

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Janayne Luihan Silva

**Efeitos da intoxicação por metilmercúrio em camundongos selvagens
(C57BL/6) e em modelo experimental de aterosclerose (APOE -/-)**

Belo Horizonte – MG

2020

Janayne Luihan Silva

**Efeitos da intoxicação por metilmercúrio em camundongos selvagens
(C57BL/6) e em modelo experimental de aterosclerose (APOE -/-)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite.

Coorientadora: Dra. Paola C. L. Leocádio.

Belo Horizonte – MG

2020

043

Silva, Janayne Luihan.

Efeitos da intoxicação por metilmercúrio em camundongos selvagens (C57BL/6) e em modelo experimental de aterosclerose (APOE -/-) [manuscrito] / Janayne Luihan Silva. – 2020.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Profª Orientadora: Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite. Coorientadora: Dra. Paola C. L. Leocádio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JANAYNE LUIHAN SILVA.
Aos dezessete dias do mês de fevereiro de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "'Efeitos da intoxicação por metilmercúrio em camundongos selvagens (C57BL/6) e em modelo experimental de aterosclerose (APOE-/-)''", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof.ª Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Virginia Soares Lemos (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Paola Caroline Lacerda Leocadio - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ APROVADA
☐ REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2020.

Dr. Virginia Soares Lemos (UFMG)

Dr. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)

Dr. Paola Caroline Lacerda Leocadio - Coorientadora (UFMG)

Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)

Prof. João Carlos de Almeida
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB-UFMG

*Aos meus avós, Marilda (em memória) e
José, por todo o amor, cuidado e
motivação, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Cláudia, a maior responsável para a finalização desta etapa. Sua força me deu coragem e liberdade para que eu pudesse arriscar, porque mesmo nas falhas, eu sempre soube que era amada.

Aos meus avós, Marilda e José, presentes comigo durante toda a realização deste trabalho (fisicamente ou na memória), e sempre me fizeram me sentir feliz e especial.

Ao meu pai, Willian, pelo apoio e incentivo, e a minha irmã, Cecília, que renovou minha esperança no futuro.

Aos meus menores e melhores companheiros durante essa jornada, os meus animais de estimação, Zaninha e Totoca, pelo amor e alegria que sempre me receberam em casa, pelo carinho e companhia em todos os momentos.

Aos meus tios, Jussiara e Welker, pela compreensão das minhas ausências e pela hospitalidade com que sempre me receberam.

A minha amiga, Elandia, agradeço a confiança, carinho e preocupação. Pela companhia e parceria em todos os dias e noites no laboratório e no biotério, pelas nossas risadas, conselhos trocados, aulas de imunologia e todas as outras coisas que me ensinou, sempre com generosidade.

Aos amigos Marcelo Trindade e Igor Gomes, pela amizade, alegria, apoio, motivação e pela presença certa mesmo na ausência física. E às amigas, Danielle Fortunato, Edna Lage, Izabela Mendes e Christina Martins, por todas as ajudas e apoio que tornaram tudo mais fácil.

A minha orientadora, Profa. Dra. Jacqueline Alvarez-Leite, por me receber no LABiN, por todas as oportunidades e seu conhecimento compartilhado comigo. E a minha coorientadora, Dra. Paola C. L. Leocádio, por todas as risadas, conselhos, e apoio em ocasiões científicas e extras.

A todos os colegas do LABiN, pelo conhecimento e convivência compartilhados, em especial, Danielle, Edenil, Pollyana, Melissa, Jonas e Letícia.

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia. Em especial, aos técnicos, Jamil, Orlando e Maria Helena, por todo o serviço e ajuda, que permitiram a realização deste trabalho.

A todos da UFU que me incentivaram na ida para a UFMG, em especial, às Doutoradas Terezinha Teixeira, Cristina Fürstenau e Thaíse Gonçalves.

A todos do Labiconte (UFC), em especial, Carolina, Juliana, Cássia e Daniel, por toda amizade quando estive na missão científica do PROCAD em Fortaleza - CE. À Marcinha, Lucinha e Núbia, pela convivência e companhia, que foram sempre felizes.

Aos professores Dr. Reinaldo Oriá (UFC), Dra. Maria Elena Crespo-López (UFPA), Dra. Flávia Almeida (UFC), todos os participantes do PROCAD e demais colaboradores, por ajudarem a viabilizar a realização deste trabalho.

Às instituições financiadoras, CAPES, FAPEMIG, CNPq, e ao programa PROCAD/CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos os trabalhadores do nosso país que acreditam na ciência e educação como esperanças de um futuro melhor e abriram caminho antes de mim.

Por fim, mas não menos importante, aos animais de laboratório, sem os quais, os resultados e o conhecimento obtidos neste trabalho não teriam sido alcançados. A todos, meu mais profundo respeito e gratidão.

“Você pode dizer adeus a sua família e a seus amigos e afastar-se milhas e milhas e, ao mesmo tempo, carregá-los em seu coração, em sua mente, em seu estômago, pois você não apenas vive no mundo, mas o mundo vive em você.”

(Frederick Buechner)

“Um passarinho quando aprende a voar, sabe mais de coragem do que sobre voo.”

(Luca Brandão)

Resumo

O metilmercúrio (meHg) está presente no ambiente proveniente de atividades industriais e exploração mineral, é a forma organometálica mais tóxica do mercúrio (Hg), que pode ser ingerida principalmente através de água e peixes contaminados, representando grandes riscos à saúde humana, sobretudo às populações ribeirinhas. Evidências sugerem que, além do dano causado ao sistema nervoso central, o meHg também é capaz de causar danos ao sistema cardiovascular em longo prazo. Por isso, o presente trabalho destinou-se a investigar os efeitos da ingestão do meHg no desenvolvimento da aterosclerose. Utilizou-se camundongos selvagens (C57BL/6) e modelo experimental de aterosclerose (APOE nocaute) fêmeas, recebendo ou não cloreto de metilmercúrio (20 mg/L) diluído na água de beber e dieta AIN-93M, por 14 dias. A concentração de mercúrio total nos pelos dos animais foi mensurada. A pressão arterial foi avaliada antes da intoxicação e ao final do experimento. O perfil lipídico foi avaliado em amostras de soro e no conteúdo hepático extraído, onde também foi avaliado o estresse oxidativo. O número de células em rolamento e adesão foi mensurado. A porcentagem de lesão aterosclerótica foi avaliada na aorta e carótida. A intoxicação não foi capaz de alterar consumo hídrico, consumo alimentar, glicemia de jejum e triglicerídeos nos animais, no entanto foi constatado aumento do colesterol total nos grupos intoxicados (CTHg e APOEHg) em relação aos seus controles (CT e APOE) que não receberam metilmercúrio, bem como da fração não-HDL (aterogênica), sem alteração da fração HDL. A intoxicação promoveu ainda elevação da pressão arterial sistólica, diastólica e média, em ambos os grupos intoxicados, e provocou o aumento do estresse oxidativo hepático e de células em rolamento e adesão. As áreas acometidas por lesão aterosclerótica na aorta e carótida foram aumentadas com o tratamento por metilmercúrio. Esses resultados demonstram que o metilmercúrio é capaz de influenciar nos parâmetros cardiovasculares, promovendo dislipidemia, aumento do estresse oxidativo hepático, elevação da pressão arterial que favoreceu o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas na aorta e carótida de animais não propensos (C57BL/6) e propensos (APOE nocaute).

Palavras-chave: metilmercúrio; aterosclerose; dislipidemia; apolipoproteína E; estresse oxidativo.

Abstract

Methylmercury (meHg) is present in the environment from industrial activities and mineral exploration, it is the most toxic organometallic form of mercury (Hg), which can be ingested mainly through contaminated water and fish, representing great risks to human health, especially to riverside populations. Evidence suggests that, in addition to the damage caused to the central nervous system, meHg is also capable of causing damage to the cardiovascular system in the long term. For this reason, this study aimed to investigate the effects of meHg ingestion on the development of atherosclerosis. Wild mice (C57BL / 6) and experimental model of atherosclerosis (APOE knockout) females were used, receiving or not methylmercury chloride (20 mg / L) diluted in drinking water and AIN-93M diet, for 14 days. The concentration of total mercury in the animals' hair was measured. Blood pressure was assessed before intoxication and at the end of the experiment. The lipid profile was evaluated in serum samples and in the extracted liver content, and oxidative stress was also evaluated. The number of cells in rolling and adhesion were measured. The percentage of atherosclerotic lesion was assessed in the aorta and carotid. Intoxication was not able to alter water intake, food intake, fasting glucose and triglycerides in animals, however an increase in total cholesterol was found in the intoxicated groups (CTHg and APOEHg) in relation to their controls (CT and APOE) who did not receive methylmercury, as well as the non-HDL (atherogenic) fraction, without altering the HDL fraction. Intoxication further increased systolic, diastolic and mean blood pressure in both intoxicated groups, and caused an increase in oxidative stress in the liver and in rolling cells and adhesion. The areas affected by atherosclerotic lesion in the aorta and carotid artery were enlarged with methylmercury treatment. These results demonstrate that methylmercury can influence cardiovascular parameters, promoting dyslipidemia, increased hepatic oxidative stress, elevated blood pressure that favored the development of atherosclerotic lesions in the aorta and carotid in non-prone (C57BL / 6) and prone animals (APOE knockout).

Keywords: methylmercury; atherosclerosis; dyslipidemia; apolipoprotein E; oxidative stress.

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg/g	Microgramas por grama
µmol	Micromol
ABCA1	Transportador cassete A1 de ligação à adenosina trifosfato
ABCG1	Transportador cassete G1 de ligação à adenosina trifosfato
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apo	Apolipoproteína
ApoA	Apolipoproteína A
ApoB-100	Apolipoproteína B-100
ApoB-48	Apolipoproteína B-48
ApoC	Apolipoproteína C
ApoE	Apolipoproteína E
APOE -/-	Nocaute de Apolipoproteína E
APOHg	Grupo nocaute para a apolipoproteína E intoxicado com metilmercúrio
ApoJ	Apolipoproteína J
AST	Aspartato aminotransferase
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAP-UFMG	Centro de Aquisição de Imagens da UFMG
C57BL/6	Linhagem de camundongos selvagens
CCL2	Quimiocina quimiotática de monócitos tipo 2
CD36	Glicoproteína de diferenciação celular 36
CD40	Glicoproteína de diferenciação celular 40
CD154	Glicoproteína de diferenciação celular 154
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
CH ₃ HgCl	Cloreto de metilmercúrio
Cm	Centímetro
CMLV	Células musculares lisas vasculares

CTHg	Grupo selvagem intoxicado com metilmercúrio
DHA	Ácido docosapentaenoico
DMA	Analizador direto de mercúrio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
E-selectina	Molécula de adesão endotelial-leucocitária E
EUA	Estados Unidos da América
$C_2H_5Hg^+$	Etilmercúrio
CH_3Hg^+	Metilmercúrio
TNF	Fator de necrose tumoral
g	Gramas
g lip/ g tecido	Gramas de lipídeo por gramas de tecido
GSH	Glutationa reduzida
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPase	Enzima hidrolase do GTP
HDL	Lipoproteína de alta densidade
$Hg(NO_3)_2$	Nitrato de mercúrio
Hg^{++}	Mercúrio mercúrico
Hg^0	Mercúrio elementar
Hg_2^{++}	Mercúrio mercurioso
Hg_2Cl_2	Cloreto de mercúrio
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intercelular
IFN- γ	Interferon- γ
IL-17	Interleucina 17
IL-6	Interleucina 6
LCAT	Lecitina-colesterol-acil-transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLr -/-	Nocaute para o receptor celular de lipoproteína de baixa densidade

LPL	Lipase lipoproteica
M	Molar
MCSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
meHg	Metilmercúrio
mg Hg/kg	Miligramas de mercúrio por quilo de amostra
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/g	Miligrama por grama de tecido
mg/kg	Miligrama por quilo
mg/L	Miligrama por litro
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTP	Proteína de transferência microssomal
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAD ⁺	Dinucleotídeo oxidado de nicotinamida e adenina
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida e adenina
NADPH oxidase	Enzima oxidase do NADPH
nm	Nanômetros
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão salino fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Pg	Picogramas
PLTP	Proteína de transferência de fosfolipídios
PON	Paraoxonase
P-selectina	Molécula de adesão endotelial-leucocitária P
MTP	Proteína de transferência microssomal
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
QM	Quilomícrons
Rho-quinase	GTPase da subfamília Rho

SCAP	Proteína ativadora de clivagem
SeH	Função química selenoidrila
SH	Função química sulfidrila
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Receptor <i>scavenger</i> classe A
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
TAG	Triacilgliceróis
µm	Micrômetros
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM-1	Molécula 1 de adesão celular vascular
VLDL	Lipoproteína de baixíssima densidade
γ-GT	<i>Gamma</i> glutamiltransferase
-/-	Nocaute gênico

Lista de Figuras

Figura 1 – Concentração de mercúrio presente no pelo (A) e no fígado (B) dos animais.

Figura 2 – Atividade de enzimas relacionadas à função hepática. (A) Atividade de aspartato aminotransferase sérica nos grupos experimentais. (B) Atividade de alanina aminotransferase sérica. (C) Atividade de γ -glutamilttransferase sérica.

Figura 3 – Pressão arterial sistólica, diastólica e média avaliada inicialmente e ao fim do protocolo experimental.

Figura 4 – Níveis de glicemia e triglicerídeos dos grupos experimentais.

Figura 5 – Níveis de colesterol total, fração não-HDL, HDL e atividade sérica de paraoxonase entre os grupos experimentais.

Figura 6 – Conteúdo de lipídios hepáticos extraídos e níveis de colesterol e triglicerídeos presentes.

Figura 7 – (A) Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD). (B) Níveis de hidroperóxidos totais.

Figura 8 – (A) Número de leucócitos em rolamento na veia mesentérica dos grupos experimentais. (B) Número de leucócitos em adesão.

Figura 9 – Microscopia de fluorescência intravital da veia mesentérica dos grupos experimentais.

Figura 10 – (A) Porcentagem de área do arco da aorta acometida por lesão aterosclerótica nos grupos experimentais. (B) Área da aorta torácica.

Figura 11 – Lesões ateroscleróticas nas aortas dos grupos experimentais.

Figura 12 – (A) Área de lesão aterosclerótica na carótida dos grupos experimentais. (B) Porcentagem de estenose. (C) Espessura da camada média.

Figura 13 – Lesões ateroscleróticas nas carótidas dos grupos experimentais.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Grupos experimentais para avaliar o impacto da intoxicação mercurial em animais APOE -/- e controles selvagens).

Tabela 2: Composição de 1kg de dieta padrão AIN-93M ofertada aos animais.

Tabela 3: Consumo hídrico, consumo alimentar e evolução ponderal dos grupos experimentais.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Mercúrio	22
2.2 Metilmercúrio.....	25
2.3 Metabolismo lipídico.....	32
2.4 Aterosclerose	36
2.5 Metilmercúrio e risco cardiovascular	39
2.6 Modelo murino de aterosclerose.....	41
3 JUSTIFICATIVA	42
4 OBJETIVOS	43
4.1 Objetivo geral.....	43
4.2 Objetivos específicos	43
5 MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1 Animais e delineamento experimental	44
5.2 Dieta AIN-93M.....	45
5.3 Diluição do metilmercúrio.....	46
5.4 Pletismografia de cauda	46
5.5 Cirurgia de obstrução de carótida	46
5.6 Consumo alimentar e hídrico.....	47
5.7 Evolução ponderal	47
5.8 Microscopia de fluorescência intravital da veia mesentérica	47
5.9 Eutanásia	48
5.10 Dosagem da concentração de mercúrio	48
5.10.1 Pelos.....	49
5.10.2 Fígado	49

5.11 Dosagens séricas	49
5.11.1 Glicemia	49
5.11.2 Triglicerídeos	50
5.11.3 Colesterol total	50
5.11.4 Colesterol não-HDL	50
5.11.5 HDL	50
5.11.6 Atividade da enzima paraoxonase (PON)	51
5.12 Função hepática	51
5.12.1 Atividade de aspartato aminotransferase (AST)	51
5.12.2 Atividade de alanina aminotransferase (ALT)	51
5.12.3 Atividade de γ -glutamilttransferase (γ -GT)	52
5.13 Dosagem de lipídios hepáticos por FOLCH	52
5.14 Avaliação do estresse oxidativo hepático	53
5.14.1 Determinação da concentração proteica	53
5.14.2 Atividade de superóxido dismutase	53
5.14.3 Hidroperóxidos totais	53
5.15 Lesão aterosclerótica	54
5.15.1 Aorta	54
5.15.2 Carótida	54
5.16 Análises Estatísticas	55
6 RESULTADOS	53
6.1 Consumo hídrico, consumo alimentar e evolução ponderal	53
6.2 Dosagem da concentração de mercúrio	54
6.3 Função hepática	54
6.4 Pressão arterial	56
6.5 Perfil lipídico	57
6.5.1 Glicemia e triglicerídeos	57

6.5.2 <i>Colesterol</i>	57
6.6 Lipídios hepáticos	58
6.7 Avaliação do estresse oxidativo	60
6.8 Microscopia de fluorescência intravital da veia mesentérica	60
6.9 Lesão aterosclerótica na aorta	62
6.10 Lesão aterosclerótica na carótida	63
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÃO	76
9 REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

O mercúrio é um metal, líquido à temperatura ambiente, considerado um contaminante ambiental de atenção prioritária devido sua alta toxicidade, mobilidade, capacidade de biomagnificação e bioacumulação (XU et al., 2018). Possui um complexo ciclo biogeoquímico e se encontra presente no ambiente principalmente aquático, proveniente de atividades industriais e exploração mineral. Uma vez no meio aquático, pode ser transformado quimicamente através de ações bacterianas e resultar em formas organometálicas, entre as quais, o metilmercúrio, é a mais tóxica para a saúde humana e de outros organismos (PETRANICH et al., 2018).

O metilmercúrio não tem papel fisiológico no metabolismo humano, e quando presente, em geral pela ingestão de pescado ou água contaminados, é absorvido no intestino e acumulado, provoca estresse oxidativo nas células e danos irreversíveis ao sistema nervoso central, que é o principal alvo da toxicidade (XU et al., 2018).

Evidências recentes sustentam que em longo prazo, o sistema cardiovascular também pode ser afetado com o surgimento de hipertensão arterial sistêmica (ISLAM et al., 2016); doença coronariana e infarto do miocárdio (MOREIRA et al., 2012; XU et al., 2018).

Estudos epidemiológicos prospectivos, correlacionam maiores níveis de metilmercúrio no cabelo, com o surgimento da aterosclerose, que é fator comum entre doenças cerebrovasculares e cardiovasculares (SALONEN et al., 2000).

A aterosclerose é um processo metabólico crônico, caracterizada por associação entre disfunção endotelial e inflamação (LUSIS, 2000). A modificação nos padrões de fluxo sanguíneo, principalmente nas regiões de ramificação, altera a morfologia das células endoteliais nesses pontos, aumentando a permeabilidade do endotélio à lipoproteína de baixa densidade (LDL), fazendo com que esta, infiltre na camada íntima das paredes arteriais mais facilmente, seja retida no espaço subendotelial e oxidada (GROENENDYK & MEHTA, 2018).

A partir disso, ocorre a produção de moléculas quimiotáticas de monócitos por macrófagos residentes na camada íntima e pelas próprias células endoteliais, que também começam a expressar moléculas de rolamento e adesão para monócitos, que por sua vez, rolam e se aderem, alcançam o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos e começam a expressar receptores do tipo *scavenger* e fagocitar a LDLox (LUSIS, 2000).

Uma vez que, este processo não possui regulação negativa, os macrófagos fagocitam a LDLox até que se tornem células espumosas e continuam secretando quimiocinas que recrutam mais células inflamatórias. Quando atingem seu limiar de fagocitose entram em apoptose, que contribui para a continuação do ciclo inflamatório e culminando na formação da lesão inicial, a estria gordurosa (GROENENDYK & MEHTA, 2018).

A evolução da lesão inicial para a lesão fibrogordurosa depende da migração de células musculares lisas vasculares da camada média para a camada íntima, sua proliferação e produção de componentes da matriz extracelular como elastina e colágeno, havendo o engrossamento da parede arterial na tentativa de estabilização da lesão crescente (LUSIS, 2000).

Com a progressão da lesão é possível observar a formação de um núcleo necrótico onde se encontram células apoptóticas, restos de células apoptóticas, cristais de colesterol livres, células espumosas e também células dendríticas e linfócitos T na periferia do núcleo necrótico crescente (LUSIS, 2000).

As metaloproteinases de matriz (MMP's) produzidas pelos macrófagos, degradam os componentes da matriz extracelular e contribuem para a desestabilização da placa. Uma vez instável, a ruptura pode ocorrer (LUSIS, 2000). O conteúdo extravasado na ruptura da placa, ao entrar em contato com o fluxo sanguíneo, pode ser associado às plaquetas e formar um trombo. O trombo presente na corrente sanguínea, pode ser levado a obstruir vasos de menor calibre, causar hipóxia nos tecidos, embolia, acidente vascular cerebral e outras complicações, dependendo do local da obstrução (GROENENDYK & MEHTA, 2018). Além disso, o próprio avanço da placa pela luz do vaso pode ocasionar isquemia ou doença arterial periférica (GROENENDYK & MEHTA, 2018).

Uma vez que o metilmercúrio está correlacionado epidemiologicamente com a incidência de doenças cardiovasculares, o presente trabalho destina-se a investigar de forma inédita, a influência do metilmercúrio nos principais processos subjacentes ao desenvolvimento da aterosclerose em camundongos C57BL/6, selvagens e resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose, bem como em camundongos APOE nocautes que são propensos à aterosclerose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mercúrio

As substâncias tóxicas presentes no ambiente podem ser classificadas em provenientes de elementos e compostos naturais e sintetizadas pela indústria. Os elementos tóxicos deslocam-se através dos ciclos biogeoquímicos e tornam-se disponíveis nos ecossistemas (MIRANDA et al., 2007).

As atividades antropogênicas, influenciam diretamente nos ciclos biogeoquímicos dos elementos, fornecem novas fontes de compostos tóxicos para o ambiente e aumento de sua biodisponibilidade, o que dificulta que seus ciclos se completem e permite o acúmulo de suas formas em um ou mais pontos do ciclo (BLANK et al., 2020).

O mercúrio (Hg) é um metal, de peso molecular 200,59 g/mol, número atômico 80 e seu símbolo “Hg”, provém de duas palavras, *hydrargyrum* (Latim) e *hydrargyrus* (Grego), que significam literalmente água/prata (CLARKSON & MAGOS, 2006).

O Hg é o único metal líquido à temperatura ambiente, e possui como principais propriedades químicas sua baixa viscosidade, alta densidade, excelente condutância elétrica e superfície refletora (GOCHFELD, 2003). Essas propriedades são a razão para que este elemento e seus compostos derivados tenham inúmeras aplicações industriais: na produção de soda cáustica, termômetros, lâmpadas fluorescentes, baterias e manômetros; usos odontológicos em amálgamas dentárias; farmacêuticos como componente de cremes faciais e usos medicinais como antifúngico, laxante e vermífugo (GOCHFELD, 2003).

O mercúrio em sua fonte natural está presente no minério cinábrio, que possui cor vermelha brilhante, motivo pelo qual acredita-se ter se dado o início de sua utilização pelos chineses, na preparação de tintas há mais de 3000 anos (GOLDWATER, 1972). Achados de outras civilizações, como túmulos egípcios, demonstram que provavelmente ele também tenha sido empregado como conservante (GOLDWATER, 1972).

Na história mais recente, os sais de mercúrio como o nitrato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$), era aplicado no feltro para fabricação de chapéus e o calomel (Hg_2Cl_2), era depositado na gengiva de bebês em fase de dentição como anestésico e antibiótico, também utilizado no tratamento da sífilis (GOLDWATER, 1972).

A invenção do barômetro em 1643 por Torricelli e do termômetro de mercúrio em 1720 por Fahrenheit, anunciaram a introdução deste elemento na pesquisa científica. Esta extensa utilização, se perpetuou até o início do milênio (MIRANDA et al., 2007).

Ao longo dos anos, o conhecimento de seus efeitos tóxicos foi aprimorado e culminou na descrição de inúmeras doenças relacionadas ao contato humano com este metal, como a acrodinia ou “doença rosa”, que ocorre principalmente em crianças, um tipo de hipersensibilidade, que se manifesta como sudorese profunda, inchaço nos pés e mãos e descamação da pele (GOCHFELD, 2003). Danos ao sistema nervoso central, principalmente em seu período de formação fetal, síndrome nefrótica, danos cognitivos e motores são relatados (ANDREOLI & SPROVIERI, 2017). Apesar disso, o mercúrio continua a ser empregado na indústria (GOCHFELD, 2003).

