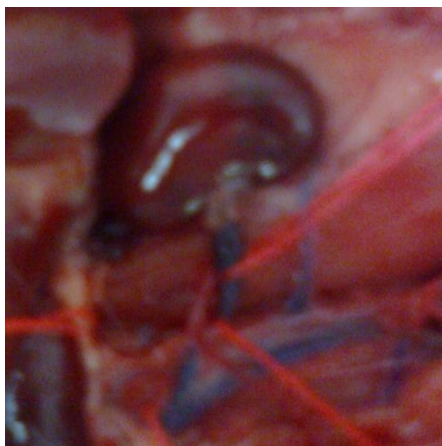


Figura 04: Exposição do rim esquerdo e da artéria renal (foto do autor, 2014).

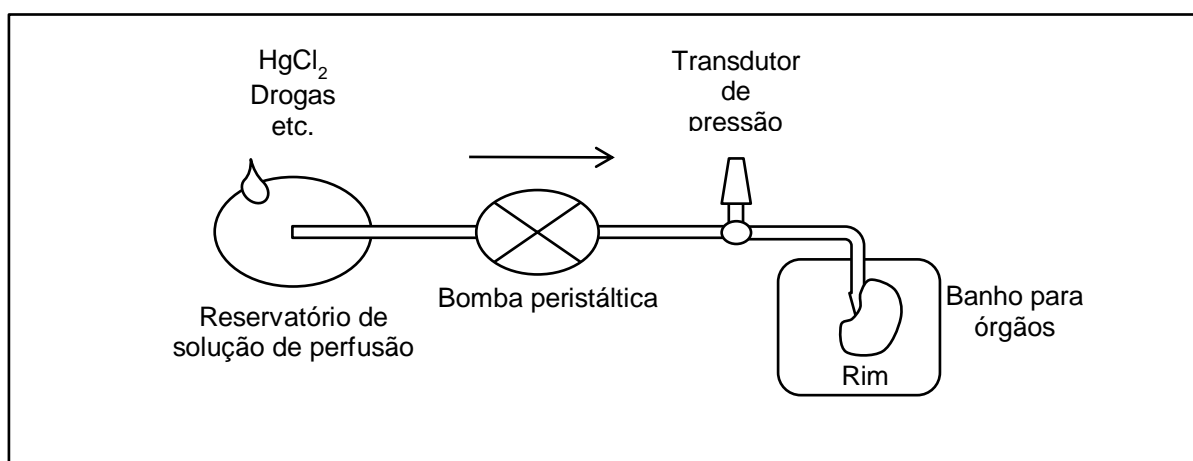


Figura 05: Esquema simplificado das preparações dos experimentos (elaborada pelo autor, 2015).

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os rins foram distribuídos em 02 (dois) grupos experimentais: controle (CT) e mercúrio (Hg). No grupo mercúrio, após a estabilização e teste da viabilidade do endotélio, houve a infusão de HgCl_2 (cloreto de mercúrio) na concentração final de 30 nM. No grupo controle, a perfusão foi feita somente com solução nutritora padrão de Krebs-Henseleit (KH).

Resumidamente, ao iniciar nossos estudos com o leito vascular renal, realizamos como teste piloto, três curvas de contração à fenilefrina (FE):

- 1) Curva de FE imediatamente após estabilização da preparação;
- 2) Curva de FE após 30 minutos após a primeira;
- 3) Curva de FE após 60 minutos após a primeira.

Numa primeira etapa, como mostrado nos resultados, percebemos que o tempo poderia interferir na análise dos efeitos do mercúrio num desenho de curvas

pré vs. pós perfusão. Dessa forma, seguimos com os protocolos de infusão de KH normal ou com HgCl_2 separadamente.

Foi realizado:

- 1) Uma injeção *in bolus* de fenilefrina (FE) 0,3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, para sensibilizar a preparação;
- 2) Pré-contração com FE na solução KH (concentração final 10^{-6} M), seguida de relaxamento pela perfusão com ACh (concentração final de $2 \times 10^{-6} \text{ M}$), para analisar a porcentagem de relaxamento dependente de endotélio.

Após isso, eram iniciadas as perfusões contendo ou não mercúrio:

- 3) Infusão de KH normal por 03 ou 30 minutos; ou KH com HgCl_2 30 nM por 03 ou 30 minutos;
- 4) Pré-contração com FE na solução KH (concentração final 10^{-6} M), seguida de relaxamento com ACh (concentração final de $2 \times 10^{-6} \text{ M}$);
- 5) Curva de contração à FE (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 μg , por injeções *in bolus* de 100 μl).

Numa segunda etapa realizamos os seguintes protocolos experimentais:

- 1) Estabilização de 30 minutos e infusão de KH com HgCl_2 30 nM por 30 minutos nos grupos Hg, e somente estabilização nos grupos CT;
- 2) Infusão de KCl (cloreto de potássio) na concentração de 75 mM (milimolar) para analisar a contração não modulada pelo endotélio;
- 3) Pré-contração com FE na solução KH (concentração final 10^{-6} M), seguida de relaxamento com nitroprussiato de sódio (NPS) (concentração final de $2 \times 10^{-6} \text{ M}$), para analisar o relaxamento independente do endotélio.

Em outra série de experimentos, avaliamos o papel da síntese de NO nos efeitos da perfusão por 30 minutos com HgCl_2 pela adição do inibidor não-seletivo da NO sintase (L-NAME 10^{-4} M) na solução KH. Nesta etapa realizamos os seguintes protocolos:

- 1) Uma injeção *in bolus* de FE 0,3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, para sensibilizar a preparação;
- 2) Pré-contração com FE na solução KH (concentração final 10^{-6} M), seguida de relaxamento com ACh (concentração final de $2 \times 10^{-6} \text{ M}$);
- 3) Aumento do fluxo na bomba peristáltica de 2,5, 5,0, 7,5 e 10 ml/min, com duração de 02 minutos cada, para analisar a resposta pressórica do leito vascular ao aumento de fluxo;

- 4) Infusão de KH com L-NAME (10^{-4} M) ou KH e HgCl₂ com L-NAME por 30 minutos;
- 5) Pré-contração com FE seguida de relaxamento com ACh na presença de L-NAME;
- 6) Aumento do fluxo de 2,5, 5,0, 7,5 e 10 ml/min, na presença de L-NAME;
- 7) Curva de contração à FE na presença de L-NAME.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Graph Prism (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes sempre que $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As respostas vasoconstritoras do leito vascular renal foram expressas com variação na pressão de perfusão (Δ), e as respostas vasorrelaxantes, por percentual de relaxamento à pré-contração (% relaxamento). A análise estatística inferencial dos resultados foram realizada por teste t de Student não-pareado ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias quando adequado. Para localizar as diferenças na ANOVA, foi feito teste post-hoc de Tukey ou pós-teste de Bonferroni.