Em países da Ásia, o mercúrio é encontrado como constituinte de cremes e produtos de beleza (HO et al. 2017). No Brasil, a resolução RDC 145/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), proíbe o emprego deste material para fabricação de produtos utilizados para diagnósticos da saúde e recomenda que não haja contato humano em outras atividades (ANVISA, 2017). Porém, apesar disso, o mercúrio continua a ser empregado no garimpo e na indústria (MIRANDA et al., 2007), além de que, muitas pessoas ainda possuem amálgamas dentárias que foram fabricadas com mercúrio em sua constituição (MUTTER et al., 2007).

O mercúrio possui um complexo ciclo biogeoquímico na natureza e envolve a inter-relação entre os ambientes atmosféricos, aquáticos e terrestres (MICARONI et al., 2000), onde primeiramente é lançado na atmosfera como vapor em sua forma elementar (Hg^0), proveniente principalmente de erupções vulcânicas e erosão rochosa do solo, onde pode permanecer por mais de 100 anos mesmo que a fonte seja eliminada (MUTTER et al., 2007).

A forma elementar pode ser oxidada ainda na atmosfera ou no próprio organismo após ser inalado, e gerar as formas mercuriosa (Hg_2^{++}), pouco estável, ou mercúrica (Hg^{++}), a mais tóxica das formas inorgânicas (CLARKSON & MAGOS, 2006).

O mercúrio oxidado na atmosfera, é depositado nas superfícies das plantas por deposição seca e levado aos rios através da chuva ou diretamente pelo descarte de rejeitos industriais no meio aquático (GOCHFELD, 2003). Nos rios e lagos, através da ação de microrganismos, o mercúrio é biotransformado e as formas organometálicas são geradas, como etilmercúrio, fenilmercúrio e o metilmercúrio, sendo esta última, a mais tóxica entre todos os tipos de mercúrio. O metilmercúrio é estável e facilmente absorvido no trato gastrointestinal, com diversos danos à saúde humana, principalmente danos ao sistema nervoso central, bem estabelecidos (YANG et al., 2019).

O mercúrio elementar é encontrado normalmente no ambiente numa concentração de aproximadamente 0,5ppm (WHO, 1990). Pessoas que possuem amálgama dentária fabricada

com mercúrio, odontologistas, garimpeiros e populações ribeirinhas, tradicionalmente estão expostos a maiores níveis deste metal (MUTTER et al., 2007).

Como possui alta afinidade com os grupos sulfidril (SH) e selenidril (SeH), o mercúrio se liga aos aminoácidos, proteínas e outras macromoléculas que contêm estes grupos funcionais (CLARKSON & MAGOS, 2006). O Hg^0 no sangue, se liga às proteínas do plasma como a albumina, à glutatona reduzida (GSH), aos grupos sulfidril dos linfócitos T, e é transportado ao cérebro aderido à membrana das hemácias, é capaz de atravessar a placenta e a barreira hematoencefálica, o que permite seu alojamento no cérebro fetal em desenvolvimento (YANG et al., 2019).

No organismo, o mercúrio elementar é rapidamente oxidado em sua forma mercúrica ou mercuriosa. É amplamente excretado como mercúrio mercúrico, no entanto, isso não acontece tão rápido que impeça sua absorção considerável na forma elementar. Sua transformação para mercúrio organometálico também pode ocorrer pelos microrganismos do trato gastrointestinal (MUTTER et al., 2007).

O mercúrio mercurioso (Hg_2^{++}), uma vez dentro do organismo, se dissocia para formar Hg^0 e o íon mercúrico (Hg^{++}). Estima-se que, quando ele persista tempo suficiente no organismo sem dissociar, ele atravesse a barreira hematoencefálica e afete as funções cerebrais de forma semelhante ao mercúrio elementar (YANG et al., 2019). Esta forma é a base para a formação do calomel, um sal de mercúrio de baixa solubilidade, pouco absorvido, que foi bastante empregado como laxante e aplicado como antimicrobiano nas gengivas dos bebês em fase de dentição (CLARKSON & MAGOS, 2006). O calomel foi correlacionado com o aparecimento de acrodinia nessas crianças, que pode surgir através do contato com todas as formas de mercúrio, mas, foi identificada em uma a cada 500 crianças que o ingeriram (MERCER et al., 2012).

O íon mercúrico (Hg^{++}), assim como o mercúrio elementar, uma vez na corrente sanguínea, se adere aos grupos sulfidril das hemácias, metalotioneína ou glutatona (YANG et al., 2019). Esta forma, não atravessa a barreira hematoencefálica de forma eficiente, mas, acumula-se na placenta e tecidos fetais. Grande parte da carga corporal deste íon reside nos túbulos renais ligados à metalotioneína. Ocorre deposição significativa também no fígado via porta (CLARKSON & MAGOS, 2006). A excreção ocorre principalmente pela urina e fezes, embora quantidades significativas também sejam eliminadas pelo suor, lágrimas, saliva e leite materno (RATCLIFFE et al., 1996).

As principais formas organometálicas do mercúrio são o etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$) e metilmercúrio (CH_3Hg^+). O etilmercúrio é convertido mais rápido em mercúrio inorgânico

que o metilmercúrio, sendo o último o mais tóxico e mais comum nos organismos vivos (YANG et al., 2019). Ambos possuem mecanismos de reação com grupamentos selenol e sulfidrilas semelhantes ao mercúrio inorgânico. Estas formas são hidrossolúveis e quando ingeridas, principalmente através do consumo de peixe contaminado, são absorvidas no trato gastrointestinal e amplamente distribuídas aos tecidos (CLARKSON & MAGOS, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que a ingestão humana diária de todas as formas de mercúrio seja de 6,7pg, sendo a maior parte, cerca de 4 pg, das formas inorgânicas (WHO, 1990). No entanto, como as formas de mercúrio interconvertem entre si, o mercúrio inorgânico encontrado no organismo pode ser proveniente da desmetilação das formas organometálicas, que pode acontecer através da ação da NADPH-citocromo P-450 redutase (SUDA & HIRAYAMA, 1992). De maneira análoga, as formas organometálicas podem ser resultado da biotransformação das formas inorgânicas ou elementar pelas bactérias sulfato-redutoras do trato gastrointestinal (ULLRICH et al., 2001).

Em adição à metilação no organismo, que demonstra uma pequena parte do que ocorre no meio aquático, as bactérias presentes no sedimento desmetilam o metilmercúrio, via reação reversa. O balanço das reações de metilação e desmetilação determina se um ambiente atuará como fonte ou consumidor de metilmercúrio (BISINOTI & JARDIM, 2004).

No ambiente, no entanto, devido a bioacumulação do metilmercúrio pelos organismos, ou seja, sua recorrente retirada do meio, a metilação prevalece sobre a desmetilação (ULLRICH et al., 2001). A conversão entre as diferentes formas, são orientadas por processos químicos, biológicos e físicos que juntos compõem a complexa distribuição do mercúrio na natureza e nos organismos. Mais de 85% do mercúrio presente na biota de águas doces está na forma de metilmercúrio, indicando que a formação deste, é um processo chave que regula o conteúdo de mercúrio neste compartimento (ULLRICH et al., 2001).

2.2 Metilmercúrio

O interesse no entendimento do ciclo do mercúrio tem aumentado nas últimas décadas, e em relação aos danos à saúde, o metilmercúrio tem atraído atenção sobretudo após o incidente de Minamata (RATCLIFFE et al., 1996).

Localizada no Japão, a cidade de Minamata ficou conhecida mundialmente em 1953, após ser descoberto que a *Chisso Fertilizer Co. Ltd.*, uma das maiores indústrias do Japão ainda em funcionamento atualmente como *Chisso Corporation*, produzia metilmercúrio como

subproduto do processo de produção de acetaldeído, e descartava os resíduos na baía de Minamata, que por sua vez, era importante fornecedor de peixes para a população (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Todos os efeitos à saúde provenientes da intoxicação por metilmercúrio, ficaram conhecidos como “doença de Minamata”. Foi oficialmente reconhecido que 2.252 pessoas foram diretamente contaminadas com metilmercúrio, 1.043 óbitos ocorreram e um total de 12.127 pessoas com a doença, foram relatadas (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Caso semelhante ocorreu no Iraque em 1970, devido à ingestão acidental de sementes de trigo que haviam sido tratadas com antifúngico à base de metilmercúrio. Como consequência, foram registrados cerca de 7.000 casos de envenenamento e mais de 450 mortes (YANG et al., 2019).

O metilmercúrio chama atenção devido sua elevada toxicidade para humanos e sua biomagnificação na cadeia alimentar aquática, isto é, a amplificação e acúmulo de sua concentração à medida que se avançam os níveis tróficos na cadeia alimentar (RUMBOLD et al., 2018). O conhecimento da concentração, transporte e dinâmica do metilmercúrio no ambiente é necessário para predizer seu potencial impacto ambiental e na saúde dos seres (ULLRICH et al., 2001).

O metilmercúrio tem sido detectado em outras regiões sem fonte antrópica de contaminação, proveniente do solo, do sedimento, da deposição atmosférica e da poluição industrial (principalmente das indústrias de cloro/soda e de lâmpadas fluorescentes), da atividade vulcânica e do garimpo (RUMBOLD et al., 2018). As concentrações em peixes de água salgada como o salmão, também têm aumentado consideravelmente (COSTA JÚNIOR et al., 2018).

O mercúrio em sua forma organometálica metilmercúrio, é gerado principalmente a partir da biotransformação bacteriana do mercúrio elementar presente no ambiente aquático pelo descarte do esgoto industrial nos rios, mar e também da extração mineral realizada por garimpeiros e mineradoras (CHOW & TSUI, 2019). Devido à forte ligação do mercúrio com o ouro, estes, formam uma amálgama que facilita a extração e faz com que grandes volumes de mercúrio sejam desprezados em regiões próximas aos leitos dos rios ou em suas margens, regiões onde geralmente ocorre a garimpagem (BOSE-O'REILLY et al., 2017).

O mercúrio elementar que é disperso naturalmente no ambiente proveniente de fontes naturais, como erupções vulcânicas e desgaste da crosta terrestre, também pode ser levado aos leitos dos rios, lençóis freáticos ou esgoto através da chuva, onde servirá como matéria-prima para que ocorra a metilação, assim como o mercúrio proveniente da poluição (BOSE-

O'REILLY et al., 2017). No caso das fontes naturais, a concentração dispersa no ambiente é ínfima se comparadas aos rejeitos industriais e garimpagem (ULLRICH et al., 2001).

A metilação pode acontecer em duas vias distintas, a biótica ou abiótica (ULLRICH et al., 2001). Na via abiótica, a metilação ocorre por reações de transmetilação do mercúrio inorgânico, por incidência de radiação ultravioleta na presença de compostos orgânicos doadores do grupo metila ou por reação com os ácidos fúlvico e húmico. A concentração de ácidos orgânicos e outros compostos como carbono, fósforo e enxofre interferem na dinâmica da metilação abiótica do mercúrio (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Na via biótica, as reações de metilação dependem de reações enzimáticas catalisadas por seres vivos presentes no sedimento aquático (ULLRICH et al., 2001). Alguns microrganismos têm se mostrado capazes de metilar o mercúrio e gerar metilmercúrio, num mecanismo dependente da metilcobalamina (vitamina B12). A metilcobalamina está presente em condições significativas no ambiente, produzida como coenzima por bactérias aeróbias e anaeróbias (predominante neste primeiro grupo), atua na transferência do radical metila como carbânion para o Hg_2^{++} , e gera metil ou dimetilmercúrio (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Diversos microrganismos têm se mostrado capazes de realizar metilação, entre os quais estão principalmente as bactérias sulfato-redutoras do gênero *Desulfovibrio*. Outros gêneros bacterianos como *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Pseudomonas* e espécies como *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus megaterium*, *Candida albicans*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae* também se mostraram capazes de gerar metilmercúrio (ULLRICH et al., 2001; BISINOTI & JARDIM, 2004; CHOW et al., 2019; AN et al., 2019).

Ainda no ambiente aquático, o metilmercúrio fica acumulado no fitoplâncton onde foi gerado, e assim, é consumido por pequenos peixes e crustáceos, o que lhe permite realizar rápida difusão e ligação às proteínas destes seres (ULLRICH et al., 2001). Posteriormente, através da biomagnificação, é possível encontrar sua máxima concentração nos tecidos de peixes no topo da cadeia alimentar como a traíra, surubim e o dourado, chegando a concentrações de 0,6 µg/g de peso em peixes no rio Cassiporé, um afluente da região Amazônica (LIMA et al., 2015).

Níveis de mercúrio acima de 0,5 µg/g de peso em peixes não predadores e 1 µg/g em peixes predadores, não são permitidos pela Legislação Brasileira (BRASIL, 1998). De forma geral, a concentração média de Hg em peixes de água doce e marinhos em regiões sem fonte direta de mercúrio é cerca de 0,2 µg/g (FARIAS, 2006). Deste total, mais de 85% é

acumulado na forma de metilmercúrio, o que caracteriza o consumo de peixe, frutos do mar e derivados como a principal fonte de contaminação humana (FARIAS, 2006).

A concentração de metilmercúrio acumulada nos tecidos dos peixes varia de acordo com a localização da região em que se encontram, hábitos alimentares e nível trófico da cadeia alimentar (MARCO, 2007). Assim, peixes carnívoros de rios da região Norte do país, como o Tapajós, Madeira e outros afluentes da bacia Amazônica, tendem a ser os mais contaminados (COSTA JÚNIOR et al., 2015), isso porque, a região está submetida ao processo de extração mineral através do garimpo desde os anos 1970 (MARCO, 2007).

A Organização Mundial da Saúde recomenda que o contato humano diário com todas as formas de mercúrio não ultrapasse 0,47 µg/g, e que os níveis no cabelo não ultrapassem 4 mg/kg (WHO, 1990). Porém, de maneira geral, as populações ribeirinhas, têm no consumo do peixe, a base de sua alimentação e estão expostas à intoxicação crônica por metais pesados, como o metilmercúrio (MARCO, 2007).

Na maioria dos casos, as populações ribeirinhas, por localização geográfica dos rios, se encontram próximas às regiões de garimpo. Essas populações geralmente têm dificuldade financeira no acesso a outras fontes de proteína além do peixe e realizam contato diário com a água dos rios para consumo, que se perpetua ao longo de toda a vida (FARIAS, 2006). A concentração de mercúrio no cabelo da população ribeirinha do Amazonas tem níveis médios de 10 mg/kg, considerado muito alto e que merece atenção especial de entidades governamentais responsáveis pelo meio ambiente e saúde da população brasileira (COSTA JUNIOR et al., 2018).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu para as águas de classe I, II e III (àquelas que servem para consumo), o limite de 0,0002 mg/L e para águas salinas 0,0001 mg/L de mercúrio. Os efluentes de qualquer fonte poluidora contendo mercúrio, só podem ser lançados nos corpos d'água em níveis abaixo de 0,001 mg/L (BRASIL, 2008).

As primeiras evidências dos danos à saúde causados pelo metilmercúrio, surgiram após o incidente de Minamata, e atualmente a literatura é abrangente e retrata inúmeras consequências da toxicidade do metilmercúrio, principalmente no que diz respeito aos efeitos neurotóxicos que este desempenha (YANG et al., 2020).

A população afetada pela contaminação de metilmercúrio, como a de Minamata, apresentou graves problemas neurológicos que culminaram em sequelas cognitivas e motoras (YANG et al., 2020). As crianças de mães expostas ao metilmercúrio exibiram severas deficiências em seu desenvolvimento neural, mesmo nos casos em que havia total ausência de

sinais clínicos nas mães, o que levou à conclusão que o cérebro fetal seria mais suscetível aos danos neurológicos causados pelo metilmercúrio (XU et al., 2018).

Atualmente sabe-se que o metilmercúrio é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e a placenta, se alojar no cérebro fetal e em outros tecidos, e desempenhar seus danos por mecanismos que vão desde a mimetização de aminoácidos até a ligação direta em proteínas que possuem atividade antioxidante e as inibir (CLARKSON & MAGOS, 2006).

A química do metilmercúrio é semelhante nos tecidos entre as diferentes espécies. Nos mamíferos, quando ingerido, sua maior parte, entre 90 e 95% é absorvida no trato gastrointestinal, e os outros 5 a 10% são diretamente eliminados através das fezes (GOCHFELD, 2003). O metilmercúrio dificilmente é encontrado livre nos sistemas biológicos, devido a sua alta eletrofilicidade, quando presente no sangue, reage rapidamente com grupamentos que atuam como nucleófilos fortes, como as selenoidrilas e sulfidrilas das macromoléculas (CLARKSON & MAGOS, 2006).

O metilmercúrio se liga preferencialmente às selenoproteínas, porque a selenoidrila age como nucleófilo mais forte que a sulfidrila (SPILLER, 2018). No entanto, é possível encontrar maiores concentrações de metilmercúrio ligado ao enxofre porque este é mais abundante na estrutura das macromoléculas. Assim, o metilmercúrio fica aderido às proteínas eritrocitárias, à albumina, à glutatona, ao aminoácido cisteína livre ou nas estruturas proteicas (SPILLER, 2018).

A ligação do metilmercúrio à cisteína lhe fornece uma estrutura tridimensional semelhante a metionina, tornando este complexo inclusive, capaz de mimetizá-la (BRIDGES & ZALUPS, 2005). A mimetização da metionina executada pelo complexo metilHg-Cys permite que ele seja facilmente transportado por uma grande e conservada classe de transportadores de aminoácidos neutros do tipo L1 (LAT1), que estão expressos em praticamente todas as células do organismo, facilitando sua biodistribuição entre os tecidos (BRIDGES & ZALUPS, 2005). A absorção intestinal provavelmente ocorre pelo mesmo mecanismo (LEANER & MASON, 2002).

Dentro das células, o principal mecanismo de ação descrito para os danos desencadeados pelo metilmercúrio, é o aumento do estresse oxidativo (CLARKSON & MAGOS, 2006). Este processo pode acontecer por ligação do metilmercúrio aos grupamentos sulfidrila ou selenoidrila presentes na maioria das enzimas dos sistemas de defesa antioxidante, como a paraoxonase, glutatona peroxidase, glutatona redutase (ARRIFANO et al., 2018), tiorredoxinas (SPILLER, 2018) e a própria glutatona reduzida necessária para a reação da

glutathiona peroxidase, que culmina na redução de sua atividade enzimática (FRANCO et al., 2009).

Além disso, o metilmercúrio pode aumentar as espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas nas células, por interferência no potencial elétrico da membrana das mitocôndrias, e aumentar o ânion superóxido gerado pelo desacoplamento de elétrons da cadeia respiratória (GHIZONI et al., 2017).

No sistema nervoso central, alvo descrito como primário em relação à toxicidade do metilmercúrio, existe uma clara seletividade de sua ligação em algumas estruturas cerebrais que não está totalmente esclarecida (COUNTER & BUCHANAN, 2004). Sabe-se que é capaz de causar danos cognitivos e motores através do aumento do estresse oxidativo, inibir a síntese proteica nos neurônios, romper microtúbulos, aumentar o influxo de cálcio intracelular e interferir na função neurotransmissora nestas células, além de desencadear mecanismos incorretos de excitabilidade (SANFELIU et al., 2003).

Todos esses processos no sistema nervoso, principalmente naquele em desenvolvimento dos fetos por exemplo, período mais vulnerável de seu funcionamento, levam a alterações e danos irreversíveis em sua organização e estrutura (SANFELIU et al., 2003). Expor os neurônios à vulnerabilidade através do aumento do estresse oxidativo, é também um processo considerado crucial no desenvolvimento de diversas doenças neurológicas como as doenças de Alzheimer (HOEKSTRA et al., 2016), Parkinson (BURBULLA et al., 2017) e esclerose lateral amiotrófica (PETERS et al., 2015).

Estudos experimentais em adultos nas décadas de 1970 e 1980 determinaram que a distribuição do metilmercúrio do sangue para todos os tecidos do corpo é um processo que leva cerca de 30 a 40 h, e em média cerca de 5% da dose absorvida permanece no compartimento sanguíneo. A concentração no cérebro é de cerca de 5 vezes e no cabelo do couro cabeludo cerca de 250 vezes a concentração correspondente no sangue (WHO, 1990).

Assim, os níveis de metilmercúrio no cabelo acompanham os níveis sanguíneos, porque o cabelo fica exposto ao ambiente metabólico interno do organismo, incluindo o sangue, linfa e fluidos extracelulares (FARIAS, 2006). Sabe-se que a concentração presente no cabelo reflete proporcionalmente a concentração do sangue. Como o cabelo possui uma taxa média de crescimento de aproximadamente 1 cm por mês, segmentos consecutivos de 1 cm recapitulam a média mensal dos níveis presentes no sangue (FARIAS, 2006).

Os parâmetros de captação, distribuição e excreção de metilmercúrio em humanos adultos permitem relacionar quantitativamente os níveis nos meios indicadores como sangue e cabelo com a ingestão diária e até para estimar níveis em tecidos-alvo. Modelos farmacocinéticos

têm sido usados pelas agências reguladoras para estimar ingestão diária permitida a longo prazo e efeitos adversos através de níveis sanguíneos e capilares (COSTA JÚNIOR et al., 2018).

Além dos danos reconhecidamente causados no sistema nervoso central, maiores concentrações de mercúrio no cabelo, vêm sendo correlacionadas com o aumento da incidência das doenças cardiovasculares (VIRTANEN et al., 2007).

Níveis altos de mercúrio no cabelo se relacionam positivamente com a ocorrência de infarto agudo do miocárdio (SALONEN et al., 1995). Diversos estudos de coorte e prospectivos, correlacionam os altos níveis de mercúrio no cabelo com o aumento das doenças coronarianas, com a progressão da aterosclerose na carótida e a morte em decorrência de doenças cardiovasculares (YOSHIZAWA et al., 2002; SALONEN et al., 1995; VIRTANEN et al., 2007), porém, os mecanismos subjacentes ao seu desenvolvimento, não são explorados nestes estudos e permanecem sem causa definida.

Atualmente, sabe-se que os impactos do metilmercúrio no sistema cardiovascular dependem de mecanismos moleculares complexos. Polimorfismos de genes da via da glutathiona, das apolipoproteínas e do óxido nítrico, predispõem ao maior dano causado pela intoxicação por metilmercúrio (ARRIFANO et al., 2018). O metilmercúrio induz a disfunção vascular (TAKAHASHI & SHIMOHATA, 2019), provoca aumento da pressão arterial (ISLAM et al., 2016; WELLS et al., 2017), hipercolesterolemia (MOREIRA et al., 2012; ZHANG et al., 2018), que são fatores comuns entre doenças cardiovasculares.

Os primeiros estudos, atribuíam a alta mobilidade do metilmercúrio no corpo, como a passagem pelas barreiras hematoencefálicas e placentárias, a sua solubilidade lipídica, equívoco que provavelmente surgiu através do uso comum do cloreto de metilmercúrio que se demonstrava lipossolúvel em estudos experimentais. O fato é que, o metilmercúrio forma complexos solúveis em água nos tecidos do corpo ao se ligar nos grupos sulfidrilas das proteínas, peptídeos como a glutathiona reduzida e aminoácidos como a cisteína (CLARKSON & MAGOS, 2006).

Por isso, o metilmercúrio é transportado das células do fígado para a bile num complexo com glutathiona reduzida usando transportadores de glutathiona (BALLATORI & CLARKSON, 1985). O metilmercúrio entra nas células mimetizando a metionina e sai pela via da glutathiona, processos que ajudam a explicar sua mobilidade e desempenham um papel fundamental na eliminação de metilmercúrio nas fezes. O complexo metilmercúrio-glutathiona, após secreção da bile no trato gastrointestinal é reabsorvido e alcança novamente a circulação

sanguínea, onde pode vir a se depositar novamente no fígado, ou seja, realizar a circulação entero-hepática (FITZGERALD & CLARKSON, 1991; DUTCZAK & BALLATORI, 1994).

A inibição da γ -GT, que degrada a glutathione reduzida, causa uma redução acentuada na captação renal e um grande aumento na excreção urinária de metilmercúrio. Isso está relacionado ao fato de que, nos néfrons, o metilmercúrio complexado a GSH passa pelas células tubulares proximais, é degradado pela γ -GT, fica livre para se ligar novamente às cisteínas e ser reabsorvido via transportadores LAT1 (TANAKA et al., 1990).

2.3 Metabolismo lipídico

Os lipídios abrangem uma classe de biomoléculas constituídas principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio, que se caracterizam por apolaridade, ou seja, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos não polares. Diferente dos carboidratos, os lipídios não necessitam da presença de água para sua solvatação, e são moléculas reduzidas, o que lhes permitem liberar maior quantidade de energia por grama oxidado, e os tornam a principal forma de estoque de energia para os seres vivos (NELSON & COX, 2014).

Os ácidos graxos, são constituídos de hidrocarbonetos com um grupo ácido carboxílico em sua extremidade, e contêm de 4 a 36 átomos de carbono. São a base para a formação dos triacilgliceróis que representam cerca de 95% dos lipídios provenientes da dieta. O restante é constituído por fosfolipídios, ácidos graxos livres, colesterol e fitoesteróis (NELSON & COX, 2014; D'SOUZA et al., 2016).

A solubilidade existente nos grupos ácido carboxílico, conferem aos ácidos graxos a capacidade de formar outras estruturas em meio aquoso através de interações não covalentes que realizam entre si, importantes para a manutenção de todas as membranas biológicas. Outros lipídios como o colesterol são importantes na constituição de algumas vitaminas, ácidos biliares e na sinalização celular através dos hormônios (NELSON & COX, 2014; HEIER & HAEMMERLE, 2016).

As lipoproteínas permitem a mobilidade dos lipídios, moléculas insolúveis, através do sangue, e consistem em um núcleo lipídico hidrofóbico contendo principalmente triacilgliceróis e ésteres de colesterol, circundado por uma camada monofásica de fosfolipídios, colesterol não-esterificado e apolipoproteínas. As lipoproteínas bem como suas apolipoproteínas constituintes se diferenciam quanto a sua constituição química, tamanho, densidade e função (NELSON & COX, 2014; JONES 2016).

De acordo com sua densidade e mobilidade eletroforética, as lipoproteínas são classificadas em quilomícrons, lipoproteínas de baixíssima densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). As apolipoproteínas participam da montagem das partículas de lipoproteínas, ligação a receptores de membrana que captam as lipoproteínas para o interior das células como as apoB-48, apoB-100 e E, e/ou atuam como co-fatores enzimáticos, como as apoC-II, C-III e A-I (MAHLEY et al., 1984; NELSON & COX, 2014).

Os quilomícrons (QM) são sintetizados nas células da mucosa intestinal, têm um núcleo central composto de grande quantidade de triacilgliceróis (TAG), cerca de 80 a 95%, e uma pequena quantidade de ésteres de colesterol derivados da gordura ingerida com a dieta. Sua principal apolipoproteína estrutural é a apolipoproteína B-48 (SCHAEFER et al., 2001).

Os quilomícrons participam do ciclo exógeno das lipoproteínas, onde a apoB-48 se combina com os lipídios obtidos da dieta por ação da proteína de transferência microssomal (MTP). Na fase pós-prandial, são despejados nos vasos linfáticos e entram na circulação sistêmica na altura da veia subclávia (SCHAEFER et al., 2001).

Os QM são as maiores lipoproteínas e as de menor densidade, surgem no plasma por volta de 60 minutos após a ingestão de gordura e são usualmente removidos da circulação nas 6 a 8 horas seguintes (NAKAJIMA et al., 2011). Na circulação sistêmica, os QM realizam trocas com as HDL, adquirindo apoC-II, apo C-III, apoE, colesterol livre, colesterol esterificado e fosfolipídios (NELSON & COX, 2014).

Uma vez adquirida a apoC-II, os QM tornam-se capazes de ativar a lipase lipoprotéica (LPL), localizada no endotélio, responsável pela hidrólise dos TAG nos QM e VLDL. A hidrólise de TAG dos QM resulta em partículas menores, chamadas de QM remanescentes, relativamente enriquecidos com proteína, com superfície coberta com colesterol livre e fosfolipídios, que são transferidos para a HDL para manter a estabilidade das partículas de QM (NAKAJIMA et al., 2011).

A transferência da apoC-II, aliada ao aumento da inacessibilidade do núcleo dos QM ao sítio ativo da LPL, resulta na interrupção da remoção de TAG (NELSON & COX, 2014). A apoB-48 e a apoE permanecem nas partículas de QM remanescentes, que são removidas da circulação pelo fígado por interação principalmente da apoE com os receptores B/E de remanescentes presentes nas membranas dos hepatócitos (NAKAJIMA et al., 2011).

O metabolismo endógeno tem início com a síntese hepática da VLDL, onde a enzima MTP combina os lipídios com a apoB-100 (SCHAEFER et al., 2001). Ao captar ésteres de colesterol, apolipoproteínas C-II, C-III e E recebidas da HDL no plasma, as partículas de

VLDL se tornam capazes de interagir com a enzima LPL do endotélio capilar, liberando ácidos graxos aos tecidos, a partir de TAG que carregava. Outra troca que ocorre entre VLDL e HDL é a transferência de apoC e apoE para a HDL. Com a metabolização dos seus constituintes, as VLDL passam a ser classificadas como IDL, lipoproteínas de densidade intermediária, que têm uma meia-vida curta (NAKAJIMA et al., 2011).

As IDL podem ser captadas no fígado e degradadas em seus componentes, receber colesterol da HDL via proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) e perder a apoE, culminando na formação da LDL. Tanto a LDL como a IDL são retiradas da circulação através de captação pelos receptores B/E, existentes principalmente no fígado (NAKAJIMA et al., 2011).

Essa captação da LDL e a liberação do colesterol, no fígado em particular, causa a inibição da síntese endógena de colesterol (inibição da HMG-CoA redutase); ativação da LCAT (lecitina-colesterol-acil-transferase) para esterificação e armazenamento do colesterol e a diminuição do número de receptores para apoB-100 na membrana dos hepatócitos, aumentando com isso, seu nível plasmático (CZYZEWSKA et al., 2010). As lipoproteínas LDL, possuem o núcleo central composto quase exclusivamente de ésteres de colesterol com apoB-100 em sua superfície, mas não possuem apoE (NAKAJIMA et al., 2011).

As lipoproteínas HDL são formadas em sua maior parte por ésteres de colesterol recobertos pelas apolipoproteínas, das quais, a apoA-I é a principal. As HDL, por sua vez, recebem partes da apoA-I e IV dos QM (CZYZEWSKA et al., 2010). Contêm em menor quantidade, as apoA-II, apoA-IV; apoC, apoE e apoJ. Algumas proteínas associadas com a HDL têm atividade enzimática como: LCAT, CETP, PLTP (proteína de transferência de fosfolipídios), hidrolase acetil-PAF, esterase e paraoxonase. Todas importantes para o metabolismo do colesterol (NOFER et al., 2002; LUSIS, 2000).

A paraoxonase é uma enzima do sistema de defesa antioxidante, presente na molécula de HDL, que impede sua oxidação e protege as lipoproteínas de baixa densidade (aterogênicas), dos danos oxidativos (RICHTER et al., 2009).

O transporte reverso de colesterol é uma via de transporte que remove o colesterol das células extra-hepáticas e os direciona ao fígado para metabolização. Este processo está negativamente correlacionado com a incidência de doenças cardiovasculares e pela redução do acúmulo de colesterol das artérias, esse transporte previne o desenvolvimento da aterosclerose (SVIRIDOV & NESTEL 2002).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado, de maneira geral, que o aumento de colesterol total, LDL, colesterol e TAG, assim como a redução da HDL, constituem fatores de risco de

primeira importância para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (NOFER et al., 2002), que são a principal causa de morte no mundo, dentre as quais, a aterosclerose é fator comum (WHO, 2013).

O transporte reverso de colesterol depende de uma HDL que contém apoA-I, sintetizada e secretada pelo fígado. A HDL rapidamente adquire colesterol livre e fosfolípidios de tecidos extra-hepáticos através de receptores específicos do efluxo de colesterol, como o ABCA1 (transportador A1 cassete ligante de adenosina trifosfato) na superfície das células, inclusive células do sistema imune como os macrófagos (SVIRIDOV & NESTEL 2002). Então, ocorre a esterificação do colesterol dentro da HDL por ação da LCAT, e sua maturação. A HDL madura é capaz de realizar trocas de colesterol esterificado e triacilgliceróis com outras lipoproteínas que contêm a apoB, através da ação da enzima CETP e transferência de fosfolípidios por ação da PLPT (SVIRIDOV & NESTEL 2002). Finalmente, ocorre a remodelagem da HDL e sua captura pelo fígado, onde a HDL é remodelada para recomençar o ciclo, ou catabolisada no rim pelas proteínas megalina e cubulina (SVIRIDOV & NESTEL 2002).

Os receptores ABCA1 e ABCG1 controlam o efluxo de colesterol dos tecidos e dos macrófagos e estão envolvidos no reconhecimento da partícula de apoA-I e na interação com a HDL madura, respectivamente (NOFER et al., 2002). Aproximadamente 9 mg de colesterol/kg de peso corporal/dia sintetizados pelos tecidos periféricos vão ser transportados para o fígado para o catabolismo, onde poderão ser excretados na bile (principal via para eliminação), ou reabsorvidos, através da circulação entero-hepática (NAKAJIMA et al., 2011).

O acúmulo de lipídios, principalmente triglicerídeos, no fígado, caracteriza a esteatose hepática. Os lipídios hepáticos são frutos da lipólise no tecido adiposo, do aumento na ingestão alimentar e lipogênese em casos de excesso de energia (DOWMAN et al., 2010).

Por outro lado, as cadeias carbônicas presentes nos lipídios, podem ser utilizados para β -oxidação, armazenados em gotículas lipídicas, ou incorporação nas lipoproteínas de baixa densidade, como a VLDL e ácidos graxos livres podem ser reesterificados em triglicerídeos. Portanto, o acúmulo de gordura hepática, pode ocorrer como resultado do aumento da síntese, diminuição da exportação para os tecidos e/ou diminuição da β -oxidação (ADAMS et al., 2005).

No plasma, o aumento dos lipídios circulantes, podem ser fruto de diversos processos, entre eles, o aumento na síntese endógena, aumento da ingestão alimentar, diminuição da captação das lipoproteínas (onde estão contidos) pelos tecidos extra-hepáticos ou pelo fígado

e/ou diminuição da β -oxidação (ADAMS et al., 2005). O desbalanço entre os níveis de lipídios plasmáticos, como na hipercolesterolemia, constituem um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose.

2.4 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença multifatorial progressiva, caracterizada pela associação entre disfunção endotelial e um processo inflamatório crônico, com presença do acúmulo de lipídios e elementos fibrosos na parede das grandes artérias (Libby & EVERETT, 2019).

As artérias são formadas por três camadas morfológicamente distintas. A camada íntima, mais interna, que fica em contato com o fluxo sanguíneo, é delimitada por uma monocamada de células endoteliais no lado luminal e fibras elásticas no lado periférico, possui espessura muito fina e consiste em matriz extracelular de tecido conjuntivo, principalmente proteoglicanos e colágeno. A camada média, consiste em células musculares lisas vasculares (CMLV), e a camada mais externa, a adventícia, é formada principalmente por tecido conjuntivo (LUSIS, 2000).

Inúmeros fatores de risco para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose foram identificados nos últimos anos, e todos os fatores de risco com exceção do sexo e níveis de lipoproteína (a), envolvem múltiplos genes (LUSIS, 2000). Dentro de uma população, a herdabilidade da aterosclerose (a fração da doença explicada pela genética), tem sido considerada alta na maioria dos estudos, frequentemente superior a 50%. Estudos de migração populacional, por outro lado, mostram claramente que o ambiente explica grande parte da variação na incidência de doenças entre as populações (LUSIS, 2000).

O fluxo sanguíneo desempenha forças hemodinâmicas denominadas forças de cisalhamento ou *shear stress* nas paredes dos vasos, e em especial nas artérias, essas forças garantem a manutenção da morfologia das células endoteliais (LUSIS, 2000). Em regiões tubulares das artérias, o fluxo sanguíneo é laminar e exerce forças de cisalhamento no endotélio que com seus complexos juncionais estreitos mantêm sua permeabilidade e homeostase para sua atuação como barreira entre o sangue e os tecidos (GOLDBOURT & NEUFELD, 1986).

As forças de cisalhamento garantem também a morfologia elipsoide orientada para o lúmen arterial das células endoteliais. No entanto, em regiões de curvatura ou ramificação, há uma diminuição das forças de cisalhamento e modificação da morfologia das células

endoteliais, que passam a ser poligonais sem orientação específica. Isso provoca mudanças na permeabilidade do endotélio nesses pontos e a lipoproteína de baixa densidade (LDL), passa a ficar mais tempo em contato com essas regiões e pode adentrar para o espaço subendotelial (LIBBY, 2003).

Uma vez no espaço subendotelial, a LDL fica retida por interação com os proteoglicanos presentes, e é oxidada e se torna LDLox, por espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos residentes ou pelas próprias células endoteliais (LUSIS, 2000). Além da oxidação, a LDL também pode sofrer lipólise, proteólise e agregação, que contribuem para a sequência do estímulo inflamatório (LUSIS, 2000). Em situações de disfunção vascular, como ocorre nas dislipidemias ou hipertensão arterial sistêmica, a atividade da NADPH oxidase, a maior fonte de estresse oxidativo na vasculatura, é regulada positivamente (ISLAM et al., 2016).

A LDLox no espaço subendotelial fornece um estímulo inflamatório nas células endoteliais para que estas comecem a expressar moléculas de rolamento como as P e E-selectinas, e adesão como as moléculas de adesão vascular e intercelular (VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente). Assim, há o recrutamento de monócitos circulantes, estes por sua vez, iniciam o processo de rolamento e adesão, onde alcançam o espaço subendotelial por diapedese (LUSIS, 2000). Neste ambiente, ocorre a produção de quimiocinas como a quimiocina quimiotática de monócitos (CCL2), citocinas como o fator estimulante de colônia de macrófagos (MCSF), fator de necrose tumoral (TNF), que induzem a proliferação e diferenciação de monócitos em macrófagos (LUSIS, 2000).

Os monócitos ao se diferenciarem em macrófagos, começam a expressar receptores do tipo *scavenger*, como CD36 e SRA, por meio dos quais, há a captação da LDLox (LUSIS, 2000). A captação de LDLox por macrófagos é um estímulo que não possui *feedback* negativo. Os macrófagos captam a LDLox até se tornarem células espumosas, que recebem esse nome pela aparência das vesículas brancas com conteúdo lipídico semelhante à espuma, em seu citoplasma (LIBBY, 2003).

Os macrófagos secretam ativamente a apoE, e isso pode promover o efluxo de colesterol pela HDL, inibindo assim, a sua transformação em células espumosas. No entanto, quando isso não ocorre, ou não ocorre o suficiente, têm-se a instalação da lesão inicial, a estria gordurosa, caracterizada pela presença de células espumosas no espaço subendotelial (FAZIO et al., 1997).

A transição da lesão inicial, a estria gordurosa, para uma lesão intermediária, a fibrogordurosa, depende da morte das células espumosas que formam uma massa crescente de

lipídios extracelulares e outros detritos provenientes da apoptose, conhecido como núcleo necrótico (FAVERO, 2007). Além disso, ocorre a migração de células musculares lisas vasculares (CMLV) da camada média para formar uma capa fibrosa, com deposição de matriz extracelular na região entre o endotélio e o núcleo necrótico crescente, na tentativa de estabilizá-lo (FAVERO, 2007).

Citocinas secretadas por macrófagos e células T, são importantes para a proliferação e produção de componentes da matriz extracelular como colágeno e elastina que ajudam a estabilizar a lesão crescente (FAVERO, 2007). A interação do CD40 com seu ligante CD154 (CD40L) é essencial para reações imunes envolvendo linfócitos T e B, e agora sabe-se que o CD40 é também expresso em macrófagos (LUSIS, 2000).

A interação do CD40 nos macrófagos com seu ligante presente em células T (CD154), na biologia da aterosclerose, representa o estímulo à produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , que atua na inibição da produção de matriz extracelular pelas CMLV, produção de proteinases de degradação da matriz extracelular pelos macrófagos, e expressão de mais moléculas de adesão pelas células endoteliais (LUSIS et al., 2000).

Vários fatores de risco parecem contribuir para o desenvolvimento de lesões fibrosas, incluindo elevação de homocisteína, hipertensão arterial sistêmica e fatores hormonais (NATHAN & CHAUDHURI, 1997). Estudos com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) indicam que a pressão arterial elevada estimula a expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), um potente mitógeno para as CMLV. O estrogênio possui múltiplas propriedades antiaterogênicas, incluindo efeitos sobre os níveis plasmáticos de lipoproteínas, estimulação da prostaciclina e produção de óxido nítrico (NATHAN & CHAUDHURI, 1997).

Nesse sentido, o estresse oxidativo, principal mecanismo associado à toxicidade do metilmercúrio, também pode desempenhar papel importante na fisiopatologia da aterosclerose. A atividade da NADPH oxidase em macrófagos é um componente importante na expressão de moléculas de adesão, infiltração de monócitos e proliferação de CMLV (GOTTO, 2011). A NADPH oxidase e as xantinas oxidases são altamente expressas na vasculatura e podem gerar superóxido e peróxido de hidrogênio e servir de base para a oxidação da LDL (ISLAM et al., 2016). O ácido úrico gerado pela atividade das xantinas oxidases desencadeia a formação de células espumosas. Aterosclerose avançada e grande produção de ERO mitocondriais são observadas em camundongos apoE nocaute, destacando a importância do estresse oxidativo no seu desenvolvimento (OLIVEIRA & VERCESI, 2019).

A produção de proteinases de degradação da matriz extracelular contribui para a vulnerabilidade da capa fibrosa. Placas vulneráveis geralmente apresentam capas fibrosas

finas e grande número de células inflamatórias. A estabilidade das lesões ateroscleróticas também pode ser influenciada pela calcificação e neovascularização, características comuns das lesões avançadas (BRINJIKJI et al., 2016).

A calcificação íntima é um processo ativo no qual células do tipo pericito secretam matriz que posteriormente se torna calcificada, semelhante à formação óssea, processo regulado por oxisteróis e citocinas (WATSON et al., 1994). A formação de um trombo, por plaquetas aderentes, geralmente resulta de rompimentos ou erosões da placa instável. O trombo formado pode ser levado a obstruir vasos de menor calibre e causar infarto agudo do miocárdio, isquemia ou acidente vascular cerebral, além de outras patologias, dependendo do local da obstrução (LIBBY, 2000).

Medicamentos eficazes para reduzir o colesterol e a hipertensão foram desenvolvidos. Em particular, as estatinas diminuem os níveis de lipoproteínas aterogênicas e os eventos clínicos e a mortalidade por aterosclerose. No entanto, doenças cardíacas e derrames continuam sendo de longe as causas mais comuns de morte nas sociedades ocidentalizadas (VENEGAS-PINO et al., 2018).

2.5 Metilmercúrio e risco cardiovascular

Evidências sustentam os benefícios no consumo do peixe, mesmo em doses moderadas (1-2 vezes por semana), na prevenção de eventos cardiovasculares. Esses benefícios estão concentrados na ingestão de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e do ácido docosapentaenoico (DHA), que são mais altos em peixes no topo da cadeia alimentar, como o salmão (DOWNER et al., 2017). No entanto, peixes no topo da cadeia alimentar também são a maior fonte de metilmercúrio para o organismo (MOZAFFARIAN et al., 2011).

Os danos causados pela intoxicação por metilmercúrio ao sistema nervoso central são bem documentados, sobretudo após o incidente de Minamata (BISINOTI & JARDIM, 2004). No entanto, a longo prazo, diversos estudos sustentam a correlação epidemiológica existente entre os altos níveis de metilmercúrio presentes no sangue e cabelo, com o aumento da incidência das doenças cardiovasculares, bem como da morte em decorrência destas (VIRTANEN et al., 2007).

A associação entre a intoxicação por metilmercúrio e o aumento do risco de doenças cardiovasculares começou a ficar evidente após estudos epidemiológicos finlandeses que

correlacionaram altos níveis de metilmercúrio no cabelo com aumento da progressão de aterosclerose na carótida e a morte em decorrência de doenças cardiovasculares (SALONEN et al., 1995; SALONEN et al., 2000). Porém, os mecanismos subjacentes a estes processos não são explorados nestes estudos e atualmente ainda não são totalmente compreendidos.

A alta afinidade do metilmercúrio com os grupamentos sulfidríla e selenol presentes na maioria dos sistemas antioxidantes, com consequente aumento do estresse oxidativo, são apontados como principal causa da toxicidade do metilmercúrio e da sua influência na ocorrência das doenças cardiovasculares (VIRTANEN et al., 2007).

Além de se ligar às sulfidrílas e selenodrílas presentes nas enzimas ou moléculas antioxidantes, o metilmercúrio se liga à cisteína livre e se torna capaz de entrar em todas as células que expressam o receptor LAT1 (BRIDGES & ZALUPIS et al., 2005). Dentro das células o metilmercúrio reduz o potencial de membrana mitocondrial, o que induz o desacoplamento de elétrons na cadeia respiratória (GHIZONI et al., 2017). Ainda, ao se ligar às selenoproteínas como a glutathione peroxidase, o metilmercúrio reduz sua atividade, o que aumenta a peroxidação lipídica, e constitui risco para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (VIRTANEN et al., 2007).

Da mesma forma, o mercúrio pode inativar a paraoxonase, uma importante enzima antioxidante ligada à HDL. Sua inibição está associada ao maior risco de doença coronariana, por aumento da oxidação das lipoproteínas (RICHTER et al., 2009).

A oxidação da LDL é considerada um evento importante no desenvolvimento de aterosclerose (LIBBY, 2003). Os níveis de LDLox mostram uma correlação positiva com sua progressão (CHEN et al., 2019). Um aumento induzido por metilmercúrio na concentração plasmática de LDL, como registrado anteriormente (MOREIRA et al., 2012), leva ao aumento de deposição da LDL nas artérias, onde estão também mais propensas a sofrer danos oxidativos (LUSIS, 2000), uma vez que, o metilmercúrio pode atuar no aumento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica (VIRTANEN et al., 2007).

A interferência do metilmercúrio na transcrição gênica também é relatada. Ao se ligar aos grupamentos sulfidríla do fator nuclear de transcrição κ B (NF- κ B), o metilmercúrio impede que este atue na transcrição de diversos genes, entre os quais estão o da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS), que possui importante papel na regulação do tônus vascular e no sistema imune (VIRTANEN et al., 2007). Polimorfismos de genes da via do óxido nítrico e das apolipoproteínas, estão correlacionados com o maior dano causado pela intoxicação por metilmercúrio (ARRIFANO et al., 2017).

Além de interferir na expressão de iNOS, o metilmercúrio regula negativamente a atividade da eNOS por ligação às Rho-quinases que são responsáveis por fosforilar a eNOS e garantir sua atividade (ISLAM et al., 2016). A biodisponibilidade do óxido nítrico é importante para a homeostase endotelial, regulação do tônus vascular e regulação da sinalização em células imunes (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A disfunção vascular que ocorre em processos hipertensivos, é importante na etiologia das doenças cardiovasculares, sobretudo na aterosclerose (TAKAHASHI & SHIMOHATA, 2019). O metilmercúrio induz ambos processos, aumento da pressão arterial e disfunção vascular (TAKAHASHI & SHIMOHATA, 2019; ISLAM et al., 2016; WELLS et al., 2017).

2.6 Modelo murino de aterosclerose

O uso de modelos animais é uma maneira importante de identificar processos que contribuem para o surgimento e progressão de doenças. Ratos e camundongos são os mamíferos mais úteis para estudos, e no caso da aterosclerose, apresentam praticamente os mesmos conjuntos de genes que os humanos, que os permitem mimetizar muitas características relevantes para o estudo da aterosclerose (LUSIS, 2000; BASU et al., 2018).

Camundongos nocautes dos genes responsáveis pela expressão da apolipoproteína E (APOE -/-) ou do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr -/-), desenvolvem lesões avançadas espontaneamente e são os modelos mais utilizados em estudos genéticos e fisiológicos do desenvolvimento desta patologia (JAWIEN et al., 2004).

Os camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose (BRESLOW, 1996). Isso se deve ao fato que, possuem altas concentrações sanguíneas de HDL, que desempenha mais de 85% do transporte de colesterol plasmático nesta espécie, diferente dos seres humanos, nos quais, a principal carreadora de colesterol é a LDL (TEUPSER et al., 2003).

Outras características que contribuem para resistência dos camundongos ao desenvolvimento de aterosclerose são a ausência da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) no plasma (BASU et al., 2018). Além disso, a lipase lipoprotéica é solúvel e plasmática em camundongos, diferente dos humanos onde ela se encontra aderida às membranas. Há uma menor síntese de apoB-100 em camundongos e alta eficiência da apoE murina na remoção das lipoproteínas remanescentes, quando comparada à apoE humana (TANGIRALA et al., 1995; WOUTERS et al., 2005).

Camundongos e humanos possuem o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo das lipoproteínas, com exceção da presença de alguns polimorfismos, como no caso da apoE, onde são conhecidos 4 polimorfismos que geram mudanças estruturais para estas proteínas em humanos e o mesmo não acontece em camundongos (ARRIFANO et al., 2017).