4 RESULTADOS

Sabemos que os efeitos tóxicos dos metais dependem da concentração ou do tempo de exposição, da forma física e química do elemento e da via de administração e/ou absorção. Um elemento numa determinada forma física e química específica, possui seu caráter tóxico dependente da interação com o organismo através da absorção e entrada do metal no organismo, pelo transporte, distribuição, transformação e acumulação do metal no organismo e pela excreção pelo organismo. Com a finalidade de aplicar este conhecimento teórico, realizamos infusões de cloreto de mercúrio no sistema de perfusão renal em dois tempos (03 e 30 minutos), para avaliar seus efeitos e mecanismos envolvidos.

4.1 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO RENAL

4.1.1 Padronização dos protocolos e das curvas dose-resposta à fenilefrina e à acetilcolina

Primeiramente, após uma longa série de procedimentos de padronização dos protocolos, de acordo com a adaptação necessária, passamos a padronização das doses ideais para construção da curva farmacológica completa (sigmoide) de dose-resposta à fenilefrina. Ao fim, para analisar a reatividade vasoconstritora, foram feitas infusões de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 μg de FE *in bolus*, em injeções de 100 μl cada. Após estabilização da pressão de perfusão renal, os protocolos foram iniciados, e para as infusões de 0,01 e 0,03 μg de FE, a resposta contrátil foi insignificante (próximo à zero); para 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 μg de FE, as respostas foram crescentes, atingindo maior resposta contrátil nas infusões de 3 ou 10 μg de FE; as infusões de 30 e 100 μg de FE demonstraram resposta igual ou inferior às de 3 ou 10 μg de FE.

Após a padronização da curva farmacológica à fenilefrina, passamos a realizar uma série de experimentos de padronização em relação à resposta vasodilatadora à acetilcolina (vasodilatador dependente de endotélio). Foram realizados testes para avaliar a resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh), em preparações previamente pré-contraídas com fenilefrina adicionada à solução nutritiva de Krebs-Henseleit (KH). Após nova estabilização, eram feitas as infusões de 10^{-10} M a 10^{-3} M de ACh. Todavia, foi necessário adicionar doses menos

concentradas de acetilcolina, visto que a de 10^{-10} M já conduzia a um efeito hipotensor pronunciável na preparação. Assim, adicionamos também injeções de acetilcolina 10^{-12} M e 10^{-11} M. Nessa configuração, não conseguimos uma avaliação concreta de todas as infusões de ACh, para diferenciar os valores de vasodilatação de cada infusão, devido a dificuldade em se estabilizar a pressão de perfusão renal com a pré-contração com FE após as primeiras doses de ACh. Entretanto, há a conclusão de que a função vasodilatadora dependente do endotélio continua íntegra, já que obtivemos significativa resposta hipotensora mesmo com baixas quantidades de ACh (10^{-10} M).

Com isso, conseguimos padronizar a curva de contração à fenilefrina e a resposta vasodilatadora dependente do endotélio (a uma dose de ACh - 2×10^{-6} M) que foi utilizada nas séries de experimento em que o mercúrio foi administrado agudamente.

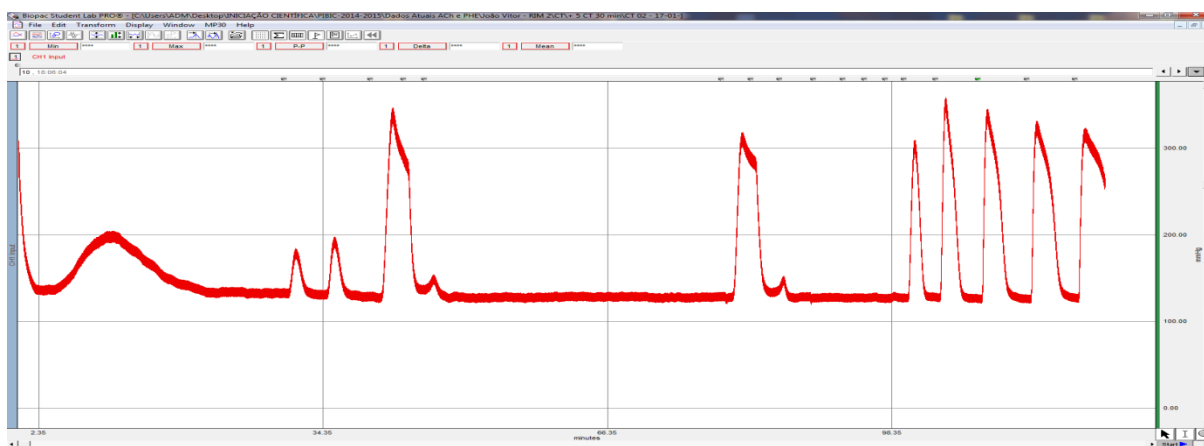


Figura 06: Registro da pressão de perfusão renal; padronização da pré-contração de FE e relaxamento a ACh, e da curva de FE. Da esquerda para a direita – duas injeções in bolus de FE, pré-contração com FE e relaxamento com ACh, curva FE.

4.1.2 Efeitos da exposição aguda ao HgCl_2 sobre a resposta contrátil à fenilefrina no leito vascular renal de ratos

Após várias séries de protocolos de padronização, começamos a analisar os efeitos do cloreto de mercúrio no leito vascular renal, comparando grupos controle e mercúrio em dois intervalos de tempo de exposição (perfusão somente com solução de KH durante 03 e 30 minutos, e perfusão de solução de KH contendo HgCl_2 30nM durante 03 e 30 minutos). Primeiramente, com a finalidade de verificar a capacidade contrátil do leito vascular renal, comparamos os grupos controle e mercúrio 03 minutos, ao analisar as curvas de contração à fenilefrina, e como mostrado na figura

07 A, percebemos que não houve uma grande diferença na resposta vasoconstritora induzida por FE, apesar de sua tendência em reduzir. No entanto, a perfusão com HgCl_2 30 nM, agora por 30 minutos (figura 07 B), foi capaz de prejudicar a resposta contrátil a FE, modificando principalmente a resposta máxima atingida na preparação (efeitos das últimas doses – 3, 10, 30, 100 μg de FE, com diferenças de 39%, 40%, 37% e 42%, em relação ao CT, respectivamente às quatro últimas doses).