O camundongo apoE $-/-$, apresenta elevação na concentração plasmática das lipoproteínas aterogênicas QM, VLDL e IDL, porque possuem a captação dos remanescentes severamente impactada pela ausência da apoE, que desempenha papel importante na interação com os receptores no fígado (BRESLOW, 1996). Há também elevação na concentração de LDL plasmático, uma vez que, há aumento da concentração de lipoproteínas anteriores à sequência de sua formação. No entanto, sua captação não é diretamente impactada, uma vez que quem participa da sinalização com o receptor de LDL (LDLr) nas células é a apoB-100 e não a apoE, que é ausente na partícula de LDL (GOTTO et al., 2011).

Em resposta a uma dieta normolipídica, os camundongos apoE $-/-$ desenvolvem espontaneamente hipercolesterolemia moderada e lesões brandas (BASU et al., 2018). A ingestão de dieta hiperlipídica, no entanto, leva-os ao desenvolvimento de hipercolesterolemia grave e lesões ateroscleróticas avançadas (FAZIO et al., 1997).

3 JUSTIFICATIVA

O mercúrio é um dos poluentes ambientais mais perigosos e, especialmente, as formas organometálicas, como o metilmercúrio, são altamente tóxicas para o ser humano, suas propriedades farmacocinéticas, lhe permitem atravessar qualquer barreira celular, ser rapidamente absorvido, amplamente distribuído e lentamente eliminado (CRESPO-LOPEZ et al, 2009).

As doenças cardiovasculares são atualmente, a principal causa de morte no mundo (WHO, 2013). Estudos prospectivos e de coorte, demonstram que a exposição humana a este composto, ainda que em baixas doses, é suficiente para provocar alterações do sistema cardiovascular, como o aumento do risco de hipertensão arterial, infarto do miocárdio e disfunção coronariana (ISLAM et al., 2016; WELLS et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

Os níveis de metilmercúrio que ameaçam de forma fatal a vida das pessoas e dos ecossistemas, têm aumentado consideravelmente no ambiente como resultado da crescente poluição devido aos usos industriais, e já são considerados altos em locais distantes de fontes

antrópicas de contaminação. No ambiente aquático, sobretudo, o metilmercúrio contamina os peixes, que representam uma das mais importantes fontes de proteína em todo o mundo, e no caso de algumas populações específicas, como as ribeirinhas, representa muitas vezes, a única fonte de proteína acessível (LIMA et al., 2015).

A literatura é diversa e centrada na dinâmica da geração e consumo do mercúrio e seus compostos derivados em diversas matrizes ambientais, com variabilidade de condições e objetivos de estudo, o que ainda revela dificuldade no entendimento das bases de sua toxicidade em relação à saúde humana.

Os mecanismos envolvidos na intoxicação mercurial e sua relação com as doenças cardiovasculares não estão esclarecidos. Estudos centrados na dinâmica do metilmercúrio e sua influência nos processos cardiovasculares, relatam correlações epidemiológicas e prospectivas, o que deixa as bases de sua toxicidade cardiovascular abertas a serem desvendadas.

Neste sentido, estudos que demonstrem fundamentos da atuação tóxica do metilmercúrio no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, que atualmente são a principal causa de óbito no mundo, ainda são escassos e tornam sua investigação necessária. O entendimento do papel do metilmercúrio no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, representa grandes ganhos no âmbito da saúde humana, uma vez que, esta patologia é causa comum entre doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da intoxicação mercurial no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, em camundongos modelo experimental de aterosclerose (APOE -/-) e selvagens (C57BL/6).

4.2 Objetivos específicos

- Promover a intoxicação dos animais por meio da ingestão de metilmercúrio ou não na água de beber e dieta normolipídica;

- Acelerar a formação de aterosclerose em animais selvagens ou susceptíveis à aterosclerose (APOE -/-) por meio de obstrução de carótida;
- Analisar as lesões formadas em sítios previamente estabelecidos (aorta e carótida);
- Avaliar o impacto da intoxicação no tônus vascular, metabolismo lipídico e enzimático;
- Quantificar a concentração de mercúrio presente no pelo destes animais e em outros órgãos-alvo;
- Conhecer o *status* inflamatório desses animais;
- Entender a participação do estresse oxidativo induzido pelo metilmercúrio no desenvolvimento e progressão da aterosclerose.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos, fêmeas C57BL/6 selvagens e APOE nocautes, com cerca de 18g de peso (entre 10 e 12 semanas de idade), provenientes do Biotério do ICB, foram distribuídos randomicamente nos grupos experimentais expostos ou não ao metilmercúrio, com dieta normolipídica (AIN-93M) e água *ad libitum*, alocados em gaiolas de polipropileno.

No dia anterior ao início da intoxicação, todos foram submetidos à pletismografia de cauda, e à cirurgia para obstrução da artéria carótida. No 14º dia, uma nova pletismografia de cauda era realizada, e no dia posterior (15º dia), realizou-se a microscopia de fluorescência intravital da veia mesentérica, seguida da eutanásia.

Após eutanásia, o sangue total, órgãos e tecidos foram recolhidos e armazenados a -80°C (*NuAire Ultralow freezer, EUA*), até a realização das análises, totalizando assim, 14 dias completos de intoxicação.

Toda a experimentação foi realizada em acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFGM), sob número de protocolo: 373/2016.

Tabela 1 - Grupos experimentais para avaliar o impacto da intoxicação mercurial em animais APOE -/- e controles selvagens).

Linhagem	Tratamento	Dieta	Denominação
C57BL/6	Água	AIN-93M	CT
C57BL/6	Metilmercúrio	AIN-93M	CTHg
APOE -/-	Água	AIN-93M	APO
APOE -/-	Metilmercúrio	AIN-93M	APOHg

5.2 Dieta AIN-93M

Todos os ingredientes da dieta foram pesados e misturados manualmente até que houvesse a formação de uma massa homogênea e consistente, a qual, foi modelada em *pellets* (pequenos cilindros de cerca de 25g) e armazenados em *freezer* -20°C, até o momento da oferta aos animais.

Tabela 2: Composição de 1kg de dieta padrão AIN-93M ofertada aos animais.

Composição	Peso
BHT ¹	0,008 g
Bitartarato de colina	2,50 g
Cistina (metionina)	1,80 g
Mix de vitaminas	10,00 g
Mix de minerais	35,00 g
Celulose	50,00 g
Óleo de soja	40,00 g
Sacarose	100,00 g
Maltodextrina	155,00 g
Caseína	140,00 g
Amido de milho	465,692 g
Água destilada	300,00 g

¹ BHT= Hidroxitolueno butilado.

5.3 Diluição do metilmercúrio

Para a realização da intoxicação, 20 mg de cloreto de metilmercúrio (*Sigma Aldrich, Merck, Missouri - USA*), foram pesados em balança analítica (*AUX 220, Shimadzu, Japão*) e diluídos em um litro de água potável. A solução foi estocada em frasco de vidro âmbar e mantida na geladeira (2 a 8°C), até o momento da oferta aos animais (DIETRICH et al., 2005).

5.4 Pletismografia de cauda

Os animais foram submetidos à medida de evolução da pressão arterial sistólica (PS), diastólica (PD) e média (PM), através de pletismógrafo automático (*CODA, Kent Scientific Corporation, EUA*), que consiste na alocação dos animais em um tubo cilíndrico de acrílico, onde são aquecidos através de uma manta térmica (37°C) e ventilados de forma adequada para a realização das medidas. Um manguito de borracha, que têm a função de inflar e desinflar automaticamente em cada intervalo fixo de 15 segundos, junto com um transdutor de pulso (sensor), eram acoplados em contato com a artéria caudal, o que permitiu a captação dos registros e envio ao sistema de computador. Todos os animais passaram por uma ambientação inicial, dias antes da primeira medida e em três ciclos experimentais antes das medidas do experimento, nos quais, as medidas não foram consideradas. Para as medidas registradas, foram realizados oito ciclos, dos quais, pelo menos seis foram considerados constituindo a média da pressão sistólica, pressão diastólica e pressão média para cada animal.

5.5 Cirurgia de obstrução de carótida

A obstrução da artéria carótida é um procedimento realizado *in vivo*, no qual, a interrupção do estresse de cisalhamento provoca lesão endotelial e acelera o desenvolvimento da aterosclerose. Semelhante ao método descrito por Nam e colaboradores, no dia anterior ao início da intoxicação, o procedimento se iniciou com a administração de anestesia com ketamina (60 a 80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) diluídas em solução salina tamponada (pH=7,0), intraperitonealmente, na dose de 0,1mL/10g animal, e a alocação dos animais em manta térmica regulada a 37 °C para garantir a homeostase da temperatura corporal.

Ao estarem anestesiados, um algodão úmido foi repousado sobre os olhos dos animais, a fim de evitar ressecamento ocular durante o procedimento, mantido até o fim da duração da anestesia, quando acordaram. Em seguida, os animais eram dispostos em decúbito dorsal, depilados na região do pescoço com creme depilatório e haste de algodão, onde foi realizada uma pequena incisão com auxílio de tesoura e pinça. A camada muscular foi deslocada cuidadosamente, de modo permitir a localização da artéria carótida esquerda. O fio cirúrgico (*Silkam 3/0, B.Braun, Alemanha*) foi cuidadosamente inserido por baixo da mesma e o nó cirúrgico realizado, o que caracterizou a obstrução total da artéria mencionada.

Finalmente, a camada muscular foi reposicionada e o animal suturado (*Nylon 6-0, Shalon, Brasil*). Esse tipo de procedimento não leva à isquemia cerebral nem morte de tecido nas regiões adjacentes, devido ao mecanismo compensatório realizado pela carótida direita e dos vasos responsáveis pela nutrição da parede arterial que continuam vivos e funcionais, tampouco ocorre perda de sangue, uma vez que a única incisão realizada ocorre na pele e a quantidade de sangue resultante é ínfima (NAM et al., 2010).

5.6 Consumo alimentar e hídrico

Para a quantificação do consumo alimentar, as dietas ofertadas foram pesadas semanalmente. O restante de dieta ofertada foi quantificado pela diferença entre dieta ofertada e o restante não consumido, que forneceu o consumo semanal de dieta em g/animal/dia.

5.7 Evolução ponderal

Os camundongos foram pesados semanalmente para acompanhamento da evolução ponderal. Os pesos finais e iniciais dos animais foram expressos em gramas.

5.8 Microscopia de fluorescência intravital da veia mesentérica

De forma semelhante ao procedimento descrito por Langrange e seus colaboradores (2018), anteriormente à realização da eutanásia os animais eram anestesiados e submetidos à microscopia de fluorescência intravital da veia mesentérica. Os animais eram mantidos em manta térmica regulada a 37°C durante a anestesia e a preparação do intestino, para garantir a homeostase da temperatura corporal. Em seguida, uma pequena incisão era realizada na região peritoneal para exposição das alças intestinais, que eram retiradas e afixadas em

grampos cirúrgicos, de forma que os vasos da microcirculação ficassem visíveis. Todos os animais receberam por via intravenosa uma injeção com 0,1 mL de Rodamina 6G (*Sigma Aldrich, EUA*), um marcador de mitocôndrias não tóxico (0,5 mg/mL), que permite a fluorescência dos leucócitos para sua visualização, e foram dispostos sob o microscópio (filtro 43 HE Ds *Red*) onde as capturas em vídeo por cerca de 10 minutos para cada animal, eram realizadas (LAGRANGE et al., 2018).

A contagem do número de células em rolamento e adesão se deu através da delimitação no programa *ZEN Blue*, de uma área retangular de 200 µm x 250 µm no vaso do animal e analisadas em triplicata para cada animal, no tempo de 1 minuto para cada contagem. Células foram consideradas em adesão quando paradas na área delimitada por tempo igual ou superior a 30 segundos. Os resultados foram expressos em número de células em rolamento ou número de células aderidas por minuto.

5.9 Eutanásia

Após a aquisição dos dados de microscopia de fluorescência intravital, os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação, sob administração de anestesia com ketamina (60 a 80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) intraperitonealmente na dose de 0,1mL/10g animal. O sangue total foi colhido e centrifugado por 10 min a 5.000 rpm para separação do soro que junto com os demais tecidos e órgãos foram armazenados a -80°C até a realização das análises.

5.10 Dosagem da concentração de mercúrio

Para mensurar a concentração de mercúrio no pelo e fígado, foi utilizado o aparelho DMA-80 (*Direct Mercury Analyzer, Milestone, Dinamarca*). O princípio do sistema de análise do aparelho, consiste na decomposição térmica da amostra a partir de um fluxo contínuo de oxigênio. Os produtos da combustão com o oxigênio, são conduzidos em alta temperatura a um catalisador que os aquece mais e conduz os vapores a um detector de ouro, que realiza a detecção do mercúrio volatilizado baseado na forte amálgama entre eles. Por fim, a amálgama é dessorvida por quantização e a concentração de mercúrio é determinada por espectrofotometria de absorção atômica a 254 nm (KIM et al., 2019). Os resultados são expressos em mg Hg/ kg amostra.

5.10.1 Pelos

Para mensurar a concentração de mercúrio nos pelos, estes foram recolhidos após eutanásia. Foram pesados entre 0,1-0,9 miligramas de amostra para os grupos intoxicados e entre 1-9 miligramas de amostra para os grupos não-intoxicados. As amostras foram colocadas em barcas de quartzo e introduzidas no aparelho. As medidas foram realizadas em triplicata para cada animal e os resultados expressos em mg Hg/kg amostra.

5.10.2 Fígado

De forma oposta ao pelo, o fígado possui alto teor de água em sua composição. Para as medidas de concentração hepática de mercúrio, cerca de 30 mg das amostras foram pesadas, homogeneizadas (*OMNI Tissue Homogenizer, Geórgia*) e liofilizadas (*SL-404/B, Solab Científica, Brasil*). Do conteúdo seco, foram pesados entre 0,1-0,9 mg de amostra para os grupos intoxicados e entre 1-9 mg de amostra para os grupos não-intoxicados. As amostras foram colocadas em barcas de quartzo e analisadas em triplicata para cada animal. Os resultados são expressos em mg Hg/kg amostra.

5.11 Dosagens séricas

5.11.1 Glicemia

Para dosagem dos níveis plasmáticos de glicose, as amostras foram colhidas após 8 horas de jejum dos animais, utilizando o fluoreto como anticoagulante e o *kit* diagnóstico para glicose (*Labtest, Brasil*). As amostras foram testadas em duplicata, de acordo com as instruções do fabricante. A dosagem se baseia na oxidação da glicose a ácido glucônico, pela ação da glicose oxidase, com liberação de peróxido de hidrogênio, que, por ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz uma antipirilquinonimina de coloração rosa que possui absorbância a 505 nm proporcional a concentração de glicose presente na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL de glicose.

5.11.2 Triglicerídeos

A determinação dos níveis de triglicerídeos foi realizada utilizando *kit* diagnóstico (*Labtest, Brasil*), que consiste na hidrólise de triacilgliceróis do soro pela lipase lipoprotéica que produz glicerol livre, o qual, é fosforilado, pela enzima glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da enzima glicerol fosfato, que, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob ação da enzima peroxidase em presença de um reagente fenólico (4-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto rosa, com absorção a 510nm. Os resultados foram expressos em mg/dL de triglicerídeos.

5.11.3 Colesterol total

Para dosagem dos níveis de colesterol das amostras sorológicas, foi utilizado um *kit* diagnóstico para colesterol (*Labtest, Brasil*), onde, a hidrólise de ésteres de colesterol pela enzima colesterol esterase produz colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre, na presença da enzima colesterol oxidase e do oxigênio, é oxidado a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio que pela ação da enzima peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz antopirilquinonimina, que possui cor rosa e absorção em 492 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL de colesterol.

5.11.4 Colesterol não-HDL

Para obtenção da fração aterogênica (não-HDL), foi subtraído o valor em mg/dL do colesterol HDL dos níveis em mg/dL de colesterol total. Os resultados foram expressos em mg/dL de colesterol não-HDL.

5.11.5 HDL

As concentrações de HDL no soro foram obtidas por meio de *kit* enzimático (*Labtest, Brasil*), cujo princípio se baseia na precipitação seletiva e quantitativa das lipoproteínas LDL e VLDL pelo ácido fosfotúgnistico e cloreto de magnésio. As amostras foram testadas em duplicata, e de acordo com as instruções do fabricante. O soro foi centrifugado (12.000rpm por 5 minutos), e o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL), determinado

no sobrenadante. Através de um reagente de cor que se liga à molécula de HDL, a reação gera um composto amarelo com absorbância em 492 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL de HDL.

5.11.6 Atividade da enzima paraoxonase (PON)

A dosagem de sua atividade se baseia na metodologia descrita por Richter e colaboradores (2009), onde a hidrólise de seu substrato sintético, o paraoxon (*Sigma Aldrich, EUA*), libera *p*-nitrofenol, que gera uma cor amarela, que pode ser quantificada espectrofotometricamente a 405 nm. A atividade da PON sérica é calculada a partir do coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{405} = 17000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) do *p*-nitrofenol formado (RICHTER et al., 2009). Uma unidade de PON (U) é definida como 1 nmol de *p*-nitrofenol formado por minuto. Os resultados da atividade enzimática foram expressos como unidade da enzima/mL de soro/min.

5.12 Função hepática

5.12.1 Atividade de aspartato aminotransferase (AST)

A dosagem da atividade de AST foi realizada por kit diagnóstico (*Labtest, Brasil*), de acordo com as instruções do fabricante. A atividade enzimática de transaminase, isto é, na catálise da transferência de um grupo amino de um α -aminoácido para um α -cetoácido, que a enzima exerce. Assim, o oxalacetato presente na amostra sérica, reage com a dinitrofenilhidrazina, formando hidrazona em meio alcalino, um composto de cor amarela, com absorbância em 505 nm, diretamente proporcional à quantidade de oxalacetato presente na amostra. que em determinado tempo se traduz na atividade enzimática da transaminase. Os resultados foram expressos em unidades/mL de AST.

5.12.2 Atividade de alanina aminotransferase (ALT)

A dosagem da atividade de ALT foi realizada por *kit* diagnóstico (*Labtest, Brasil*), baseada nas instruções do fabricante e no fato de que a ALT catalisa a transferência do grupo

amino da alanina para o α -cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da enzima lactato desidrogenase, produzindo cor amarela, enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A atividade enzimática da ALT na amostra é calculada de forma diretamente proporcional à absorbância em 505 nm. Os resultados foram expressos em unidades/mL de ALT.

5.12.3 Atividade de γ -glutamyltransferase (γ -GT)

A dosagem da atividade de γ -GT foi realizada por *kit* diagnóstico (*Labtest, Brasil*), baseada no fato de que esta enzima transfere um grupamento glutamyl da γ -glutamyl *p*-nitroanilida para a glicilglicina, que por sua vez gera cor amarela que pode ser quantificada por possuir absorbância em 405 nm. A absorção da *p*-nitroanilina formada é proporcional à atividade da γ -GT na amostra. Os resultados foram expressos em unidades/L de γ -GT.

5.13 Dosagem de lipídios hepáticos por FOLCH

A extração de lipídios hepáticos se baseia na apolaridade dos lipídios e sua consequente solubilidade em solventes orgânicos, descrito por Folch e colaboradores (1957), em duas etapas. Na primeira etapa, os lipídios foram extraídos por homogeneização de 100 mg de tecido hepático com clorofórmio e metanol para obtenção de um homogenato. Este, foi centrifugado e o sobrenadante onde o conteúdo lipídico estava concentrado foi recolhido.

Na segunda etapa, o concentrado recolhido, que continha lipídios teciduais acompanhados de substâncias não lipídicas, foi separado dessas substâncias excipientes pela lavagem sucessiva com solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl 0,2%). Essa lavagem com solução contendo água, implicou na perda de substâncias não lipídicas. O conteúdo final obtido foi seco em estufa a 37°C *overnight* para evaporação dos solventes orgânicos. A massa seca restante é pesada e representa a quantidade de lipídios extraídos em gramas. Essa massa foi ressuspendida com diluição de 1:50 em isopropanol e as dosagens de triglicerídeos e colesterol total foram realizadas conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em gramas de lipídios extraídos por gramas de tecido, para o peso final dos lipídios e em mg/g tecido para triglicerídeos e colesterol total (FOLCH et al., 1957).

5.14 Avaliação do estresse oxidativo hepático

5.14.1 Determinação da concentração proteica

Para determinação da concentração de proteína presente nas amostras hepáticas, a dosagem de proteínas foi realizada em acordo com metodologia descrita por Lowry e colaboradores (1951), utilizando sulfato de cobre, tartarato de sódio e potássio, carbonato de sódio, reagente Folin-Ciocalteu (*Dinâmica, Brasil*) e albumina como padrão (LOWRY et al., 1951).

5.14.2 Atividade de superóxido dismutase

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em reagir com o ânion superóxido (O_2^-) e reduzi-lo a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água. Assim, a SOD é capaz de diminuir a auto-oxidação do pirogalol, presente no meio de reação, conforme descrito por Dieterich e colaboradores em (2000). A técnica consiste em homogeneizar o tecido hepático em tampão fostafo e acrescentar pirogalol e o agente oxidante MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium). A reação pode ser determinada espectrofotometricamente por absorbância a 570 nm. Para o cálculo do resultado foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a auto-oxidação de 50% de pirogalol do padrão. O resultado foi expresso em unidades de SOD por mg de proteína (U/mg proteínas).

5.14.3 Hidroperóxidos totais

A dosagem de hidroperóxidos totais presentes nas amostras hepáticas, consiste basicamente na oxidação de íons ferroso (Fe^{+2}) à íons férricos (Fe^{+3}) sob condições ácidas, pelos hidroperóxidos, conforme descrito por Barnejee e colaboradores (2003). O indicador utilizado é o xilenol orange, que se liga aos íons férricos produzindo um cromóforo com tonalidade entre o azul e roxo, que pode ser determinado espectrofotometricamente porque absorve em 560 nm e tem coeficiente de extinção molar ($1,5 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ à 560nm) conhecido (BANERJEE et al., 2003). Os resultados foram expressos em μmol de hidroperóxidos por mg de proteína.

5.15 Lesão aterosclerótica

5.15.1 Aorta

Para avaliação da deposição lipídica, cada aorta foi cuidadosamente retirada, dissecada removendo toda a adventícia a partir da válvula aórtica e na aorta descendente em sua porção torácica e, em seguida, armazenada em tampão fosfato-salino (PBS) para quantificação da placa através da coloração em Sudan IV, conforme descrito por Tangirala e colaboradores (1995).

Para a coloração, as aortas foram submetidas a uma solução de 70% de etanol durante cinco minutos para desidratação e, posteriormente, coradas por 10 minutos sob agitação em uma solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol, e 50% de acetona. Em seguida, as aortas foram descoradas por cinco minutos em solução de etanol 80%, de maneira que apenas as placas de gordura permanecem coradas, devido à afinidade do Sudan IV por lipídios (TANGIRALA et al., 1995).

As imagens das aortas após o protocolo de coloração foram capturadas por *scanner* e digitalizadas em computador. O programa analisador de imagens Image-Pro Plus 6.3 (*Image-Pro Plus Software, EUA*), foi utilizado. O cálculo das lesões nas aortas foi realizado considerando a porcentagem da lesão em relação à área total da aorta e expressos em porcentagem de área acometida por lesão aterosclerótica.

5.15.2 Carótida

As carótidas direita e esquerda (obstruídas) foram retiradas e incluídas em *Tissue Freezing Medium (Thermo Fisher Scientific, EUA)* e mantidas em freezer -80°C até a realização dos cortes. As carótidas foram cortadas no criostato (*CM3050S, Leica, Alemanha*), presente no CAPI-UFMG, em secções de 10µm e fixadas em lâminas silanizadas. Cada lâmina foi montada com pelo menos 8 cortes. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), onde a hematoxilina por ser basófila cora o núcleo ácido das células de azul-roxo e a eosina acidófila, cora o citoplasma das células de rosa-avermelhado.

Para captura das imagens e análise das lesões, utilizou-se microscópio óptico (*Eclipse E200, Nikon, Japão*), uma câmera (*Moticam 2300, Motic, China*) acoplada à lente ocular do mesmo e o software Image-Pro Plus 6.3. Para isso, foram selecionados pelo menos 3 cortes de

cada carótida, onde a média dos parâmetros da área total de lesão (μm^2), porcentagem de estenose (% de área acometida por lesão em relação à área total) e espessura da camada íntima-média arterial (μm) foram mensurados. A área de estenose foi calculada como descrito por Fox (1993), empregando-se a fórmula $= [(1-N/D) * 100]$, onde N é a área desobstruída e D é o diâmetro total do vaso (FOX, 1993).

5.16 Análises Estatísticas

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do software *GraphPad Prism versão 8.0* (GraphPad Software, EUA). Para a detecção de *outliers* foi realizado o teste de *Grubbs*. Os resultados foram submetidos à análise de variância de duas vias (2-way ANOVA), onde se considerou o tratamento (metilmercúrio ou não) e linhagem (C57BL/6 ou APOE -/-), como fatores de origem da variação. O *post-hoc* de *Bonferroni*, foi aplicado. Interações importantes entre conjuntos de dados não identificadas por 2-way ANOVA foram analisadas quanto à normalidade por teste de *D'Agostino e Pearson*, sendo, posteriormente, os paramétricos submetidos ao teste T de *Student*, e os não paramétricos ao teste de *Mann-Whitney*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Consumo hídrico, consumo alimentar e evolução ponderal

Para avaliar a ingestão hídrica dos animais, e consequentemente o consumo de metilmercúrio entre os grupos intoxicados, o consumo semanal foi acompanhado e a média de consumo diária foi calculada. Os animais do grupo CTHg obtiveram média de ingestão hídrica de 3,0 mL o que leva à ingestão de 3,43 mg meHg/dia/kg peso. Os animais do grupo APOHg obtiveram média de ingestão hídrica de 2,8 mL que leva à ingestão de 3,11 mg meHg/dia/kg peso. Não houve diferença no consumo em nenhum dos grupos experimentais, indicando que o consumo hídrico, ou seja, o consumo entre os grupos intoxicados e não intoxicados, bem como entre linhagens selvagem e noucate, foram equivalentes (Tabela 3).

Para avaliar a ingestão alimentar dos animais, o consumo diário por animal foi acompanhado. Não houve diferença no consumo em nenhum dos grupos experimentais, indicando que a ingestão da dieta AIN-93M foi equivalente (Tabela 3).

Ao início do experimento, o peso dos animais nos grupos experimentais era equivalente e ao fim do experimento, sem diferença no consumo hídrico e alimentar entre os grupos experimentais, seus pesos também foram equivalentes (Tabela 3).

Tabela 3 – Consumo hídrico, consumo alimentar e evolução ponderal dos grupos experimentais.

	CT	CTHg	APO	APOHg
Consumo hídrico (g/animal/dia)	2,90±0,38	3,09±0,39	2,96±0,48	2,83±0,17
Consumo alimentar (g/animal/dia)	2,78±0,06	2,73±0,08	2,75±0,12	2,61±0,14
Peso inicial (g)	18,30±1,22	18,92±1,16	18,47±1,61	18,27±1,04
Peso final (g)	18,48±1,27	18,27±0,79	17,81±1,71	17,92±0,65

Dados apresentados como Média ± SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni. CT n= 15; CTHg n= 16; APO n=16; APOHg n=15.

6.2 Dosagem da concentração de mercúrio

Para confirmar se a intoxicação havia ocorrido, a concentração de mercúrio no pelo dos animais foi avaliada (Figura 1A). A média da concentração nos pelos dos grupos CTHg e APOHg (12 mg Hg/kg), foi cerca de 75 vezes maior que nos respectivos controles não-intoxicados (0,2 mg Hg/kg) (Figura 1A).

Posteriormente, para verificar se o metilmercúrio exercia deposição significativa em outros tecidos além do pelo, a concentração presente no fígado dos animais foi avaliada. A média no fígado dos grupos intoxicados (75 mg Hg/kg), foi cerca de 375 vezes maior que em seus respectivos controles não-intoxicados (0,25 mg Hg/kg) (Figura 1B).

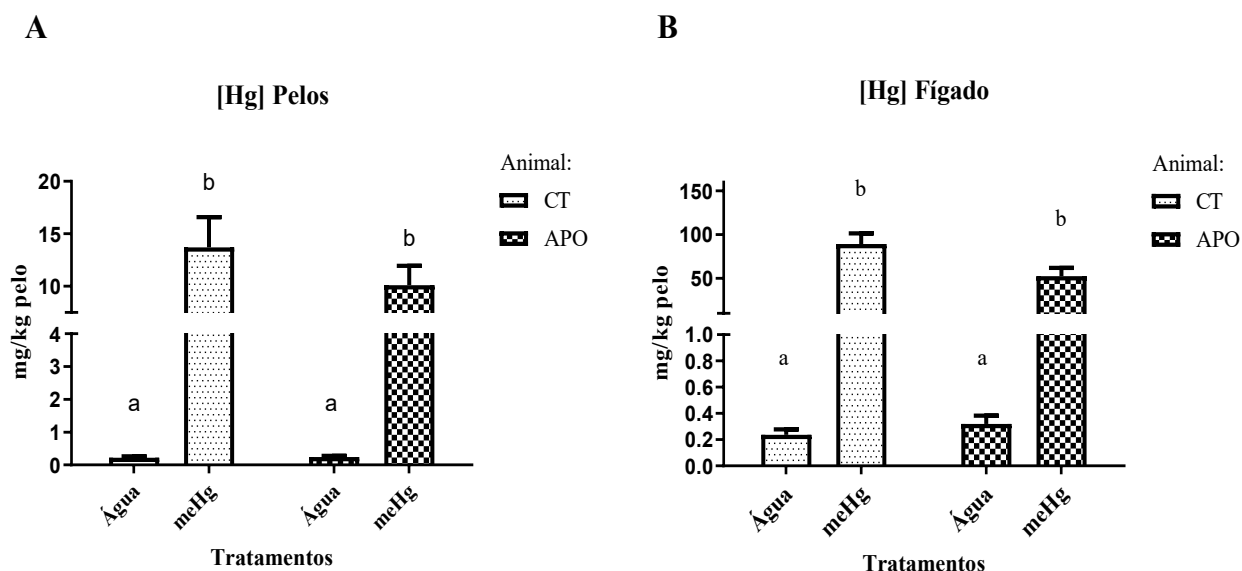


Figura 1 – Concentração de mercúrio presente no pelo (A) e no fígado (B) dos animais. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA, *post-hoc* de *Bonferroni*. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a* e *b* representam diferenças estatísticas entre os grupos. (A) CT $n = 7$; CTHg $n = 9$; APO $n = 12$; APOHg $n = 12$. (B) CT $n = 10$; CTHg $n = 12$; APO $n = 9$; APOHg $n = 10$.

6.3 Função hepática

Após confirmar que o metilmercúrio exercia deposição significativa no fígado (Figura 1B), medidas da atividade de enzimas relacionadas à função hepática foram realizadas.

O metilmercúrio não exerceu efeito sobre a atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST). No entanto, animais APOE -/- obtiveram maiores níveis séricos da enzima (Figura 2A).

Assim como na atividade de AST (Figura 2A), não houve efeito da intoxicação sobre a atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT), nos grupos experimentais. No entanto, houve diferença entre linhagens, e os animais APOE -/- obtiveram maiores níveis séricos da enzima (Figura 2B).

De forma análoga observada na atividade de AST e ALT (Figuras 2A e 2B), o metilmercúrio não exerceu efeito sobre a atividade da enzima γ -glutamyl transferase. Efeitos entre linhagens, não foram observados (Figura 2C).

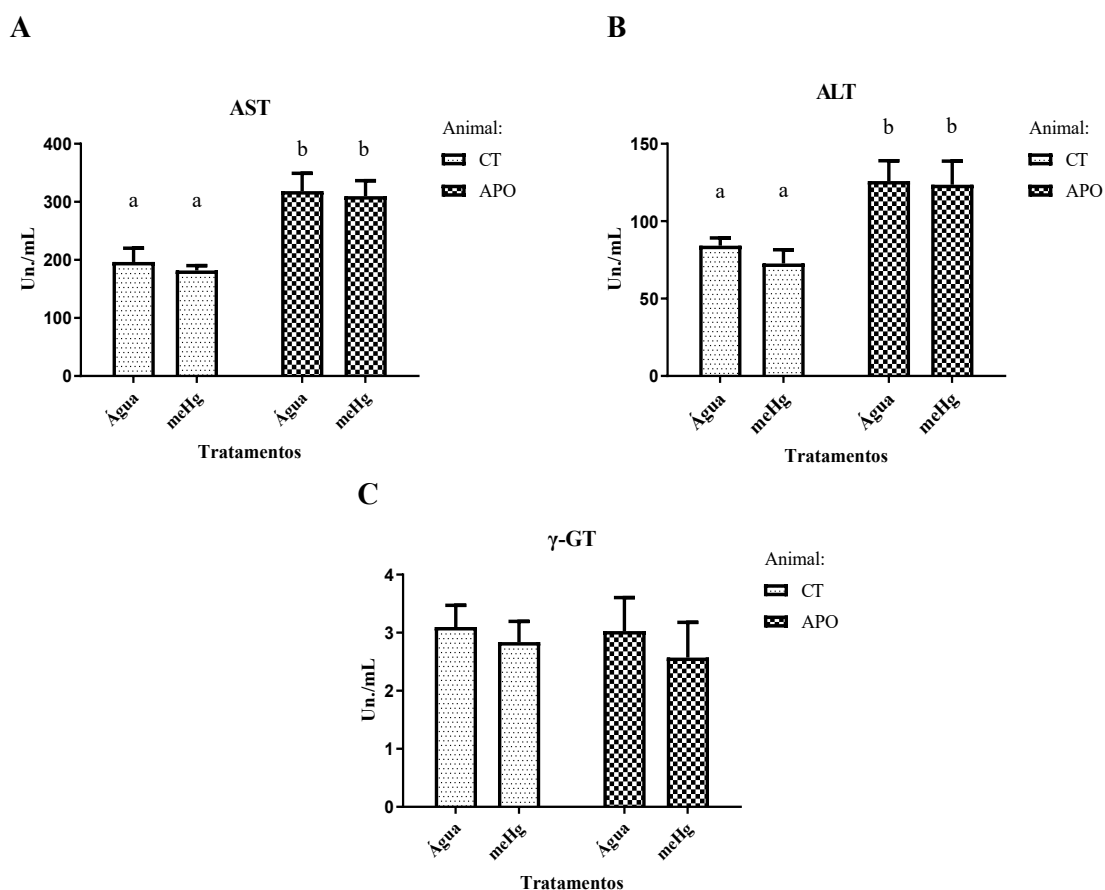


Figura 2 – Atividade de enzimas relacionadas à função hepática. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA, *post-hoc* de *Bonferroni*. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a* e *b* representam diferenças estatísticas entre os grupos. (A) Atividade de aspartato aminotransferase sérica nos grupos experimentais. CT $n = 7$; CTHg $n = 8$; APO $n = 5$; APOHg $n = 6$. (B) Atividade de alanina aminotransferase sérica. CT $n = 6$; CT $n = 10$; CTHg $n = 11$; APO $n = 7$; APOHg $n = 7$.

6.4 Pressão arterial

Para avaliar a influência do metilmercúrio em fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose, a pressão arterial dos grupos experimentais foi mensurada ao início e ao fim do experimento.

Ao início do experimento, os grupos experimentais apresentavam valores equivalentes para a pressão sistólica, diastólica e média. Ao fim do protocolo experimental, a intoxicação pelo metilmercúrio foi capaz de elevar a pressão arterial sistólica, diastólica e média dos grupos experimentais que o receberam (CTHg e APOHg), em relação aos seus respectivos controles não-intoxicados (CT e APO). Diferenças entre linhagens diferentes com o mesmo tratamento, não foram observadas (Figura 3A, B e C).

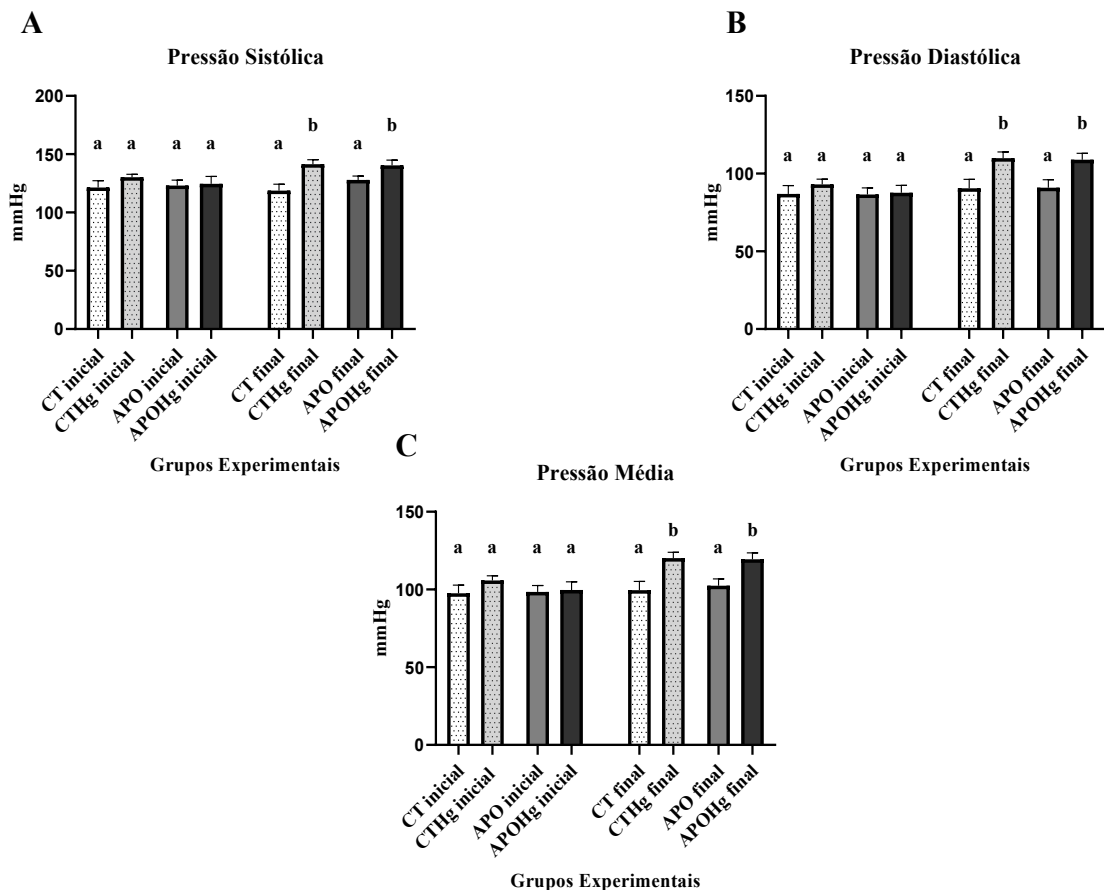


Figura 3 – Pressão arterial sistólica, diastólica e média avaliada inicialmente e ao fim do protocolo experimental. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a* e *b* representam diferenças estatísticas entre os grupos. CT $n = 12$; CTHg $n = 13$; APO $n = 12$; APOHg $n = 12$. (A) Pressão arterial sistólica. (B) Pressão arterial diastólica. (C) Pressão arterial média.

6.5 Perfil lipídico

6.5.1 Glicemia e triglicerídeos

O metilmercúrio não exerceu efeito sobre a glicemia e triglicerídeos dos animais. No entanto, animais APOE $-/-$ apresentaram maiores níveis de ambos, em relação aos animais selvagens (Figura 4 A e B).

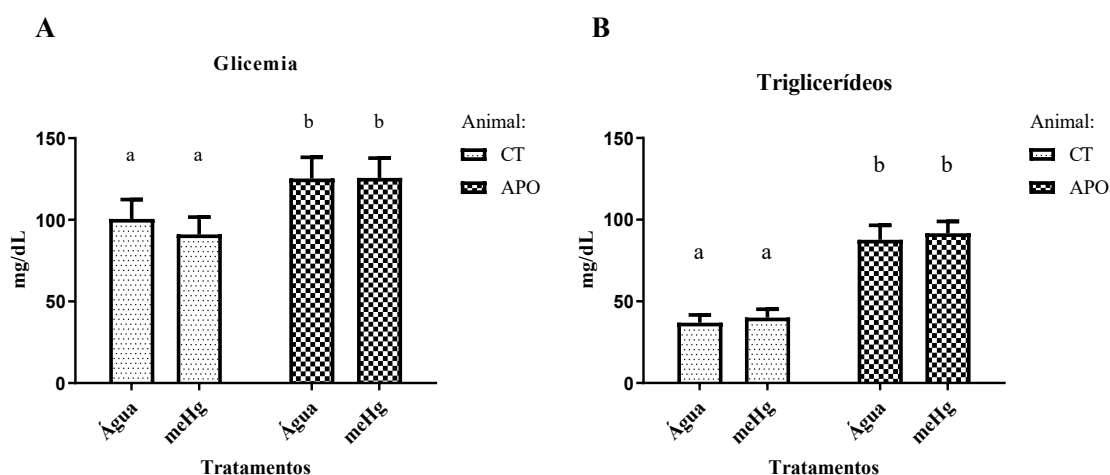


Figura 4 – Níveis de glicemia e triglicerídeos dos grupos experimentais. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA, *post-hoc* de *Bonferroni*. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a* e *b* representam diferenças estatísticas entre os grupos. (A) Glicemia. CT $n = 12$; CTHg $n = 13$; APO $n = 10$; APOHg $n = 10$. (B) Níveis de triglicerídeos. CT $n = 12$; CTHg $n = 13$; APO $n = 9$; APOHg $n = 10$.

6.5.2 Colesterol

A intoxicação com metilmercúrio exerceu efeitos sobre os níveis séricos de colesterol total e não-HDL, ou seja, especificamente da fração aterogênica. Animais APOE $-/-$ apresentaram maiores níveis séricos de colesterol total e não-HDL em relação aos animais selvagens, porém, o metilmercúrio foi capaz de exercer aumento destes níveis nas duas linhagens experimentais (Figura 5A e B).

De forma oposta ao colesterol total, o metilmercúrio não exerceu efeito sobre os níveis séricos de HDL, que é a fração anti-aterogênica. Não houve diferença entre os grupos

experimentais em relação aos níveis de HDL (Figura 5C), e em relação à atividade da enzima paraoxonase. No entanto, os animais APOE $-/-$ apresentaram menores níveis de atividade enzimática (Figura 5D).

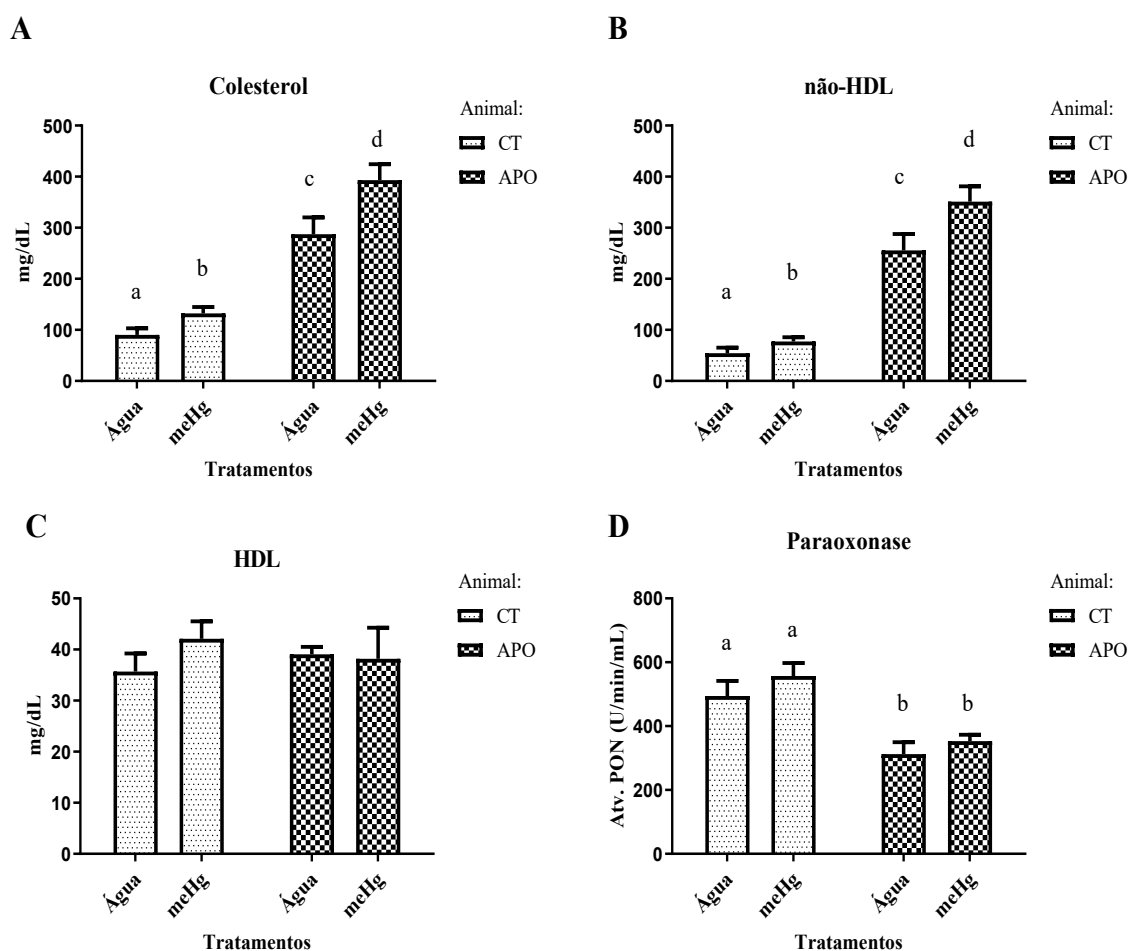


Figura 5 – Níveis de colesterol total, fração não-HDL, HDL e atividade sérica de paraoxonase entre os grupos experimentais. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a*, *b*, *c* e *d* representam diferenças estatísticas entre os grupos. (A), (B) e (C) CT $n = 12$; CTHg $n = 13$; APO $n = 8$; APOHg $n = 8$. (D) CT $n = 8$; CTHg $n = 10$; APO $n = 6$; APOHg $n = 7$.

6.6 Lipídios hepáticos

O metilmercúrio não exerceu efeito sobre o peso de lipídios presentes no fígado do grupo selvagem intoxicado. No entanto, por teste T de *Student*, é possível observar que nos

animais APOE $-/-$ intoxicados (APOHg), houve redução do peso de lipídios extraídos em relação ao seu respectivo controle (APO). De forma geral, animais APOE $-/-$ apresentaram maior peso de lipídios extraídos em relação a linhagem selvagem (Figura 6A).

O metilmercúrio exerceu efeitos opostos entre as linhagens em relação aos níveis de colesterol e triglicerídeos. Nos animais selvagens é possível observar aumento da concentração de colesterol e triglicerídeos hepáticos (Figura 6B e C), sem alteração no peso do conteúdo extraído (Figura 6A). Para os animais APOE $-/-$ houve diminuição no peso do conteúdo lipídico hepático extraído (Figura 6A), e consequente diminuição de concentração de colesterol e triglicerídeos hepáticos (Figura 6B e C).

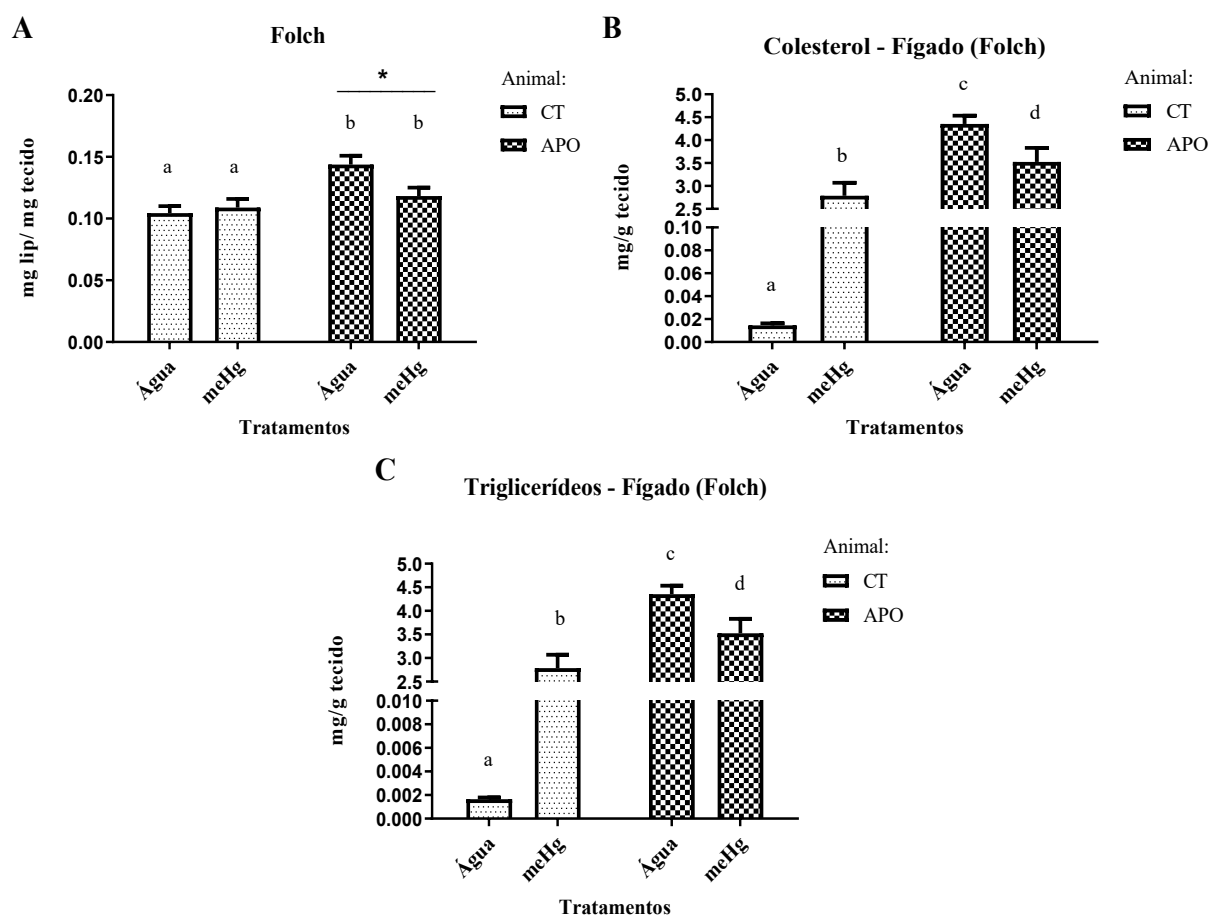


Figura 6 – Conteúdo de lipídios hepáticos extraídos e níveis de colesterol e triglicerídeos presentes. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA com *post-hoc* de *Bonferroni*. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a* e *b* representam diferenças estatísticas entre os grupos obtidas por 2-way ANOVA e * representa a diferença apontada por teste T de *Student*. (A), (B) e (C) CT $n = 9$; CTHg $n = 11$; APO $n = 9$; APOHg $n = 11$.