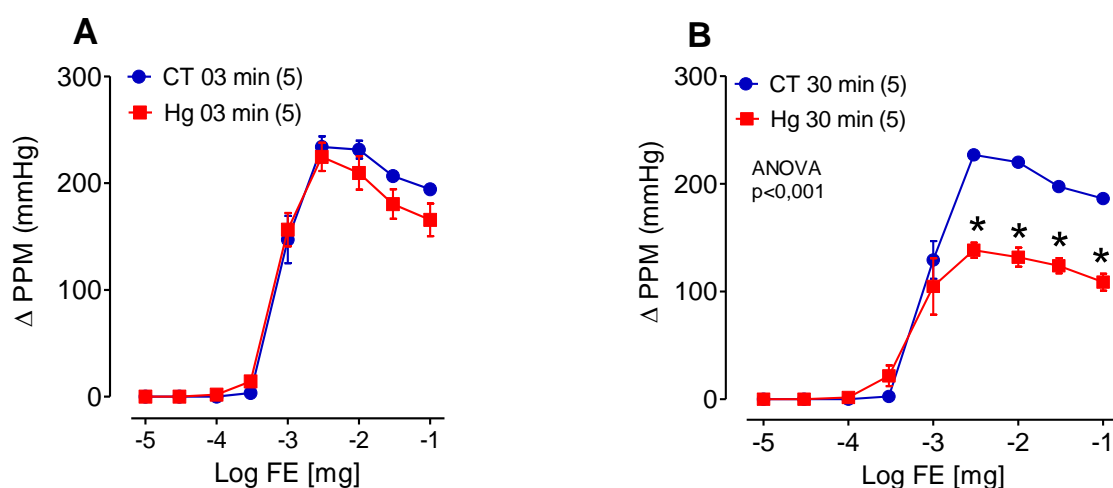


Figura 07: Resposta contrátil induzida por fenilefrina no leito vascular renal nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg) em dois intervalos de tempos (03 e 30 minutos). Os resultados estão expressos em relação ao delta da contração da pressão de perfusão média (PPM). ANOVA duas vias seguida de post hoc de Bonferroni. * $p < 0,001$ vs CT. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Dessa maneira, como o maior efeito foi detectado após perfusão por 30 minutos, seguimos a um teste do efeito do tempo sobre a resposta do leito vascular renal, para avaliar se poderíamos fazer experimentos repetidos (no mesmo rim) protocolos antes e depois do HgCl_2 ou de algum fármaco. Após outra série de procedimentos piloto, chegamos a uma conclusão de que não seria possível fazer análises de curvas dose-resposta à fenilefrina (agente alfa-adrenérgico constritor) em medidas seriadas (antes e após a exposição ao HgCl_2 ou a outros fármacos), visto que, detectamos que as curvas realizadas após determinado tempo de experimento tem uma configuração diferente, sendo menos responsivas que as primeiras, independente do uso ou não de qualquer fármaco entre elas, como podemos observar abaixo (Figura 08).

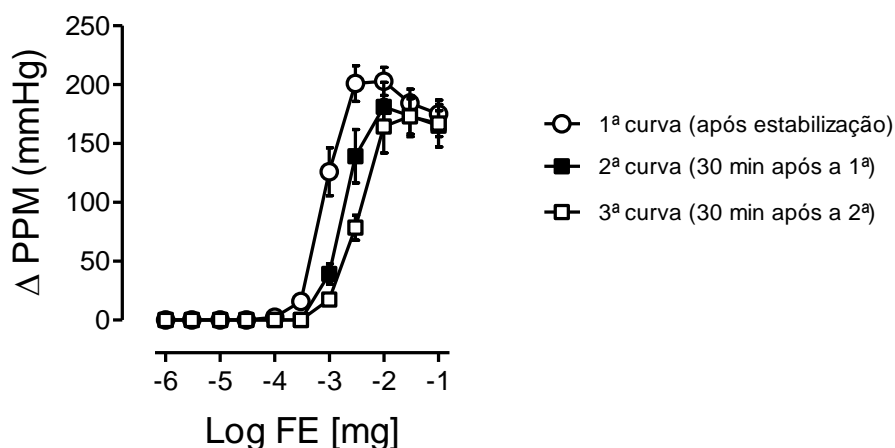


Figura 08: Controle temporal das curvas dose-resposta a FE. Curva 1 no tempo zero, curva 2 em 30 minutos após a curva 1, curva 3 em 60 minutos após a curva 1. Os resultados estão expressos em relação ao delta da contração de FE em relação à pressão de perfusão renal.

Assim, a melhor alternativa seria fazer os experimentos em séries separadas de amostras (rins), curvas de contração dose-dependente à fenilefrina, com ou sem a administração prévia por 30 minutos de mercúrio e/ou fármacos inibidores das vias endoteliais de modulação do tônus vascular.

4.1.3 Efeitos da exposição aguda ao HgCl_2 sobre a resposta dilatadora à acetilcolina no leito vascular renal de ratos

Para avaliar se a exposição aguda ao HgCl_2 foi capaz de alterar o relaxamento dependente do endotélio estimulado por acetilcolina, foram realizadas pré-contrações com FE na solução KH (concentração final 10^{-6} M), seguida de relaxamento com ACh (concentração final de 2×10^{-6} M). Ao comparar os grupos controle e mercúrio 03 minutos (figura 09 A) percebemos uma significativa redução nas respostas vasodilatadoras induzidas por ACh (64% da capacidade relaxante dependente do endotélio). Quando analisamos os grupos controle e mercúrio 30 minutos (figura 09 B) percebemos uma maior redução do relaxamento à acetilcolina (91% da capacidade relaxante dependente do endotélio) após perfusão por 30 minutos com KH contendo HgCl_2 30nM.