6.7 Avaliação do estresse oxidativo

O metilmercúrio não exerceu efeito sobre a atividade da enzima superóxido dismutase, no entanto, animais APOE $-/-$ apresentaram maiores níveis de atividade da enzima em relação à linhagem selvagem (Figura 7^a).

A intoxicação foi capaz de provocar aumento da produção de hidroperóxidos totais em nenhuma das linhagens experimentais. Animais APOE $-/-$ apresentaram menores níveis de hidroperóxidos em relação à linhagem selvagem (Figura 7B).

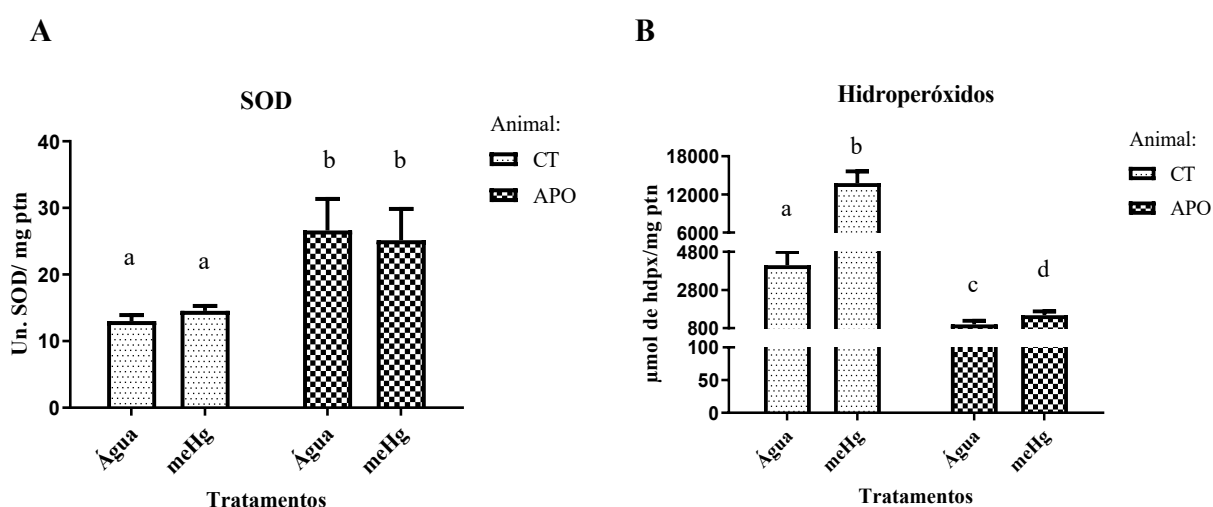


Figura 7 – (A) Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD). (B) Níveis de hidroperóxidos totais. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a* e *b* representam diferenças estatísticas entre os grupos. (A) e (B) CT $n = 12$; CTHg $n = 13$; APO $n = 12$; APOHg $n = 12$.

6.8 Microscopia de fluorescência intravital da veia mesentérica

A intoxicação por metilmercúrio foi capaz de provocar aumento de leucócitos em rolamento e adesão na veia mesentérica em ambos os grupos experimentais. Animais APOE $-/-$ apresentaram maior número de células nos dois processos quando comparados à linhagem selvagem (Figura 8A e B).

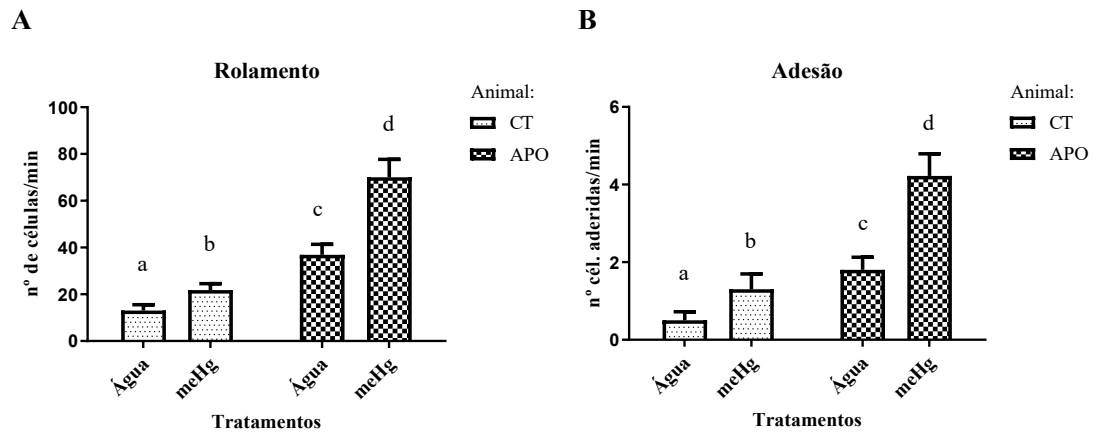


Figura 8 – (A) Número de leucócitos em rolamento na veia mesentérica dos grupos experimentais. (B) Número de leucócitos em adesão. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a*, *b*, *c* e *d* representam diferenças estatísticas entre os grupos. CT $n = 10$; CTHg $n = 10$; APO $n = 9$; APOHg $n = 10$.

A Figura 9, da microscopia de fluorescência intravital realizada na veia mesentérica dos grupos experimentais, ilustra os resultados observados nas Figuras 8A e B, onde é possível observar o aumento sucessivo de células fluorescentes (em vermelho) presentes na luz do vaso.

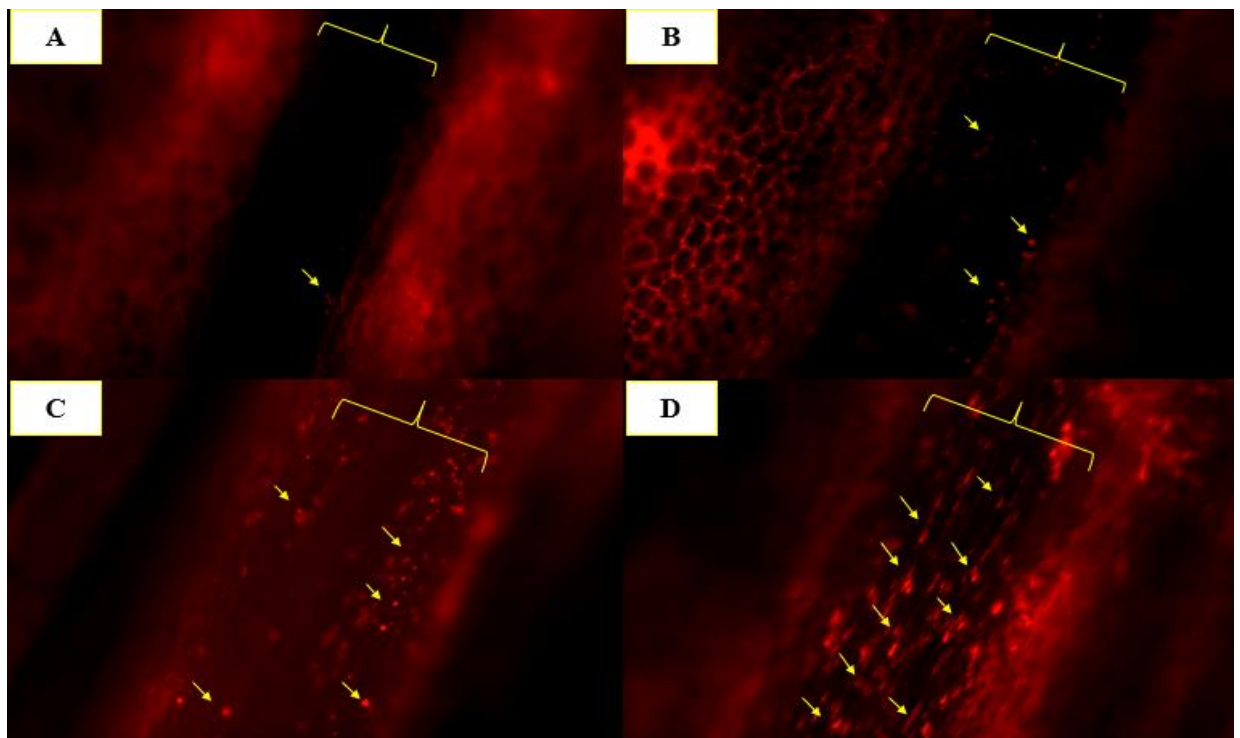


Figura 9 – Microscopia de fluorescência intravital da veia mesentérica dos grupos experimentais. Linhas em amarelo delimitam a luz do vaso, setas em amarelo demonstram leucócitos presentes. A = CT; B = CTHg; C = APO e D = APOHg.

6.9 Lesão aterosclerótica na aorta

A intoxicação por metilmercúrio foi capaz de provocar o aumento da porcentagem de área acometida por lesão aterosclerótica nos animais APOE $-/-$ e induzir o surgimento de lesão no arco, que é a região mais propensa, e na porção torácica da aorta dos animais selvagens (Figura 10A).

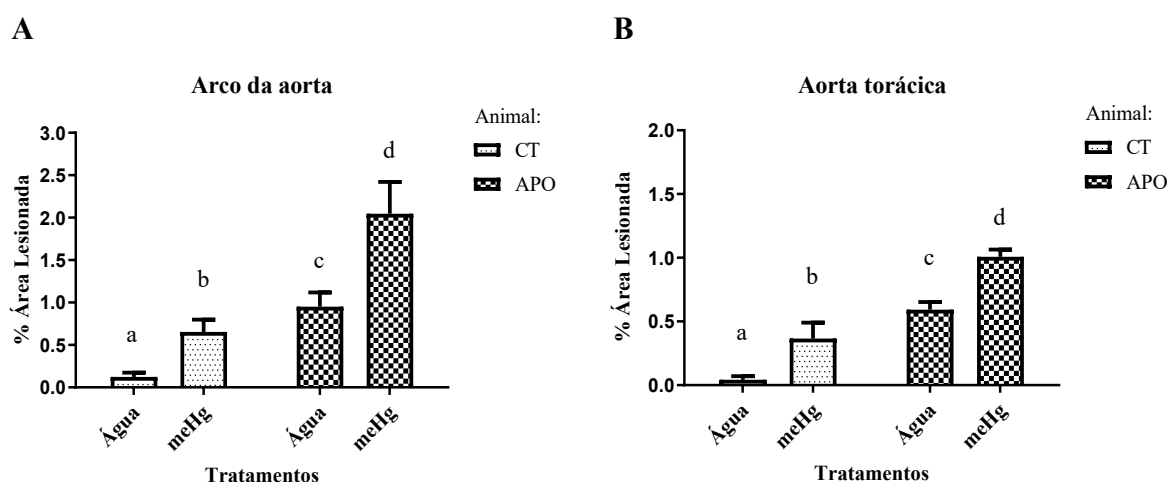


Figura 10 – (A) Porcentagem de área do arco da aorta acometida por lesão aterosclerótica nos grupos experimentais. (B) Área da aorta torácica. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a*, *b*, *c* e *d* representam diferenças estatísticas entre os grupos. CT $n = 8$; CTHg $n = 10$; APO $n = 12$; APOHg $n = 12$.

A Figura 11, mostra as lesões ateroscleróticas presentes nas aortas, no arco e porção torácica da aorta descendente. De forma representativa aos resultados observados nas Figuras 10A e B, é possível observar o aumento sucessivo das lesões presentes.

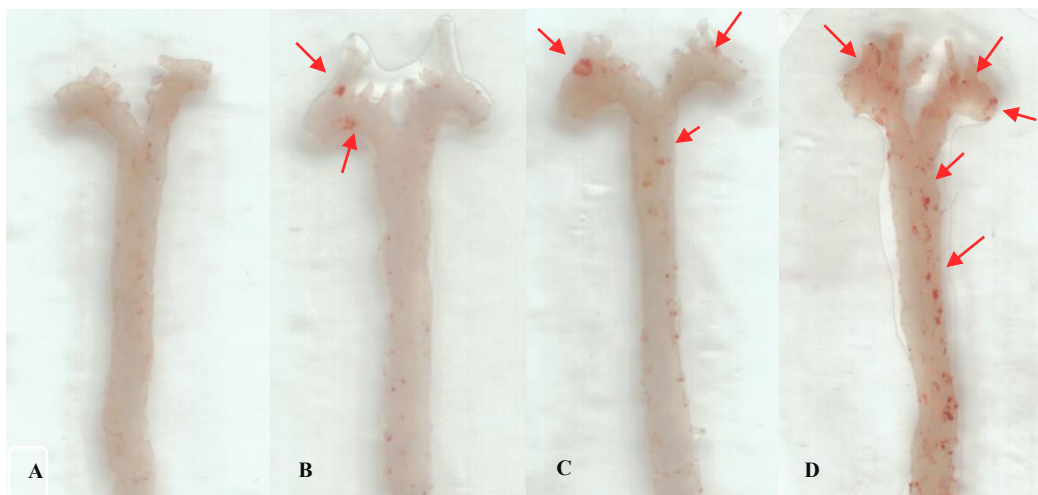


Figura 11 – Lesões ateroscleróticas nas aortas dos grupos experimentais. A = CT; B = CTHg; C = APO e D = APOHg. Setas em vermelho indicam pontos de lesão.

6.10 Lesão aterosclerótica na carótida

Assim como observado na aorta (Figuras 10A e B), o metilmercúrio foi capaz de aumentar a área de lesão aterosclerótica na carótida dos animais APOE $-/-$ e provocar o aparecimento de lesão nos animais selvagens (Figura 12A).

O metilmercúrio exerceu efeitos semelhantes em relação à estenose nos grupos experimentais, provocando o aumento da porcentagem de estenose nos dois grupos intoxicados em relação a seus respectivos controles não-intoxicados. Animais APOE $-/-$ apresentaram maior porcentagem de estenose em relação à linhagem selvagem (Figura 12B).

O processo de aterosclerose induzido pelo metilmercúrio não foi capaz de alterar parâmetros como a espessura da camada média, que foi equivalente entre os grupos experimentais (Figura 12C).

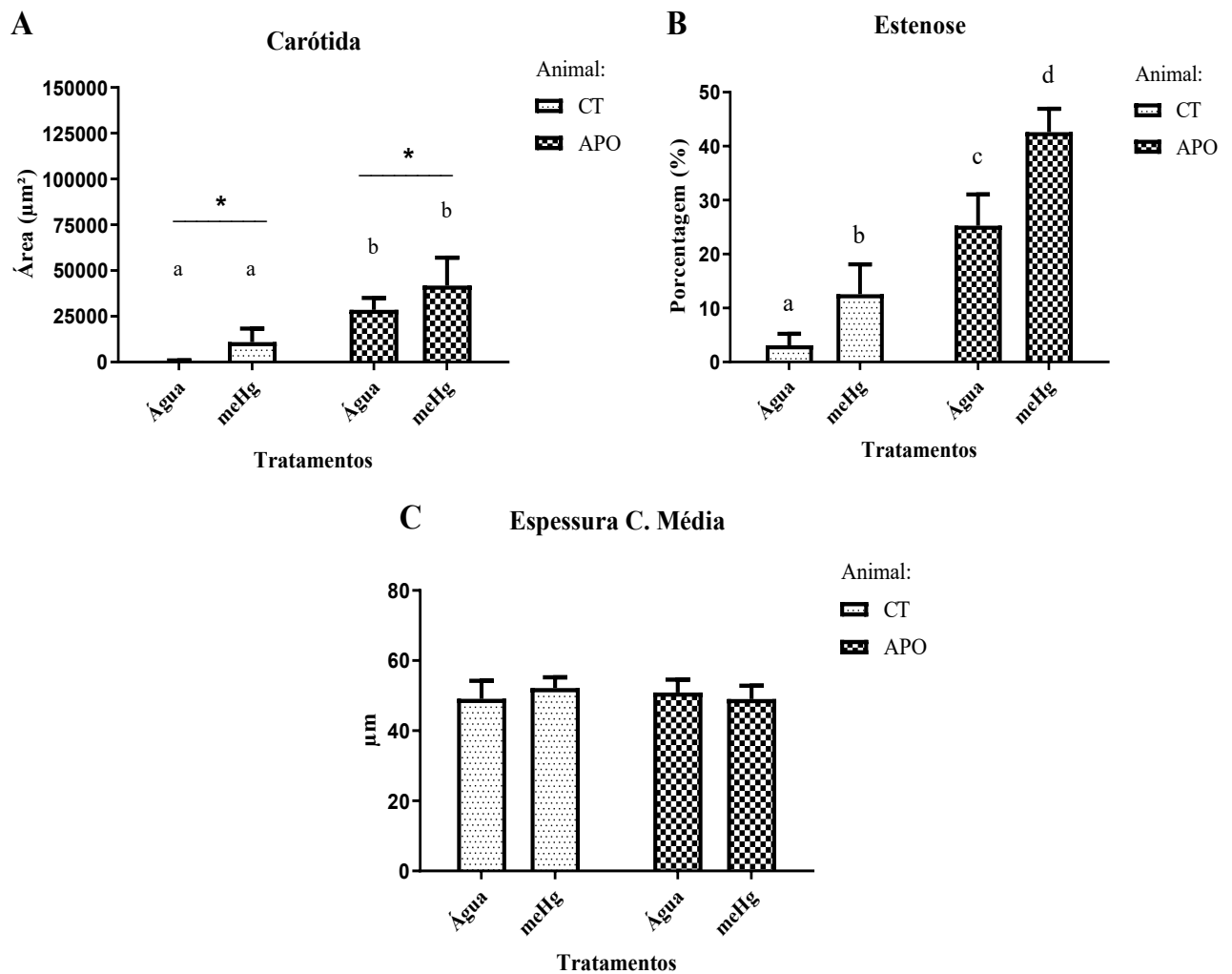


Figura 12 – (A) Área de lesão aterosclerótica na carótida dos grupos experimentais. (B) Porcentagem de estenose. (C) Espessura da camada média. Dados apresentados como Média $\pm$ SEM. Comparação entre grupos realizada por 2-way ANOVA com *post-hoc* de *Bonferroni*. Diferenças consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As letras *a* e *b* representam diferenças estatísticas entre os grupos obtidas por 2-way ANOVA e * representa a diferença apontada via teste T de *Student*. CT $n = 10$; CTHg $n = 10$; APO $n = 11$; APOHg $n = 12$.

A Figura 13, mostra as lesões ateroscleróticas (indicadas pelas setas em vermelho), desenvolvidas nas carótidas dos grupos experimentais. De forma representativa aos resultados observados nas Figuras 12A, B e C, é possível observar o aumento sucessivo das lesões e da estenose desenvolvida.

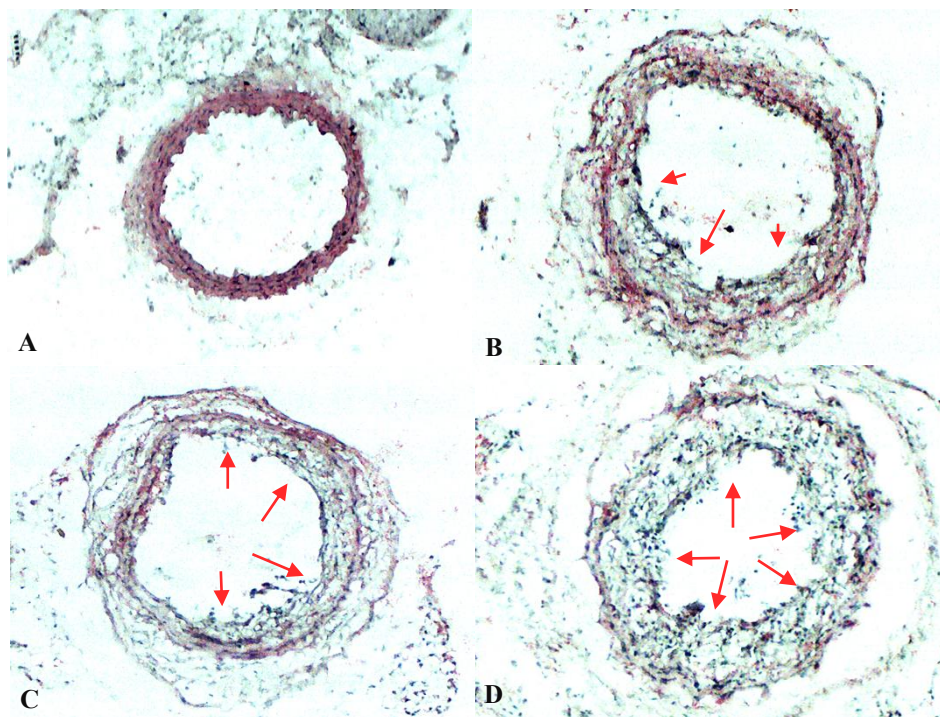


Figura 13 – Lesões ateroscleróticas nas carótidas dos grupos experimentais. A = CT; B = CTHg; C = APO e D = APOHg. Setas em vermelho indicam pontos de lesão.

7 DISCUSSÃO

O metilmercúrio é o composto mais tóxico entre todas as formas de mercúrio, devido sua rápida absorção, ampla biodistribuição entre os tecidos e lenta eliminação (RUMBOLD et al., 2018). Neste estudo, sua toxicidade foi avaliada em relação ao desenvolvimento da aterosclerose em camundongos suscetíveis (APOE -/-) e camundongos resistentes ao seu desenvolvimento (C57BL/6).

Uma vez no organismo, seu principal mecanismo de ação é através do aumento do estresse oxidativo, por induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou inibir a atividade de enzimas antioxidantes (CLARKSON & MAGOS, 2006). O estresse oxidativo desempenha funções importantes na patogênese da aterosclerose, como interrupção da homeostase endotelial (TAKAHASHI & SHIMOHATA, 2019), e influência no metabolismo lipídico (MOREIRA et al., 2012).

Os grupos experimentais não apresentaram diferenças no peso inicial e ingestão alimentar, que resultou em pesos finais equivalentes, ou seja, a intoxicação por metilmercúrio não influenciou no peso corporal dos animais nem em seu consumo alimentar (Tabela 3).

Em relação à ingestão hídrica, também não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 3). Visto que os grupos intoxicados CTHg e APOHg ingeriram quantidades equivalentes de metilmercúrio, as diferenças em resposta à intoxicação de animais CT e APOE^{-/-} se devem possivelmente às diferenças na composição genética, que geram respostas metabólicas distintas em relação ao metilmercúrio.

A apolipoproteína E possui importante papel no metabolismo lipídico (MAHLEY, 1986), e está ausente em animais APOE nocaute, porém esses animais apresentam fundo genético C57BL/6, o que favorece a comparação entre as linhagens em estudos experimentais (CRAWFORD et al., 2013).

Investigações anteriores demonstram que a administração de cloreto de metilmercúrio (40 mg/L) para camundongos, não influenciam no consumo alimentar e hídrico dos animais. A partir da concentração de 40 mg/L, existe decréscimo na ingestão, possivelmente pelo gosto metálico que a água apresenta (DIETRICH et al., 2005). Além disso, esta concentração é suficiente para gerar hipercolesterolemia em camundongos nocaute para o receptor de LDL (MOREIRA et al., 2012). Como a dislipidemia é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose, o metilmercúrio atua como fator pró-aterogênico.

Um estudo piloto foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa, anteriormente ao presente trabalho, no qual, empregou-se a concentração 40 mg/L de cloreto de meHg. No entanto, nesta concentração, os animais eram severamente debilitados pela intoxicação e a maioria não alcançava o fim do protocolo experimental. Assim, estabeleceu-se a redução pela metade da concentração máxima definida anteriormente (DIETRICH et al., 2005; MOREIRA et al., 2012). A concentração de 20 mg/L administrada na água de beber dos animais, foi consistente com a ausência de diferença observada no consumo hídrico entre os grupos experimentais.

Amostras de pelo são aceitas como marcadores de exposição ao metilmercúrio (WHO, 1990), e isso se deve ao fato de que, depois de absorvido, o mercúrio acessa o folículo capilar por meio da raiz capilar em contato com a circulação sanguínea. Como o pelo é crescente, o metal acumulado fica retido neste tecido irreversivelmente. Por isso, o pelo humano chega a acumular cerca de 250 vezes mais mercúrio do que o encontrado na circulação sanguínea (MARCO, 2007). Assim, a medida de mercúrio nos pelos (de humanos ou animais), reflete de forma fiel a presença deste contaminante no organismo, conforme observado neste trabalho.

A concentração média de mercúrio acumulada no pelo dos animais intoxicados, CTHg e APOHg (12 mg/kg), foi cerca de 75 vezes maior que a concentração apresentada no pelo dos animais não intoxicados (0,2 mg/kg), o que confirmou a intoxicação (Figura 1A). As concentrações médias no pelo dos grupos intoxicados são na ordem de 2,5 vezes maiores que a concentração máxima estabelecida como segura pela Organização Mundial da Saúde para o cabelo de humanos, que é de 5 mg/kg (WHO, 1990).

Em concordância com as concentrações no pelo, houve grande acúmulo de metilmercúrio no fígado dos grupos intoxicados (Figura 1B). Sabe-se que o metilmercúrio, realiza circulação entero-hepática, se liga à glutatona reduzida (GSH), que é altamente produzida no fígado, o que contribui para mudanças no metabolismo lipídico e dos sistemas antioxidantes (CLARKSON et al., 1991; DUTCZAK & BALLATORI, 1994).

Porém, apesar de realizar deposição significativa no fígado, o modelo de exposição utilizado neste estudo parece não ter promovido dano hepático, como sugerido pelas atividades das enzimas AST, ALT e γ -GT (Figuras 2A, B e C), marcadores conhecidos da função hepática (KUMAR et al., 2005; DE CEAURRIZ et al., 1994).

Estudos anteriores demonstram que a maior excreção de metilmercúrio na urina está correlacionada positivamente com o aumento das enzimas hepáticas AST, ALT e γ -GT (LIN et al. 2014; TANAKA-KAGAWA et al., 1993). Portanto, a ausência de efeito na atividade sérica destas enzimas, sugere que não há aumento no dano hepático dos animais no presente trabalho. Além disso, níveis normais de γ -GT, como observado, podem indicar que há redução na excreção e maior bioacumulação do metilmercúrio em outros órgãos-alvo, nos grupos experimentais que o receberam (TANAKA-KAGAWA et al., 1993).

Outros estudos realizados com administração de mercúrio inorgânico para camundongos, estão em concordância com nossos dados e relatam a ausência de efeitos da intoxicação na atividade das enzimas hepáticas (OLIVEIRA et al., 2017). É sugerido que o metabolismo acelerado destes animais, faz com que eliminem o metilmercúrio mais rápido do organismo se comparados aos humanos, e isso os protege de lesões hepáticas e renais graves que são esperadas pela intoxicação aguda (OLIVEIRA et al., 2017).

Apesar disso, os animais APOE -/- frequentemente apresentam níveis séricos elevados de enzimas hepáticas, em relação aos animais selvagens, como observado neste estudo. A elevação das enzimas AST e ALT nesta linhagem, é relacionada ao acúmulo principalmente de triglicerídeos (esteatose) no citoplasma dos hepatócitos (este parâmetro foi avaliado e será discutido a seguir). Esta elevação, pode ser acompanhada de alterações na permeabilidade

celular ou necrose, e consequente extravasamento destas enzimas para a corrente sanguínea (STACHOWICZ et al., 2019).

Após confirmar que a intoxicação ocorreu e que o metilmercúrio exerceu deposição significativa em outros órgãos-alvo como o fígado, sem causar aumento de dano hepático, os processos subjacentes ao desenvolvimento da aterosclerose foram investigados, ou seja, a participação do metilmercúrio na ocorrência da aterosclerose por influência em seus fatores de risco.

Ao início do experimento, a pressão arterial sistólica, diastólica e média dos animais eram equivalentes (Figuras 3A, B e C). Isso sugere que as diferenças entre linhagens não influenciaram a pressão arterial. Entretanto, ao fim do protocolo experimental, observou-se o aumento da pressão arterial nos grupos intoxicados (CTHg e APOHg) em relação aos controles (CT e APO).

Diversos mecanismos controlam o tônus vascular, entre os quais se incluem o sistema renina angiotensina-aldosterona, sistema caliceína-cinina, os barorreceptores, via do óxido nítrico, sistema nervoso simpático, além de outros como os relacionados ao aumento das citocinas IL-17, IL-6 e IFN- γ (COFFMAN, 2011; SAMSON et al., 2016).

Assim como a aterosclerose, o aumento da pressão arterial resulta de alterações de diversas vias correlacionadas, fatores genéticos e ambientais, além de estímulos e mecanismos compensatórios SAMSON et al., 2016. É relatado que a intoxicação por metilmercúrio provoca aumento da pressão arterial (INOUE et al., 2012; PARK et al., 2013; WILDEMANN et al., 2015), mas, a razão para este efeito não é clara.

Entre os possíveis motivos para a influência do metilmercúrio na pressão arterial, está a atividade de uma classe de GTPases, as Rho-quinases (ISLAM et al., 2016). Estas enzimas, regulam a migração de monócitos para o ambiente aterogênico e influenciam na regulação da pressão arterial porque modulam negativamente a atividade da eNOS, e consequentemente diminuem a biodisponibilidade de óxido nítrico na vasculatura (ISLAM et al., 2016). As Rho-quinases e a NADPH oxidase, essa última a maior fonte de ânion superóxido cardiovascular, são mais ativas na vasculatura de ratos tratados com metilmercúrio (ISLAM et al., 2016; GHIZONI et al., 2017).

Além disso, o ânion superóxido gerado pelo aumento da atividade da NADPH oxidase pode reagir com o óxido nítrico presente em menor concentração (por inibição da eNOS) e gerar peroxinitrito, que contribui para a redução da vasodilatação e para o aumento do estresse oxidativo. Por consequência, o aumento do estresse oxidativo contribui para a oxidação das lipoproteínas aterogênicas, como a LDL (ISLAM et al., 2016; GHIZONI et al., 2017). A

disfunção endotelial promovida pelo aumento da pressão arterial e a oxidação das lipoproteínas aterogênicas (como a LDLox) são processos-chave para o desenvolvimento da aterosclerose (LIBBY, 2003).

A administração de metilmercúrio não influenciou na glicemia, entretanto, animais APOE -/- apresentaram maiores níveis glicêmicos em relação aos selvagens (Figura 4A). Camundongos APOE -/-, frequentemente apresentam elevação dos níveis glicêmicos, além de desenvolverem naturalmente hipercolesterolemia e esteatose hepática leve (STACHOWICZ et al., 2019). No caso da glicemia, a elevação ocorre porque esses animais estão submetidos a um estado inflamatório basal, que contribui para resistência à insulina (TERASAKI et al., 2015). Níveis aumentados de ALT, AST e triglicerídeos, como observados anteriormente para os animais APOE -/-, estão associados à resistência à insulina (SODHI et al., 2017).

Como aconteceu com a glicemia, o metilmercúrio não interferiu nos níveis circulantes de triglicerídeos (Figura 4B). Da mesma forma, camundongos APOE -/- apresentaram maiores níveis de triglicerídeos em relação aos animais selvagens. Níveis séricos aumentados de lipoproteínas aterogênicas, ou seja, ricas em triglicerídeos e colesterol, associados ao aumento do estresse oxidativo, levam à aterosclerose e complicações cardiovasculares (SODHI et al., 2017).

Diferente dos níveis de triglicerídeos, o metilmercúrio foi capaz de aumentar os níveis séricos de colesterol total e especificamente da fração aterogênica (não-HDL), nos grupos que o receberam. Trabalhos anteriores demonstram que um tratamento de 21 dias com cloreto de metilmercúrio (40 mg/L) na água de beber, também induziu aumento de colesterol total, bem como da fração não-HDL em animais C57BL/6 e LDLr -/- (MOREIRA et al., 2012). Esses resultados sugeriram que a hipercolesterolemia induzida pela intoxicação por metilmercúrio, não é o resultado de sua interação com o receptor de LDL, ausente nesses animais (MOREIRA et al., 2012).

No caso dos animais APOE -/-, uma vez que a apoE é necessária para a captação das lipoproteínas remanescentes no fígado e está ausente nestes animais, tem-se o estabelecimento da dislipidemia (MAHLEY, 1984). No entanto, os animais selvagens apresentaram resultados semelhantes, ou seja, foram estimulados à dislipidemia assim como os APOE -/-, conforme observado através do aumento do colesterol total bem como da fração aterogênica sem modificação na fração HDL nas duas linhagens (Figuras 5A, B e C).

A apoB-100 é a apolipoproteína característica da LDL e necessária para seus processos celulares (NELSON & COX, 2014). A ligação do metilmercúrio em um ou vários dos 12 grupamentos sulfidríla expostos em sua estrutura tridimensional, seriam suficientes para

provocar modificações em sua estrutura terciária, afetando sua interação com o receptor de LDL e sua captação intracelular (MAHLEY et al., 1984). Esse fato, seria capaz de gerar o acúmulo sérico de colesterol e da fração não-HDL (que agrupa as lipoproteínas contendo apoB-100), observados no presente trabalho. Isso é sustentado pelo fato de que os níveis plasmáticos de HDL (que não contém apoB-100) não foram afetados pela administração de meHg.

Além disso, estes resultados demonstram que a concentração de 20 mg/L de cloreto de metilmercúrio administrada por 14 dias, também é suficiente para provocar dislipidemia em animais selvagens e acelerar a ocorrência nos animais APOE -/-.

A correlação entre maiores níveis capilares de metilmercúrio e polimorfismos das apolipoproteínas, especificamente da apoE, são descritos em humanos (ARRIFANO et al., 2017). Quando os alelos $\epsilon 4\epsilon 4$ estão presentes, têm-se a expressão de uma apoE que não possui cisteína, um aminoácido que contém enxofre e maiores níveis de metilmercúrio no organismo com consequente maior neurodegeneração são observados nesta condição (LLOP et al., 2015).

Isso sugere que há uma ligação direta da toxicidade do metilmercúrio com as apolipoproteínas em humanos. O mesmo poderia acontecer em camundongos, uma vez que há conservação na estrutura tridimensional destas proteínas (MAHLEY, 1984). Assim, o metilmercúrio também poderia influenciar na captação das lipoproteínas remanescentes por interação com a apoE dos animais selvagens (que a expressam) e aproximá-los do fenótipo APOE -/-, que é dislipidêmico por ausência desta. Nos animais selvagens, além de provocar a disfuncionalidade da apoB-100, a ligação do metilmercúrio na apoE, poderia contribuir para o aumento dos níveis plasmáticos de colesterol total e não-HDL observados.

A paraoxonase sérica (PON1) é uma enzima presente na superfície da HDL, complexada com a apoA-I. A PON1 está relacionada à defesa antioxidante, porque impede a oxidação dos lipídios presentes em QM, VLDL e LDL, além de participar de reações de desintoxicação de certos compostos organofosforados (DRESCHER et al., 2014). Nesse estudo foi observado que a atividade de PON1 foi menor nos grupos APOE -/- (Figura 5D), o que pode refletir maior estresse oxidativo nesses animais e maior oxidação dos lipídios presentes nas lipoproteínas (SORAN et al., 2009).

Estudos anteriores demonstraram que a redução da atividade de PON1 induzida pelo metilmercúrio, levou a um aumento de quase 10% no risco de eventos cardiovasculares agudos (GINSBERG et al., 2014). Entretanto, não foram vistas alterações na atividade dessa enzima nos grupos tratados com meHg. Este resultado está em concordância com os níveis de

HDL (na qual a PON1 está ligada), que foram semelhantes nos animais tratados ou não pelo metilmercúrio.

A concentração hepática de lipídios totais, colesterol e triglicerídeos, foi maior em animais APOE $-/-$, comparados aos animais selvagens, o que é esperado, uma vez que, os primeiros desenvolvem naturalmente esteatose hepática leve (STACHOWICZ et al., 2019). Porém, os grupos intoxicados apresentaram efeitos opostos entre linhagens em relação ao acúmulo de colesterol e triglicerídeos hepáticos: houve aumento destes lipídios quando o meHg foi administrado nos animais CT e redução nos animais APOE $-/-$ intoxicados (Figuras 6A, B e C).

Estudos anteriores demonstram que o estresse inflamatório, inibe o transporte dos lipídios hepáticos produzidos na síntese endógena e regula positivamente a expressão da proteína ativadora de clivagem (SCAP), mesmo em altas concentrações intracelulares de colesterol (MA et al., 2008). Como os animais APOE $-/-$ apresentam um estado pró-inflamatório basal (STACHOWICZ et al., 2019), isso culminaria no aumento da síntese endógena e diminuição no transporte aos tecidos extra-hepáticos. Por isso, a concentração de lipídios nos hepatócitos dos animais APOE $-/-$ seria maior em relação aos selvagens, assim como observado.

A exportação dos lipídios hepáticos para os tecidos extra-hepáticos depende primariamente de seu acondicionamento nas VLDL, que são formadas pela incorporação de triglicerídeos nas apoB pela proteína de transferência microssomal (MTP). Assim, alterações nas apolipoproteínas, como possivelmente ocorre pela ação do metilmercúrio na apoB-100, têm sido propostas como razão para uma menor capacidade de exportação de lipídios e consequentemente esteatose hepática (CHARLTON et al., 2002).

Assim, nos animais selvagens, com a ligação do metilmercúrio na apoB-100, haveria menor exportação dos lipídios intracelulares para os tecidos extra-hepáticos, o que provocaria seu acúmulo no fígado, como observado.

No entanto, em animais APOE $-/-$, a única forma de captação das lipoproteínas remanescentes ocorre via receptores B (como o LDLr), uma vez que a apoE, está ausente. Desta forma, a ligação do metilmercúrio na apoB-100 nos hepatócitos do grupo APOHg pode prejudicar nestes animais as duas formas de captação das lipoproteínas remanescentes, o que culminaria na redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos observados nestes animais. Porém, esta redução não é suficiente para que os níveis acumulados sejam inferiores ao do grupo selvagem intoxicado, uma vez que há maior síntese e menor transporte de lipídios em estados inflamatórios (MA et al., 2008), que correspondem ao metabolismo basal nesta linhagem (STACHOWICZ et al., 2019), exposto anteriormente.

Além da dislipidemia, o estresse oxidativo é importante fator na etiologia da aterosclerose (KATTOOR et al., 2017), e principal mecanismo relacionado à toxicidade do metilmercúrio (CLARKSON & MAGOS, 2006). No contexto da aterosclerose, o estresse oxidativo desempenha papel importante na oxidação da LDL (GEOVANINI & LIBBY, 2018). Em condições de estresse oxidativo, incluindo as disfunções redox mitocondriais que são desempenhadas pelo metilmercúrio (GHIZONI et al., 2017), há exacerbação da resposta inflamatória, um evento chave na patobiologia da aterosclerose (VASCONCELOS et al., 2016).

Outros trabalhos demonstram que, além do modificar o potencial de membrana mitocondrial e favorecer o desacoplamento de elétrons na cadeia respiratória (OLIVEIRA & VERCESI, 2019), o metilmercúrio é capaz de reduzir os níveis de glutathione, aumentar a atividade de mieloperoxidases (SENER et al., 2003), inativar superóxido dismutase (SOD) e catalase (NAGANUMA et al., 1980).

Os resultados obtidos, demonstram que a atividade de SOD é maior em animais APOE -/- comparados aos selvagens (Figura 7A). Porém, o produto da ação da SOD, os hidroperóxidos, apresentaram concentrações opostas, isto é, menor concentração em animais APOE -/- comparados aos controles (Figura 7B). Esses dados podem sugerir que o maior estresse oxidativo basal apresentado pelos animais APOE -/- (DOSE et al., 2016), induz o aumento da atividade de SOD nestes animais, e poderia interferir também na atividade de enzimas antioxidantes à jusante na via, como a catalase ou a glutathione peroxidase, responsáveis por reduzir a concentração dos hidroperóxidos hepáticos gerados, como relatado anteriormente (GHIZONI et al., 2017).

A aumento do estresse oxidativo pode indicar maior oxidação de LDL (LDLox), que por sua vez, pode atuar como estímulo para ativação endotelial e provocar o aumento da expressão dos receptores endoteliais de rolamento e adesão para células imunes, e na produção de quimiocinas que atuam no recrutamento destas células presentes na circulação, e dar início ao processo de aterosclerose (GIOVANINI & LIBBY, 2018).

No presente trabalho, não houve atuação do metilmercúrio sobre a atividade da superóxido dismutase, apesar dos animais APOE -/- apresentarem maiores níveis desta atividade, investigada no fígado. No entanto, em condições de disfunção endotelial como ocorre na dislipidemia e aumento da pressão arterial, que foram provocadas pelo metilmercúrio, sabe-se que há aumento da atividade da enzima NADPH oxidase, a maior fonte do ânion superóxido (O_2^-) no organismo (ISLAM et al., 2016).

O O_2^- gerado nos processos intracelulares pode seguir vários caminhos, mas, há dois principais, onde no primeiro, sofre reação da SOD, ocorre liberação de água e peróxido de hidrogênio, este último, pode ser removido por atividade de glutathione peroxidase ou catalase. No segundo caminho, o O_2^- pode ser utilizado como substrato para a atividade de outras enzimas, como as lipoxigenases, que introduzem o ânion superóxido nos ácidos graxos, promovem o rompimento da ligação éster e resultam na peroxidação lipídica (NEWCOMER & BRASH, 2015; GAFFNEY, 2019).

Assim, maiores níveis de atividade da superóxido dismutase nos animais APOE -/- podem demonstrar que há menos ânion superóxido para ser utilizado como substrato na atividade das lipoxigenases (NEWCOMER & BRASH, 2015), que corroboram com os menores níveis de hidroperóxidos apresentados por estes animais em relação aos selvagens, onde se incluem os peróxidos lipídicos (BANERJEE et al., 2002).

Houve um discreto aumento de hidroperóxidos totais nos animais APOE -/-, que diferente do ocorreu na linhagem selvagem intoxicada, não foi acompanhado de aumento no colesterol e triglicerídeos hepáticos. Desse modo, os níveis aumentados de hidroperóxidos totais no grupo APOHg, poderiam se relacionar ao fato de que há mais peróxido de hidrogênio gerado pela maior atividade de SOD na linhagem nocaute, ou que os lipídios hepáticos destes animais sofreram maior peroxidação, uma vez que houve redução no acúmulo neste grupo experimental.

Estudos anteriores demonstram que pelo menos no que se refere à vasculatura de animais APOE -/-, há naturalmente menor concentração de peróxido de hidrogênio, porque este atua como substrato para atividade de nNOS e consequentemente como vasodilatador (CAPETTINI et al., 2011).

Nos animais selvagens, possivelmente, os maiores níveis de hidroperóxidos totais apresentados se referem à níveis normais de produção de peróxido de hidrogênio, que são prejudicados em animais APOE -/-. Os níveis de hidroperóxidos totais foram ainda maiores no grupo CTHg, que podem corresponder à maior peroxidação lipídica neste grupo, uma vez que, o metilmercúrio promoveu aumento de colesterol e triglicerídeos hepáticos acumulados.

Em sequência ao estresse oxidativo, outro processo importante na linha do tempo de desenvolvimento da aterosclerose é o rolamento e adesão dos monócitos presentes na circulação por interação com receptores expressos pelo endotélio. Essas células, vão alcançar o espaço subendotelial e se diferenciar em macrófagos para captar a LDLox (GIOVANINI & LIBBY, 2018). Uma vez que se observou aumento da pressão arterial, seguida de aumento dos níveis de colesterol plasmático aterogênico e da peroxidação lipídica hepática nos grupos

intoxicados, era esperado que o número de células em rolamento e aderidas na veia mesentérica, também fosse elevado (Figura 8A e B).

É possível observar que ambos, linhagem e intoxicação por metilmercúrio, causam aumento do estímulo inflamatório como demonstrado pelo aumento do rolamento e adesão leucocitários. Animais APOE $-/-$ apresentam maior número de células em ambos os casos, e isto se relaciona com o fato de que estes animais mantêm um nível de inflamação basal devido à dislipidemia e ao estresse oxidativo que apresentam (JANSSEN et al., 2016; LI et al., 2016). Por outro lado, o aumento do estresse oxidativo e a hipercolesterolemia causados pela intoxicação por meHg, também geram inflamação (FITCH et al., 2019), aumentando ainda mais a inflamação de baixo grau vista nos animais selvagens.

Como visto acima, o meHg intensifica vários fatores de risco ligados à aterosclerose, culminando no aumento da lesão aterosclerótica. Os animais APOE $-/-$ são modelo experimental de aterosclerose e, portanto, após favorecer diversos mecanismos pró-ateroscleróticos, o metilmercúrio consequentemente aumentou a área de lesão na aorta nesta linhagem. Além disso, provocou o desenvolvimento nos animais selvagens, ainda que sejam altamente resistentes à formação de aterosclerose, por possuírem altos níveis de HDL, menos apoB-100 e apoE mais eficiente em comparação à humana (FAZIO et al., 1997).

O metilmercúrio provocou aumento da área de lesão no arco e porção torácica da aorta dos animais intoxicados (Figura 10A e B). O mesmo fato foi visto na carótida obstruída, causando o aumento da área aterosclerótica no grupo APOHg e o surgimento de lesão no CTHg (Figura 12A).

A artéria carótida é definida como um sítio mais tardio de desenvolvimento de lesão. A lesão se desenvolve primeiro no arco da aorta e lesões mais elaboradas surgem posteriormente na carótida (VENEGAS-PINO et al., 2018). Por isso, a obstrução da carótida é um modelo experimentalmente importante utilizado para aceleração do desenvolvimento da lesão nesta artéria que não seria desenvolvida em tempo e condições hábeis (CRAWFORD et al., 2013).

Os animais com a artéria carótida obstruída, desenvolvem lesões, porque a obstrução total fornece o estímulo inicial para seu desenvolvimento, com a redução do estresse de cisalhamento que gera a disfunção endotelial (NAM et al., 2010). No entanto, a proporção da lesão formada depende da quantidade e intensidade de estímulos apresentados para que ela se desenvolva (NAM et al., 2010).

Neste contexto, os mesmos fatores que atuaram no desenvolvimento da lesão na aorta como a disfunção endotelial, dislipidemia, estresse oxidativo e inflamação, atuaram também no favorecimento para que a lesão na carótida ocorresse (HOFFMAN et al., 2017). O efeito

da intoxicação com meHg nos fatores de risco levou à aceleração do desenvolvimento da lesão, que se mostrou significativamente maior que os controles não intoxicados nas linhagens estudadas.

De forma análoga à área de lesão na carótida, a porcentagem de estenose, isto é, a área da artéria obstruída pela lesão em relação ao calibre total (FOX et al., 1993), foi maior nos animais APOE $-/-$, quando comparados aos selvagens (Figura 12B), uma vez que, estes também apresentaram maiores áreas de lesão. Novamente, o meHg atuou como um agravante nos fatores de risco, e contribuiu para a maior estenose dos animais intoxicados.

Estudos epidemiológicos sugerem que metilmercúrio aumenta o desenvolvimento de aterosclerose e a ocorrência de doenças cardiovasculares (SALONEN et al., 2000). O presente trabalho, além de confirmar os estudos epidemiológicos, apontou alguns processos pelos quais o metilmercúrio desempenha esse efeito. Apesar do estresse oxidativo ser considerado o mecanismo chave na toxicidade do metilmercúrio, estudos adicionais concentrados nessa temática ainda se fazem necessários. Diversos mecanismos biológicos apontados por diferentes pesquisas apoiam os resultados apresentados neste trabalho. Entretanto, investigações futuras, utilizando diferentes modelos experimentais e/ou populações, são necessários.

Em resumo, este trabalho demonstrou pela primeira vez que o tratamento agudo com metilmercúrio promove o desenvolvimento de aterosclerose porque induz dislipidemia, caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de colesterol total e especificamente da fração aterogênica em camundongos selvagens, que são resistentes, e em modelo experimental de aterosclerose. Além disso, o desenvolvimento da aterosclerose foi favorecido pela intoxicação por metilmercúrio, que provocou aumento da pressão arterial, promoveu estresse oxidativo hepático e influenciou no rolamento e adesão leucocitários.