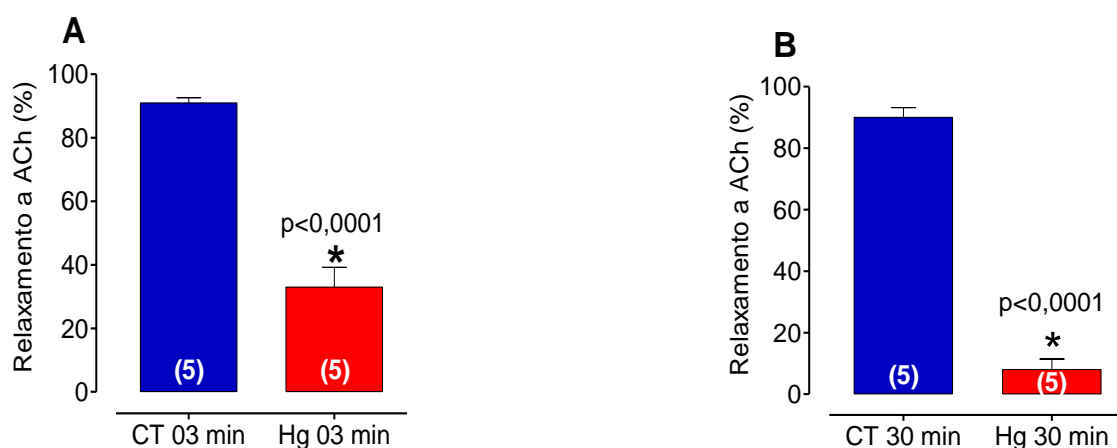


Figura 09: Resposta dilatadora dependente do endotélio induzida pela acetilcolina no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg) em dois intervalos de tempos (03 e 30 minutos). Os resultados estão expressos em relação à porcentagem de relaxamento à ACh em relação à pré-contração com FE. Teste t de Student para comparação de médias. *p<0,0001 vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Sabendo que os efeitos tóxicos do mercúrio dependem da sua concentração ou do seu tempo de exposição no organismo, e que após vários experimentos pilotos as alterações causadas pelo HgCl_2 foram maiores quando comparamos a infusão por 30 minutos, passamos então a realizar os próximos protocolos somente com perfusões de 30 minutos.

4.1.4 Efeitos da exposição aguda ao HgCl_2 sobre a resposta contrátil e dilatadora, ao cloreto de potássio e nitroprussiato de sódio respectivamente, no leito vascular renal de ratos

Com a finalidade de verificar a capacidade contrátil do leito vascular renal de ratos, sabendo que a contração de um vaso, estimulada por alta concentração de KCl, é um importante dado e não é influenciado pela ação do endotélio, representa a função contrátil da musculatura lisa vascular. Como mostrado na figura 10 A, a exposição aguda ao HgCl_2 30 nM por 30 minutos não alterou a resposta ao KCl 75 mM, ou seja, a infusão não prejudicou a capacidade contrátil do músculo liso vascular, já que a resposta das preparações do grupo controle são semelhantes à resposta das preparações do grupo mercúrio (menos de 3% de diferença entre a contração máxima dos grupos controle e mercúrio).

Posteriormente, analisamos o relaxamento não dependente do endotélio por intermédio do doador de óxido nítrico (NO), o nitroprussiato de sódio (NPS - 2×10^{-6}

M). Percebemos que a exposição aguda ao HgCl_2 30 nM alterou a resposta vasodilatadora ao NPS (figura 10 B) tendo uma significativa redução quando comparado com o grupo controle (43% da capacidade relaxante dependente do endotélio).

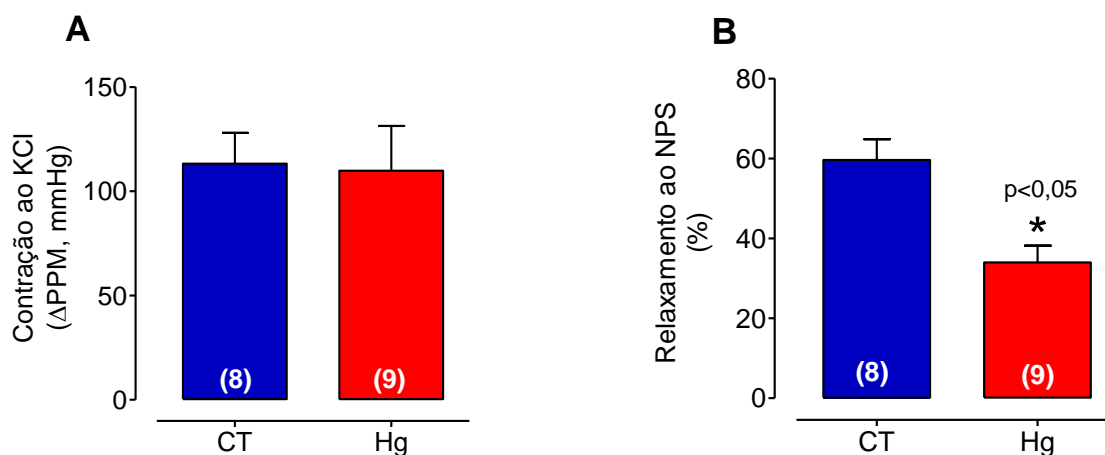


Figura 10: A - resposta contrátil induzida por cloreto de potássio e, B - resposta dilatadora não dependente do endotélio induzida pelo nitroprussiato de sódio no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg). Os resultados estão expressos em relação ao delta de contração máxima ao KCl (A) e à porcentagem de relaxamento ao NPS em relação à pré-contração com FE (B). Teste t de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs Controle. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.1.5 Efeitos da exposição aguda ao HgCl_2 na curva fluxo x pressão

Com a intenção de avaliar a exposição aguda do HgCl_2 sobre a resposta do leito vascular renal de ratos a estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento (shear stress), realizamos aumentos de fluxo na bomba peristáltica, nas marcações de 2,5, 5,0, 7,5 e 10 ml/min, com duração de 02 minutos de perfusão para cada marcação, analisando o aumento equivalente na pressão de perfusão média desencadeada pelo aumento de fluxo, na presença e ausência de cloreto de mercúrio. Como esperado, cada aumento de fluxo na bomba peristáltica cursou com aumentos na pressão de perfusão renal. Porém, curiosamente não houve diferenças na curva fluxo x pressão após a infusão por 30 minutos de HgCl_2 (figura 11).

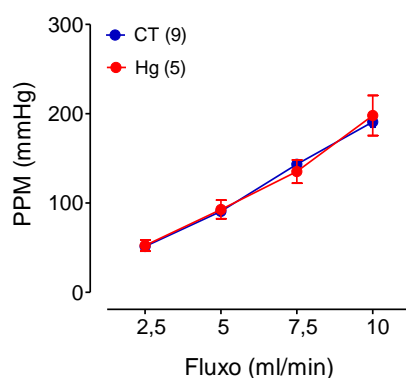


Figura 11: Curva fluxo x pressão no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg). PPM: pressão de perfusão média. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.1.6 Participação do óxido nítrico sobre a resposta contrátil à fenilefrina no leito vascular renal de ratos

Para entender a maneira pela qual a exposição aguda ao HgCl_2 afetou a resposta contrátil do leito vascular renal, utilizamos o L-NAME (10^{-4} M), (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintetase - NOS) para investigar a influência do óxido nítrico (figura 12). Comparando as respostas vasoconstritoras à FE, podemos observar que, ao inibir a síntese do efeito vasodilatador do NO, a infusão com L-NAME aumentou a sensibilidade da vasculatura renal ao agente vasoconstritor alfa-adrenérgico, deslocando a curva para a esquerda (figura 12 A). Por outro lado, percebemos que a resposta vasocontrátil das preparações perfundidas com mercúrio sofreram alterações pela co-infusão de L-NAME, porém com uma redução da resposta contrátil frente ao bloqueio da síntese de NO (figura 12 B).

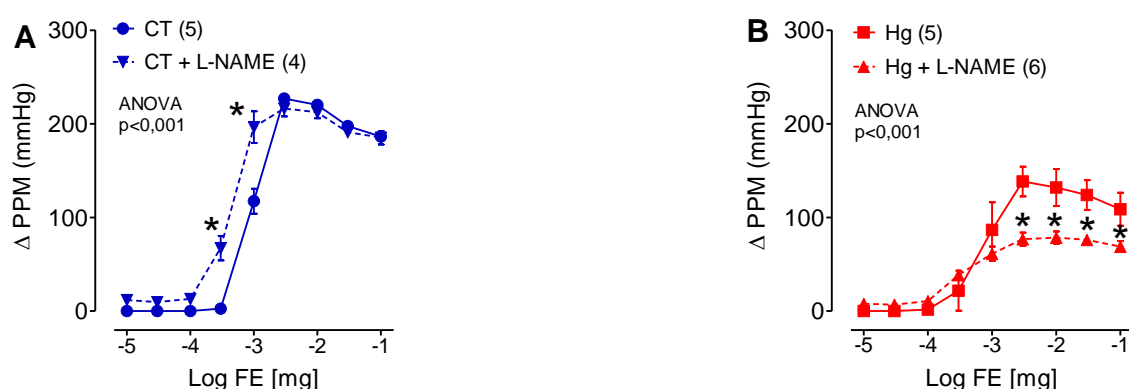


Figura 12: Efeito do L-NAME, inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg). Os resultados estão expressos em relação ao delta da pressão de perfusão média (PPM). ANOVA duas vias seguida de post hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs CT ou vs. Hg. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.1.7 Participação do óxido nítrico sobre a resposta dilatadora à acetilcolina no leito vascular renal de ratos

Como foi observado anteriormente, a exposição aguda ao HgCl_2 prejudicou o relaxamento dependente do endotélio. Assim, investigamos se essa diferença seria devido a alterações na ação do NO. Como pode ser observado na figura 13 A o inibidor não-seletivo da síntese de óxido nítrico, L-NAME (10^{-4} M) reduziu significativamente a resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina no leito vascular renal de ratos do grupo controle (71% da capacidade relaxante dependente do endotélio). Entretanto, esse efeito foi perdido na presença do HgCl_2 (figura 13 B).



Figura 13: Efeito do L-NAME, inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta dilatadora induzida pela acetilcolina no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg). Os resultados estão expressos em relação à porcentagem de relaxamento à ACh em relação à pré-contracção com FE. Teste t de Student para comparação de médias. * $p < 0,0001$ vs CT. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

4.1.8 Participação do óxido nítrico na curva fluxo x pressão

No grupo CT (figura 14 A) a inibição da NOS potenciou o aumento na pressão de perfusão frente à elevação do fluxo, em especial nos fluxos maiores (7,5 e 10 ml/min, com diferença de 42% e 45%, respectivamente, em relação ao grupo CT sem L-NAME). Por outro lado, no grupo Hg (figura 14 B) percebemos que houve um considerável aumento na curva fluxo x pressão em praticamente todos os pontos de aumento do fluxo (5, 7,5 e 10 ml/min). A fim de comparar os efeitos do L-NAME sobre a resposta vascular ao estresse de cisalhamento dos dois grupos experimentais, calculamos a diferença entre as áreas abaixo das curvas sem e com a infusão com L-NAME em ambos grupos. Como mostrado na figura 14 C o efeito do L-NAME foi significativamente maior nas preparações expostas ao HgCl_2 , indicando

provável aumento na liberação de NO frente ao estresse de cisalhamento (shear stress).

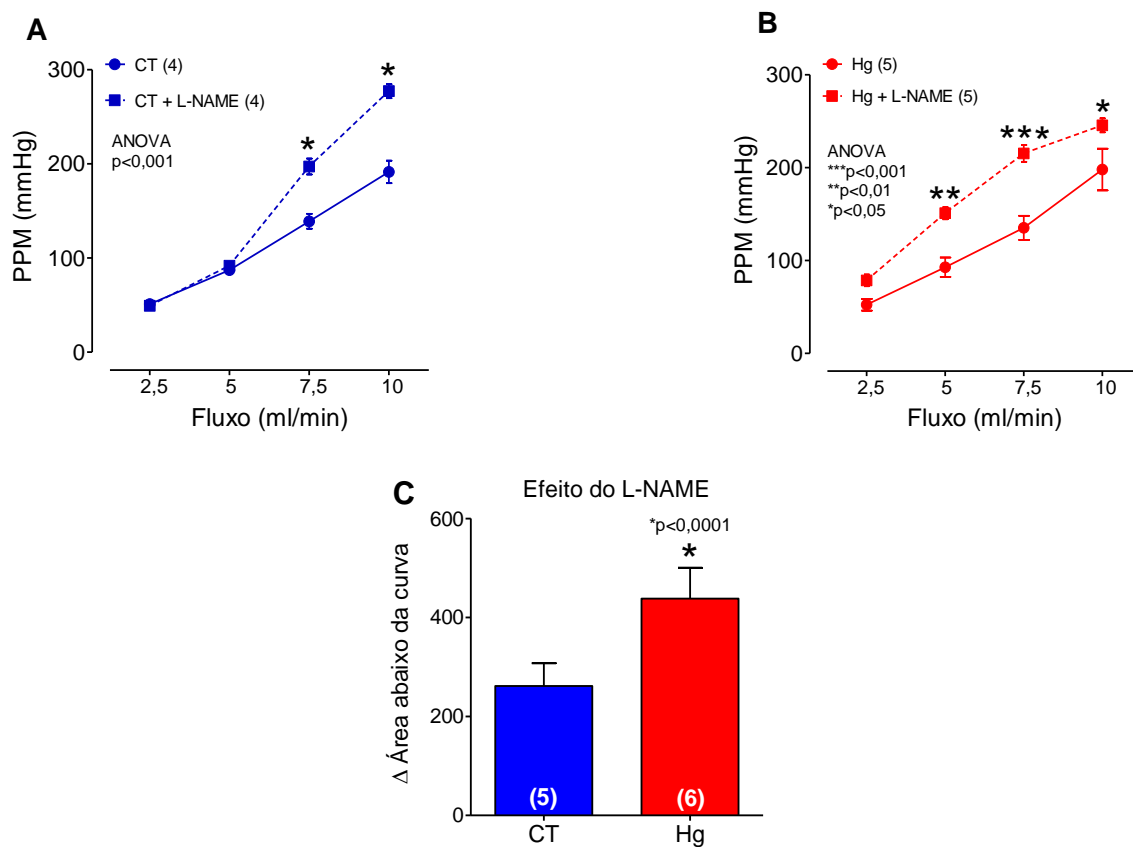


Figura 14: Curva fluxo x pressão na presença de L-NAME no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (CT) e mercúrio (Hg). PPM: pressão de perfusão média. ANOVA duas vias seguida de post hoc de Bonferroni. * $p < 0,001$ vs CT (A) e *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs Hg (B). Teste t de Student para comparação de médias. * $p < 0,0001$ vs CT (C). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos, pela primeira vez, os efeitos da exposição aguda do HgCl_2 na concentração de 30 nM sobre a reatividade vascular do leito renal de ratos. Descobrimos que mesmo em baixa concentração a exposição ao metal foi capaz de alterar o funcionamento deste importante leito vascular.

Num primeiro momento, a nossa pesquisa teve como base investigar as possíveis alterações na reatividade vascular renal de ratos normotensos (Wistar) envolvendo a exposição aguda ao cloreto de mercúrio (HgCl_2), sabendo que baixas concentrações de HgCl_2 sobre o sistema cardiovascular podem causar fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e que o mercúrio administrado agudamente em doses baixas provoca aumento da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) de ratos (Machado et al., 2007), e muitas dessas ações são decorrentes de alterações na reatividade vascular. Vale lembrar também que as consequências cardiovasculares da toxicidade do mercúrio incluem desde riscos de doença cardíaca coronariana até disfunção renal e mortalidade (Boffetta et al., 2001), e que o mercúrio sendo substância nefrotóxica, induz a degeneração de células glomerulares com consequente perda da função renal e falência renal.

Numa primeira observação, percebemos que o HgCl_2 30 nM não alterou a resposta vasoconstritora à fenilefrina nas preparações com exposição por 03 minutos ao HgCl_2 . Em relação ao efeito vasodilatador à acetilcolina, é perceptível que existe uma queda na porcentagem de relaxamento, porém não poderíamos afirmar com exatidão se o HgCl_2 aumenta, diminui ou inibe o efeito da ACh, lesionando o endotélio. Por exemplo, num registro, a resposta a ACh foi ótima, obtendo um relaxamento de quase 100%, chegando quase perto da pressão basal. Entretanto, quando analisamos o efeito da ACh em outro registro com 03 minutos de infusão de HgCl_2 30 nM, a ACh não conseguiu um vasorelaxamento, e por consequência a pressão de perfusão não sofreu decréscimo.

Propondo que a hipótese do tempo de exposição do metal possa ser um fator imperativo para os efeitos do cloreto de mercúrio, tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo, realizamos os protocolos com 30 minutos de infusão de HgCl_2 para os grupos mercúrio e somente solução de KH para os grupos controle, e padronizamos este tempo para os demais protocolos. Com isso, a perfusão por 03 minutos de HgCl_2 parece reduzir somente a resposta vasodilatadora do endotélio, sem alterar significativamente a resposta vasoconstritora, e a perfusão por 30

minutos de HgCl_2 parece alterar tanto liberação de vasodilatadores pelo endotélio, quanto a vasoconstrição.

Após a execução de novos experimentos e analisando os resultados apresentados, podemos pressupor que o cloreto de mercúrio esteja lesionando ou destruindo o endotélio, inibindo a liberação de óxido nítrico, de modo parcial ou até total. Como mesmo após a inibição da síntese de NO em ambos os grupos ainda exista certo grau de relaxamento à acetilcolina, é possível que no leito renal, assim como em outros leitões, o endotélio seja capaz de liberar outros vasodilatadores tais como PGI_2 (prostaciclina) e EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) que ainda mantém o relaxamento do vaso. De fato, já é bem conhecido que frente a diferentes estímulos fisiológicos tal como vasodilatadores endógenos e o shear stress (tensão ou estresse de cisalhamento), o endotélio utiliza essas três vias para induzir o relaxamento no músculo liso vascular (MLV), e que essas vias podem vir a ser recrutadas ou superreguladas a fim de manter a homeostase vascular em situações de danos em outras vias. A importância relativa desses três fatores vasodilatadores derivados do endotélio, bem como sua interação, varia conforme o sítio e também na dependência do estado patológico envolvido, visto que é frequente a identificação de exacerbação em uma ou mais das vias como compensação ao prejuízo de outras (Aires et al., 2008; Batlouni et al., 2001; Cerqueira et al., 2002).

Quando analisamos a viabilidade da musculatura lisa vascular através da contração máxima ao cloreto de potássio e pelo relaxamento não dependente do endotélio pelo nitroprussiato de sódio, percebemos que a infusão aguda de HgCl_2 não alterou a capacidade contrátil do músculo liso vascular, quando comparamos a resposta máxima das preparações do grupo controle e a resposta máxima das preparações do grupo mercúrio. No entanto, houve diferenças no relaxamento pelo nitroprussiato de sódio, nos sugerindo que o HgCl_2 possa estar modificando algum mecanismo no músculo liso vascular. Dessa forma, não podemos descartar que o mercúrio, na concentração e tempo de exposição utilizados, também exerça efeitos sobre a função e ou integridade da musculatura lisa vascular. Segundo Lemos et al (2009) o NPS promoveu resposta vasodilatadora semelhante, em ambos os grupos experimentais (CT e Hg) de sua pesquisa em aorta de ratos, sugerindo que a exposição aguda de HgCl_2 não modifique a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular. Resultado semelhante foi encontrado por da Cunha et al (2000) em

artéria caudal de ratos. Peçanha et al (2008) comprovou que em artérias mesentéricas de resistência, os valores de contração ao KCl 120 mM dos grupos Hg foram de similar magnitude quando comparados com os segmentos arteriais dos grupos CT. Furieri et al (2011) mostrou que a exposição a baixa concentração de HgCl₂ durante 30 dias em artérias coronárias não alterou a resposta ao KCl, ou seja, o tratamento não prejudicou a capacidade contrátil do músculo liso vascular.

Na função vascular, o óxido nítrico exerce importante papel, como a modulação do diâmetro e da resistência vascular pela sua habilidade em relaxar a musculatura lisa vascular (Cerqueira et al., 2002). Quando incubamos as preparações com L-NAME, obtivemos informações importantes. Percebemos que o L-NAME diminuiu o efeito vasorelaxante da ACh, aumentou a sensibilidade da contração à fenilefrina, e potencializou os aumentos na pressão de perfusão frente a aumentos no fluxo nas preparações controle (sem infusão de mercúrio). De certa forma, isto já é esperado para outros vasos na circulação sistêmica, visto que a liberação de NO pelo endotélio é essencial tanto para o relaxamento endotélio-mediado frente a estímulos químicos como à acetilcolina, quanto físico, como no caso do estresse de cisalhamento (shear stress), causados pelo aumento de fluxo, quanto para modular negativamente as ações vasoconstritoras, como no caso do estímulo pela fenilefrina (Lemos et al., 2009; Ranjan et al., 1995; Smalt et al., 1997).

Além disso, também podemos concluir que estes efeitos parecem ser importantes na vasculatura renal. Nossos resultados com a resposta à fenilefrina frente à perfusão com L-NAME reforçam essa linha de pensamento. No leito vascular renal do grupo controle, o deslocamento para a esquerda da curva de vasoconstrição dose-resposta à fenilefrina após incubação com L-NAME confirma esse papel modulatório do NO proveniente do endotélio também no leito renal. Todavia, a perfusão com HgCl₂ modificou substancialmente este padrão da modulação nitrérgica sobre a reatividade vascular.

Como o relaxamento à acetilcolina nas preparações perfundidas com HgCl₂ foi significativamente prejudicado, e se manteve o mesmo, independente da presença ou não do L-NAME, isso nos permite inferir que esta redução no relaxamento à acetilcolina promovida pela perfusão com mercúrio por 30 minutos deva ser, de fato, por uma perda da capacidade do endotélio em liberar NO, ou ainda de maiores mecanismos envolvidos com a degradação do NO produzido pelo endotélio. Na verdade, são bem descritos alguns efeitos adversos da exposição

aguda e crônica ao mercúrio em outros tipos de vasos de ratos (Oliveira et al., 1994, Furieri et al., 2011a, b). Os ensaios de reatividade vascular em aorta e artéria mesentérica, por exemplo, também mostram disfunção endotelial com a diminuição da biodisponibilidade do NO, sendo este devido ao aumento do estresse oxidativo e produção de radicais livres derivados do oxigênio (ânion superóxido, radical hidroxila, peroxinitrito, entre outros) (Wiggers et al, 2008b;.. Furieri et al, 2011b). Dessa forma, uma possível explicação para essa perda da modulação nitrérgica sobre o relaxamento endotelial e a resposta ao shear stress no leito vascular renal possa ser essa redução da biodisponibilidade mediada pelo estresse oxidativo já conhecido do mercúrio em outros leitos vasculares.

Em contrapartida, quando avaliamos o efeito da infusão com L-NAME sobre a curva fluxo \times pressão do grupo Hg, notou-se uma exacerbação da resposta em relação ao grupo CT, indicando que, pelo menos numa resposta estimulatória da produção de NO por meio de um estímulo mecânico (shear stress), parece haver um aumento na produção/ação do NO decorrente da exposição a esse metal pesado. Embora contraditório em relação a menor ou ausente ação no NO nos protocolo da acetilcolina, é possível que frente a esses dois diferentes tipos de estímulos (mediado por fármaco ou por agente físico), o endotélio exposto ao mercúrio possa responder diferentemente.

Além disso, no estudo da contração à fenilefrina nos leitos vasculares renais expostos ao HgCl_2 , a perfusão com L-NAME não potencializou essa resposta, mas pelo contrário, reduziu a mesma significativamente. Isso significaria que a presença da NOS em atividade estaria teoricamente contribuindo para constrição frente ao estímulo vasomotor da fenilefrina. Embora não tenhamos exatamente uma explicação definitiva para esse fato, poderíamos traçar algumas especulações. Para tanto, devemos levar em consideração que: 1) parece haver maior produção de NO no grupo Hg dependendo do estímulo aplicado (por exemplo, na curva fluxo \times pressão); 2) em diferentes leitos sob condições pró-oxidativas o NO é convertido em ONOO^- ; 3) o ONOO^- pode exercer efeito vasoconstrictor (Carvalho et al., 2001; Bahia et al., 2004); e finalmente 4) o endotélio pode responder em situações adversas aumentando a produção de outros vasodilatadores frente a redução da disponibilidade de NO, como por exemplo EDHF e PGI_2 . Tomados juntos, esses fatores suportariam a especulação de que numa situação de estresse oxidativo aumentado, em decorrência do HgCl_2 , o NO seria degradado (formando ONOO^-) e o

endotélio produziria outros vasodilatadores, que se sobrepondo, reduziriam a resposta contrátil à fenilefrina. Porém, a inibição da síntese de NO, retiraria essa “fonte” para produção de ONOO⁻ ao mesmo tempo em que permitira a liberação excessiva dos vasodilatadores endoteliais, reduzindo assim ainda mais a resposta contrátil à fenilefrina.

6 CONCLUSÃO

Em suma, o nosso trabalho mostra que a exposição aguda ao HgCl_2 em concentrações encontradas em indivíduos expostos é capaz de alterar a reatividade vascular do leito renal de ratos, bem como causar disfunção endotelial e alterar o padrão de modulação do tônus pelo NO, provavelmente por aumento da geração de espécies reativas de oxigênio que levariam a redução da biodisponibilidade deste importante vasodilatador endotelial.

Por fim, sabendo da importância da participação do estresse oxidativo e das espécies reativas de oxigênio na modulação vascular, assim como, a participação de prostanóides vasoativos produzidos pela ciclooxigenase a partir do ácido araquidônico (BOS et al., 2004), cabe a nós ainda investigarmos a participação de espécies reativas de oxigênio sobre o leito vascular renal de ratos, utilizando um “varredor” não enzimático de ânion superóxido (tiron) e também um inibidor da NADPH oxidase (apocinina); bem como, a participação de prostanóides derivados da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase sobre o leito vascular renal de ratos, por intermédio da indometacina (inibidor inespecífico da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase).

7 REFERÊNCIAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3 ed. Brasil: Guanabara Koogan, 2012.

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

ASANO, S. et al. **Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning**. *Pathol Int*. 2000; 50:169-174.

BAGENSTOSE, L. M. et al. **Murine mercury-induced autoimmunity: a model of chemically related autoimmunity in humans**. *Immunol Res* 1999; 20: 67-68.

BATLOUNI, M. **Endotélio e hipertensão arterial**. *Rev Bras Hipertens* 8: 328-38, 2001.

BARRETT, K. E.; BARMAN, S. M.; BOITANO, S; HEDDWEN L. B. **Fisiologia Médica de Ganong**. 24 ed. Brasil: Amgh Editora, 2014.

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

BOHETS, H. H. et al. **Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK1, MDCK and human proximal tubular cells**. *Kidney Int* 1995; 47: 395-403.

BOS, C.L.; RICHEL, D.J.; RITSEMA, T.; PEPPELENBOSCH, M.P.; VERSTEEG, H.H. **Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction**. *International Journal of Biochemistry*. v. 36, p. 1187-1205, 2004.

BURTON, C.A. et al. **Glutathione effects on toxicity and uptake of mercuric chloride and sodium arsenite in rabbit renal cortical slices**. *Environ Health Perspec*. 1995; 103: 81-84.

CARDOSO, F. A. **Endotélio vascular. Parte I: função e propriedade**. *Revista de Ciências Médicas – PUCCAMP, Campinas*, 3(3): 76-84, setembro/outubro, 1994.

CARMIGNANI, M. et al. **Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats**. *Br J Ind Med*. 1992; 49(4):226-32.

CARMIGNANI, M. et al. **Renal ultrastructural alterations and cardiovascular functional changes in rats exposed to mercury chloride**. 1989; 13:353-56.

CARRANZA-ROSALES, P. et al. **Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage**. *Toxicology*. 2005; 210(2-3):111-21.

CERQUEIRA, N. F. et al. **Óxido Nítrico. Revisão.** Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 17 (6) 2002 – 419.

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

CLARKSON, T.W. et al. **Mechanisms of mercury disposition in the body.** Am J Ind Med. 2007; 50: 757-764.

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

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

DAVIDSON , Philip W. et al. **Prenatal methyl mercury exposure from fish consumption and child development: a review of evidence and perspectives from the Seychelles Child Development Study.** Neurotoxicology 2006; 27: 1106-1109.

DOS SANTOS, Leonardo et al. **Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation.** Life Sci. 2006 Apr 4;78(19):2272-9.

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

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

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

FURIERI, L. B., FIORESI, M., JUNIOR, R. F. R., et al., 2011a. **Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function.** Toxicology and Applied. Pharmacology. 255, 193–199.

FURIERI, L. B., GALÁN, M., AVENDANÕ, M. S., GARCIA-REDONDO, A. B., AGUADO, A., et al., 2011b. **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.

FURIERI, L. et al. **Exposição à baixa concentração de HgCl₂ durante 30 dias deprime a contratilidade miocárdica e promove disfunção coronariana em ratos.** Tese de Doutorado, 2011. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

GILMAN, A. G. et al. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana Brasil; 2007.

GIRARDI, G.; ELIAS, M. M. **Mercury chloride effects on renal redox enzyme activities: SOD protection.** Free Red Biol Med. 1995; 18:61-66.

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

HALBACH, S.; CLARKSON, T.W. **Enzymatic oxidation of mercury vapor by erythrocytes.** Biochim Biophys Acta 1978; 523: 522-531.

MENDONÇA, R. et al. **Como Cuidar do Seu Meio Ambiente - Col. Entenda e Aprenda.** 3 ed. Brasil: Bei comunicação, 2010.

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

HSDB – Hazardous Substances Data Bank. **Mercury, in: Toxicology, occupational medicine and environmental series.** 2004. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov>. Acesso em: 13/05/ 2013.

HURSH, J. B et al. **In vitro oxidation of mercury by the blood.** Pharmacol toxicol. 1988 Oct; 63(4):266-73.

LEMOS, N. B. et al. **Exposição aguda a baixa concentração de cloreto de mercúrio induz disfunção endotelial em aorta de ratos.** Dissertação de Mestrado, 2009. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

LINDBERG, S.E. et al. **A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition.** Ambio. 2007; 36: 19-32.

MALMSTRÖM, C. et al. Conference on trace elements in health and disease. Stockholm May 25- 1992.

MARTINEZ, C. et al. **Efeito da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) no sistema reprodutor de ratos machos.** Dissertação de Mestrado, 2013. Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul.

PASSOS, Carlos J. S.; MERGLER, Donna. **Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review.** Cad Saude Publica. 2008; 24: 503-520.

PEÇANHA, G. et al. **Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos.** Tese de Doutorado, 2008. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

PELLETIER, L. et al. **Experimental mercury - induced glomerulonephritis.** Spreinger Semin Immunopathol. 1987; 9: 359-369.

PESCE, A. J. et al. **beta2 microglobulinuria in a patient with nephrotoxicity secondary to mercuric chloride ingestion.** Clin Toxicol. 1977;11(3):309-15.

RANJAN, V.; XIAO, Z.; DIAMOND, S. L. **Cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress.** Physiology Published 1 August 1995 Vol. 269 no. 2, H550-H555.

RIZZETTI, D. A. **Efeito do tratamento antioxidante sobre a reatividade vascular da artéria aorta e estresse oxidativo de ratos expostos cronicamente ao cloreto de mercúrio.** Dissertação de Mestrado, 2012. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul.

SMALT, R.; MITCHELL, F. T.; HOWARD, R. L.; CHAMBERS, T. J. **Constitutive NOS expression in American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Induction of NO and prostaglandin E₂ in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain.** American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism Published 1 October 1997 Vol. 273 no. 4, E751-E758

VASSALO, D. et al. **Ações Tóxicas Agudas do Mercúrio sobre o Aparelho Cardiovascular.** Arq Bras Cardiol, volume 67, (nº 1), 1996.

STACCHIOTTI, A. et al. **Bimoclolmol ameliorates mercuric chloride nephrotoxicity through recruitment of stress proteins.** Toxicol Lett. 2006 Oct 10;166(2):168-77. Epub 2006 Jun 30.

SANTOS, C. L. **Sistema renal.** Curso de enfermagem na UNISANTOS, SP.2012

STACCHIOTTI, A. et al. **Mercuric chloride-induced alterations in stress protein distribution in rat kidney.** Histol Histopathol 2004; 19: 1209–1218.

WIGGERS GA, PEÇANHA FM, BRIONES AM, PÉREZ-GIRÓN JV, MIGUEL M, VASSALLO DV, Cachafeiro V, Alonso MJ, Salaices M. **Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008b. 295(3):H1033-H1043.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **METHYL MERCURY. V. 101.** International Programme on Chemical Safety. Geneva, Switzerland, 1990.

ZALUPS, R. K. **Molecular interactions with mercury in the kidney.** Pharmacol Rev. 2000; 2:113-43.

www.webelements.com/mercury/