O fator comum da atuação do metilmercúrio entre todos esses processos ainda precisa ser completamente elucidado, mas, é possível que a biodisponibilidade do óxido nítrico esteja envolvida. Entender as portas de entrada do metilmercúrio no organismo e os rumos que este pode seguir significa entender seu papel na etiologia das doenças, principalmente nas cardiovasculares, que são a principal causa de morte no mundo.

O consumo do peixe é a principal forma de exposição humana à toxicidade do metilmercúrio, e o aumento de seu consumo representa ganhos no âmbito da saúde pública, no entanto, atenção deve ser dada à possibilidade de contaminação por metais pesados, em especial pelo metilmercúrio, para que os benefícios do consumo não sejam ultrapassados pela intoxicação.

8 CONCLUSÃO

A intoxicação por metilmercúrio pode ter atuado através do aumento da aterosclerose observada em animais propensos ao seu desenvolvimento (APOE -/-), e induzido sua ocorrência em animais selvagens (C57BL/6), que são resistentes. Isso pode ser decorrente do meHg ser capaz de influenciar nos principais processos envolvidos na patobiologia desta desordem, caracterizada pela associação entre fatores pró-oxidativos e pró-inflamatórios.

Os animais intoxicados apresentaram dislipidemia, vista pelo aumento de colesterol total e específico da fração aterogênica. Ao favorecer o estresse oxidativo e gerar disfunção endotelial, o metilmercúrio pode ter atuado no aumento da pressão arterial dos animais intoxicados. Além disso, houve aumento na deposição lipídica hepática e do estresse oxidativo hepático dos animais selvagens, processos que foram acompanhados pelo aumento dos leucócitos em rolamento e adesão na vasculatura mesentérica. Estes últimos, como indicativos do estado metabólico pró-inflamatório crônico (de baixo grau), que o meHg pode ter ocasionado, em ambas as linhagens estudadas.

Todos esses impactos metabólicos associados, podem ter favorecido à ocorrência da aterosclerose, observada diretamente pelo aumento da área acometida por lesões na aorta e na carótida nos animais propensos e nos selvagens quando intoxicados.

A diversidade dos mecanismos da toxicidade mercurial no sistema cardiovascular, ainda é pouco explorada, em contraste aos seus estabelecidos impactos neurológicos. Investigações nesse sentido, podem favorecer a elaboração de protocolos para a prevenção e tratamento de danos à saúde humana e animal, além de auxiliar na mitigação de outros prejuízos ocasionados pela crescente presença ambiental de meHg.

9 REFERÊNCIAS

- An, Jing, Lijie Zhang, Xia Lu, Dale A. Pelletier, Eric M. Pierce, Alexander Johs, Jerry M. Parks, and Baohua Gu. 2019. “Mercury Uptake by *Desulfovibrio Desulfuricans* ND132: Passive or Active?” *Environmental Science and Technology* 53 (11): 6264–72. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00047>.
- Andreoli, Virginia, and Francesca Sprovieri. 2017. “Genetic Aspects of Susceptibility to Mercury Toxicity: An Overview.” *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010093>.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. RDC 145/2017. 2017. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1998/prt0685_27_08_1998_rep.html.
- Ballatori, Nazzareno, and Thomas W. Clarkson. 1985. “Biliary Secretion of Glutathione and of Glutathione-Metal Complexes.” *Toxicological Sciences* 5 (5): 816–31. <https://doi.org/10.1093/toxsci/5.5.816>.
- Banerjee, Dibyajyoti, U. K. Madhusoodanan, Sudhakar Nayak, and Jose Jacob. 2003. “Urinary Hydrogen Peroxide: A Probable Marker of Oxidative Stress in Malignancy.” *Clinica Chimica Acta* 334 (1–2): 205–9. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00236-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00236-5).
- Basu, Debapriya, Yunning Hu, Lesley Ann Huggins, Adam E. Mullick, Mark J. Graham, Tomasz Wietecha, Shelley Barnhart, et al. 2018. “Novel Reversible Model of Atherosclerosis and Regression Using Oligonucleotide Regulation of the LDL Receptor.” *Circulation Research* 122 (4): 560–67. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311361>.
- Bisinoti, Márcia Cristina, and Wilson F. Jardim. 2004. “O Comportamento Do Metilmercúrio (METILHg) No Ambiente.” *Quimica Nova* 27 (4): 593–600. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422004000400014>.
- Blank, Lars Mathias, Tanja Narancic, Jörg Mampel, Till Tiso, and Kevin O’Connor. 2020. “Biotechnological Upcycling of Plastic Waste and Other Non-Conventional Feedstocks in a Circular Economy.” *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.011>.
- Bose-O’Reilly, Stephan, Ludovic Bernaudat, Uwe Siebert, Gabriele Roeder, Dennis Nowak, and Gustav Drasch. 2017. “Signs and Symptoms of Mercury-Exposed Gold Miners.” *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 30 (2): 249–69. <https://doi.org/10.13075/ijom.1896.00715>.

- Brasil. 1998. "PORTARIA Nº 685, DE 27 DE AGOSTO DE 1998." 1998.
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1998/prt0685_27_08_1998_rep.html.
- Breslow, Jan L. 1996. "Mouse Models of Atherosclerosis." *Science* 272 (5262): 685–88.
<https://doi.org/10.1126/science.272.5262.685>.
- Bridges, Christy C., and Rudolfs K. Zalups. 2005. "Molecular and Ionic Mimicry and the Transport of Toxic Metals." *Toxicology and Applied Pharmacology*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007>.
- Brinjikji, Waleed, Alejandro A. Rabinstein, John Huston, Amir Lerman and Giuseppe Lanzino Gyeong-moon Kim. 2016. "Contemporary Carotid Imaging: From Degree of Stenosis to Plaque Vulnerability." *J Neurosurg* 124: 27–42.
- Burbulla, Lena F., Pingping Song, Joseph R. Mazzulli, Enrico Zampese, Yvette C. Wong, Sohee Jeon, David P. Santos, et al. 2017. "Dopamine Oxidation Mediates Mitochondrial and Lysosomal Dysfunction in Parkinson's Disease." *Science* 357 (6357): 1255–61.
<https://doi.org/10.1126/science.aam9080>.
- Capettini, L. S A, S. F. Cortes, J. F. Silva, J. I. Alvarez-Leite, and V. S. Lemos. 2011. "Decreased Production of Neuronal NOS-Derived Hydrogen Peroxide Contributes to Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis." *British Journal of Pharmacology* 164 (6): 1738–48. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01500.x>.
- Ceaurriz, J. De, J. P. Payan, G. Morel, and M. T. Brondeau. 1994. "Role of Extracellular Glutathione and Γ -Glutamyltranspeptidase in the Disposition and Kidney Toxicity of Inorganic Mercury in Rats." *Journal of Applied Toxicology* 14 (3): 201–6.
<https://doi.org/10.1002/jat.2550140310>.
- Chow, Elaine, and Martin Tsz Ki Tsui. 2019. "Elucidating Microbial Pathways of Mercury Methylation During Litter Decomposition." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 103 (4): 617–22. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02700-3>.
- Clarkson, Thomas W., and Laszlo Magos. 2006. "The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds." *Critical Reviews in Toxicology* 36 (8): 609–62.
<https://doi.org/10.1080/10408440600845619>.
- Coffman, Thomas M. 2011. "Under Pressure: The Search for the Essential Mechanisms of Hypertension." *Nature Medicine* 17 (11): 1402–9. <https://doi.org/10.1038/nm.2541>.
- Costa Junior, José Maria Farah, Camile Irene Mota da Silva, Abner Ariel da Silva Lima, Dario Rodrigues Júnior, Luiz Carlos de Lima Silveira, Givago da Silva Souza, and Maria da Conceição Nascimento Pinheiro. 2018. "Teores de Mercúrio Em Cabelo e Consumo de Pescado de Comunidades Ribeirinhas Na Amazônia Brasileira, Região Do Tapajós."

- Ciencia e Saude Coletiva* 23 (3): 805–12. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018233.09492016>.
- Costa, Sara, Cláudia Afonso, Carlos Cardoso, Irineu Batista, Nádia Chaveiro, Maria Leonor Nunes, and Narcisa Maria Bandarra. 2015. “Fatty Acids, Mercury, and Methylmercury Bioaccessibility in Salmon (*Salmo Salar*) Using an in Vitro Model: Effect of Culinary Treatment.” *Food Chemistry* 185 (October): 268–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.141>.
- Counter, S. Allen, and Leo H. Buchanan. 2004. “Mercury Exposure in Children: A Review.” *Toxicology and Applied Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.032>.
- Crawford, Robert S., Hassan Albadawi, Alessandro Robaldo, Michael A. Peck, Christopher J. Abularrage, Hyung Jin Yoo, Glenn M. LaMuraglia, and Michael T. Watkins. 2013. “Divergent Systemic and Local Inflammatory Response to Hind Limb Demand Ischemia in Wild-Type and ApoE^{-/-} Mice.” *Journal of Surgical Research* 183 (2): 952–62. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.042>.
- Czyżewska, Marta, Anna Wolska, Agnieszka Cwiklińska, Barbara Kortas-Stempak, and Małgorzata Wróblewska. 2010. “[Disturbances of Lipoprotein Metabolism in Metabolic Syndrome].” *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej (Online)* 64 (January): 1–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093718>.
- D’Souza, Kenneth, Carine Nzirorera, and Petra C. Kienesberger. 2016. “Lipid Metabolism and Signaling in Cardiac Lipotoxicity.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.016>.
- Dietrich, Marcelo O., Carlos E. Mantese, Gabriel Dos Anjos, Diogo O. Souza, and Marcelo Farina. 2005. “Motor Impairment Induced by Oral Exposure to Methylmercury in Adult Mice.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19 (1): 169–75. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.004>.
- Dose, Janina, Patricia Huebbe, Almut Nebel, and Gerald Rimbach. 2016. “APOE Genotype and Stress Response - A Mini Review.” *Lipids in Health and Disease*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0288-2>.
- Drescher, Olivia, Eric Dewailly, Caroline Diorio, Nathalie Ouellet, Elhadji Anassour Laouan Sidi, Belkacem Abdous, Beatriz Valera, and Pierre Ayotte. 2014. “Methylmercury Exposure, PON1 Gene Variants and Serum Paraoxonase Activity in Eastern James Bay Cree Adults.” *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 24 (6): 608–14. <https://doi.org/10.1038/jes.2013.96>.
- Dutczak, W J, and N Ballatori. 1994. “Transport of the Glutathione-Methylmercury Complex

- across Liver Canalicular Membranes on Reduced Glutathione Carriers.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (13): 9746–51.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144567>.
- Farias, Luciana A. 2006. “Avaliação Do Conteúdo De Mercúrio, Metilmercúrio E Outros Elementos De Interesse Em Peixes E Em Amostras De Cabelos E Dietas De Pré-Escolares Da Região Amazônica” 233p. Tese de Doutorado: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- Favero, Giovani Marino. 2007. “Receptores de Ldl: Alvo Para Drogas Anti-Neoplásicas Ldl Receptors: Antineoplastic Drug Target.” *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde* 14: 53–58.
- Fazio, Sergio, Vladimir R. Babaev, Alisa B. Murray, Alyssa H. Hasty, Kathy J. Carter, Linda A. Gleaves, James B. Atkinson, and Macrae F. Linton. 1997. “Increased Atherosclerosis in Mice Reconstituted with Apolipoprotein E Null Macrophages.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9): 4647–52.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4647>.
- Fitch, Megan N., Danielle Phillippi, Yan Zhang, JoAnn Lucero, Ravi S. Pandey, June Liu, Jeremy Brower, et al. 2019. “Effects of Inhaled Air Pollution on Markers of Integrity, Inflammation, and Microbiota Profiles of the Intestines in Apolipoprotein E Knockout Mice.” *Environmental Research*, November, 108913.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108913>.
- Fitzgerald, William F, and Thomas W Clarkson\$. 1991. “Mercury and Monomethylmercury: Present and Future Concerns.” *Environmental Health Perspectives*. Vol. 96.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. “A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues.” *The Journal of Biological Chemistry* 226 (1): 497–509. <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69n187>.
- Fonseca Arrifano, Gabriela De Paula, Marcus Augusto De Oliveira, Jose Rogerio Souza-Monteiro, Ricardo S. Oliveira Paraense, Andrea Ribeiro-Dos-Santos, Jose Ricardo Dos Santos Vieira, Artur Luiz Da Costa Silva, et al. 2018. “Role for Apolipoprotein e in Neurodegeneration and Mercury Intoxication.” *Frontiers in Bioscience - Elite* 10 (1): 229–41. <https://doi.org/10.2741/e819>.
- Fox, A. J. 1993. “How to Measure Carotid Stenosis.” *Radiology*, 1993.
<https://doi.org/10.1148/radiology.186.2.8421726>.
- Franco, Jeferson L., Thaís Posser, Peter R. Dunkley, Phillip W. Dickson, Jacó J. Mattos, Roberta Martins, Afonso C.D. Bainy, Maria R. Marques, Alcir L. Dafre, and Marcelo Farina. 2009. “Methylmercury Neurotoxicity Is Associated with Inhibition of the

- Antioxidant Enzyme Glutathione Peroxidase.” *Free Radical Biology and Medicine* 47 (4): 449–57. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.013>.
- Gaffney, Betty J. 2019. “EPR Spectroscopic Studies of Lipoxygenases.” *Chemistry - An Asian Journal*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/asia.201901461>.
- Geovanini, Glaucylara Reis, and Peter Libby. 2018. “Atherosclerosis and Inflammation: Overview and Updates.” *Clinical Science*. Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/CS20180306>.
- Ghizoni, Heloisa, Viviane de Souza, Marcos Raniel Straliootto, Andreza Fabro de Bem, Marcelo Farina, and Mariana Appel Hort. 2017. “Superoxide Anion Generation and Oxidative Stress in Methylmercury-Induced Endothelial Toxicity in Vitro.” *Toxicology in Vitro* 38 (February): 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.010>.
- Ginsberg, G, B Sonawane, R Nath, and P Lewandowski. 2014. “Methylmercury-Induced Inhibition of Paraoxonase-1 (PON1)-Implications for Cardiovascular Risk.” *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 77 (17): 1004–23. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.919837>.
- Gochfeld, Michael. 2003. “Cases of Mercury Exposure, Bioavailability, and Absorption.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56 (1): 174–79. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00060-5).
- Goldbourt, U., and H. N. Neufeld. 1986. “Genetic Aspects of Arteriosclerosis.” *Arteriosclerosis*. <https://doi.org/10.1161/01.atv.6.4.357>.
- Goldwater, Leonard J. 1972. “Mercury: A History of Quicksilver.” Cambridge Core. 1972. <https://www.cambridge.org/core/journals/medical-history/article/leonard-j-goldwater-mercury-a-history-of-quicksilver-baltimore-md-york-press-1972-8vo-pp-xi-318-illus-1500/D857B6B9BFC68265DFBACB9D8E9A47BA>.
- Gotto, Antonio M. 2011. “Jeremiah Metzger Lecture: Cholesterol, Inflammation and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Is It All LDL?” *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 122: 256–89.
- Groenendyk, Jacob W., and Nehal N. Mehta. 2018. “Applying the Ordinal Model of Atherosclerosis to Imaging Science: A Brief Review.” *Open Heart*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2018-000861>.
- Heier, Christoph, and Guenter Haemmerle. 2016. “Fat in the Heart: The Enzymatic Machinery Regulating Cardiac Triacylglycerol Metabolism.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.014>.

- Ho, Yu Bin, Nor Hidayu Abdullah, Hazwanee Hamsan, and Eugenie Sin Sing Tan. 2017. "Mercury Contamination in Facial Skin Lightening Creams and Its Health Risks to User." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 88 (August): 72–76.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.05.018>.
- Hoekstra, Jake G., Michael J. Hipp, Thomas J. Montine, and Scott R. Kennedy. 2016. "Mitochondrial DNA Mutations Increase in Early Stage Alzheimer Disease and Are Inconsistent with Oxidative Damage." *Annals of Neurology* 80 (2): 301–6.
<https://doi.org/10.1002/ana.24709>.
- Hoffman, Allen H., Zhongzhao Teng, Jie Zheng, Zheyang Wu, Pamela K. Woodard, Kristen L. Billiar, Liang Wang, and Dalin Tang. 2017. "Stiffness Properties of Adventitia, Media, and Full Thickness Human Atherosclerotic Carotid Arteries in the Axial and Circumferential Directions." *Journal of Biomechanical Engineering* 139 (12).
<https://doi.org/10.1115/1.4037794>.
- Inoue, Sachiko, Takashi Yorifuji, Toshihide Tsuda, and Hiroyuki Doi. 2012. "Short-Term Effect of Severe Exposure to Methylmercury on Atherosclerotic Heart Disease and Hypertension Mortality in Minamata." *Science of the Total Environment* 417–418 (February): 291–93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.076>.
- Islam, Md Zahorul, Cuong Van Dao, Mitsuya Shiraishi, and Atsushi Miyamoto. 2016. "Methylmercury Affects Cerebrovascular Reactivity to Angiotensin II and Acetylcholine via Rho-Kinase and Nitric Oxide Pathways in Mice." *Life Sciences* 147 (February): 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.033>.
- Janssen, Carola I.F., Diane Jansen, Martina P.C. Mutsaers, Pieter J.W.C. Dederen, Bram Geenen, Monique T. Mulder, and Amanda J. Kiliaan Kiliaan. 2016. "The Effect of a High-Fat Diet on Brain Plasticity, Inflammation and Cognition in Female ApoE4-Knockin and ApoE-Knockout Mice." *PLoS ONE* 11 (5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155307>.
- Jawień, J., P. Nastalek, and R. Korbut. 2004. "Mouse Models of Experimental Atherosclerosis." *Journal of Physiology and Pharmacology*.
- Jones, John G. 2016. "Hepatic Glucose and Lipid Metabolism." *Diabetologia*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3940-5>.
- Kattoor, Ajoe John, Naga Venkata K. Pothineni, Deepak Palagiri, and Jawahar L. Mehta. 2017. "Oxidative Stress in Atherosclerosis." *Current Atherosclerosis Reports* 19 (11).
<https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>.
- Kim, Tae-Hun, Min-Ja Cho, Yongmin Lee, Ji Hui Kim, Jeong-Yun Hwang, Hye-Eun Lee,

- Sheen-Hee Kim, Jang-Duck Choi, and Gil-Jin Kang. 2019. "Methylmercury Determination in Fish by Direct Mercury Analyzer." *Journal of AOAC International*, September. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0254>.
- Kumar, Madhu, Mukesh Kumar Sharma, and Ashok Kumar. 2005. "Spirulina Fusiformis: A Food Supplement against Mercury Induced Hepatic Toxicity." *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE* 51 (4): 424–30. <https://doi.org/10.1248/jhs.51.424>.
- Lagrange, Jeremy, Sabine Kossmann, Klytaimnistra Kiouptsi, and Philip Wenzel. 2018. "Visualizing Leukocyte Rolling and Adhesion in Angiotensin II-Infused Mice: Techniques and Pitfalls." *Journal of Visualized Experiments* 2018 (131). <https://doi.org/10.3791/56948>.
- Leaner, Joy J, and Robert P Mason. 2002. "Methylmercury Accumulation and Fluxes across the Intestine of Channel Catfish, *Ictalurus Punctatus*." *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP* 132 (2): 247–59. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(02\)00072-8](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00072-8).
- Li, Y., C. G Zhang, X. H. Wang, and D. H. Liu. 2016. "Progression of Atherosclerosis in ApoE-Knockout Mice Fed on a High-Fat Diet." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20 (18): 3863–67.
- Libby, Peter. 2000. "Changing Concepts of Atherogenesis." In *Journal of Internal Medicine*, 247:349–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2000.00654.x>.
- Libby, Peter. 2003. "Vascular Biology of Atherosclerosis: Overview and State of the Art." In *American Journal of Cardiology*, 91:3–6. Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)03143-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)03143-0).
- Libby, Peter, and Brendan M. Everett. 2019. "Novel Antiatherosclerotic Therapies." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39 (4): 538–45. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310958>.
- Lima, Daniel Pandilha de, Cesar Santos, Roberto de Souza Silva, Eliane Tie Oba Yoshioka, and Roberto Messias Bezerra. 2015. "Contaminação Por Metais Pesados Em Peixes e Água Da Bacia Do Rio Cassiporé, Estado Do Amapá, Brasil." *Acta Amazonica* 45 (4): 405–14. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201403995>.
- Lin, Yu Sheng, Gary Ginsberg, James L. Caffrey, Jianping Xue, Suryanarayana V. Vulimiri, Raghu G. Nath, and Babasaheb Sonawane. 2014. "Association of Body Burden of Mercury with Liver Function Test Status in the U.S. Population." *Environment International* 70: 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.010>.
- Llop, Sabrina, Ferran Ballester, and Karin Broberg. 2015. "Effect of Gene-Mercury

- Interactions on Mercury Toxicokinetics and Neurotoxicity.” *Current Environmental Health Reports* 2 (2): 179–94. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0047-y>.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.” *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89160-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89160-4).
- Lusis, Aldons J. 2000. “The Immunopathogenesis of Sepsis.” *Nature* 407 (September): 233–41. <https://doi.org/10.1038/35025203>.
- Ma, Kun L., Xiong Z. Ruan, Stephen H. Powis, Yaxi Chen, John F. Moorhead, and Zac Varghese. 2008. “Inflammatory Stress Exacerbates Lipid Accumulation in Hepatic Cells and Fatty Livers of Apolipoprotein E Knockout Mice.” *Hepatology* 48 (3): 770–81. <https://doi.org/10.1002/hep.22423>.
- Mahley, R. W., T. L. Innerarity, S. C. Rall, and K. H. Weisgraber. 1984. “Plasma Lipoproteins: Apolipoprotein Structure and Function.” *Journal of Lipid Research*.
- Mahley, Robert W, Thomas L Innerarity, Stanley C Rall, and Karl H Weisgraber. 1984. “Plasma Lipoproteins: Apolipoprotein Structure and Function” 25.
- Marco, Kátia Cristina De. 2007. “Avaliação Da Exposição Ao Metilmercúrio e Dieta Rica Em Selênio Sobre Os Níveis de Óxido Nítrico Na População Da Região Amazônica Kátia Cristina De Marco,” Dissertação de Mestrado, 74p. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- Mercer, Jessica J., Lionel Bercovitch, and Jennie J. Muglia. 2012. “Acrodynia and Hypertension in a Young Girl Secondary to Elemental Mercury Toxicity Acquired in the Home.” *Pediatric Dermatology* 29 (2): 199–201. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2012.01737.x>.
- Mesquita Micaroni, Regina Clélia Da Costa, Maria Izabel Maretti Silveira Bueno, and Wilson De Figueiredo Jardim. 2000. “Compostos de Mercúrio. Revisão de Métodos de Determinação, Tratamento e Descarte.” *Quimica Nova*. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422000000400011>.
- Miranda, Márcio Rodrigues, Sergio Augusto Coelho-Souza, Jean Remy Daveé Guimarães, Raquel R S Correia, and Diana Oliveira. 2007. “Mercúrio em sistemas Aquáticos: Fatores Ambientais Que Afetam a Metilação.” *Oecologia Brasiliensis* 11 (2): 240–51. <https://doi.org/10.4257/oeco.2007.1102.08>.
- Moreira, E. L., J. de Oliveira, M. F. Dutra, D. B. Santos, C. A. Goncalves, E. M. Goldfeder, A. F. de Bem, R. D. Prediger, M. Aschner, and M. Farina. 2012. “Does Methylmercury-Induced Hypercholesterolemia Play a Causal Role in Its Neurotoxicity and

- Cardiovascular Disease?” *Toxicological Sciences* 130 (2): 373–82.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs252>.
- Mutter, Joachim, Johannes Naumann, and Corina Guethlin. 2007. “Comments on the Article ‘The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds’ by Clarkson and Magos (2006).” *Critical Reviews in Toxicology* 37 (6): 537–49.
<https://doi.org/10.1080/10408440701385770>.
- Naganuma, Akira, Yūko Koyama, and Nobumasa Imura. 1980. “Behavior of Methylmercury in Mammalian Erythrocytes.” *Topics in Catalysis* 54 (3): 405–10.
[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(80\)90167-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(80)90167-2).
- Nakajima, Katsuyuki, Takamitsu Nakano, Yoshiharu Tokita, Takeaki Nagamine, Akihiro Inazu, Junji Kobayashi, Hiroshi Mabuchi, et al. 2011. “Postprandial Lipoprotein Metabolism: VLDL vs Chylomicrons.” *Clinica Chimica Acta*.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.018>.
- Nam, Douglas, Chih Wen Ni, Amir Rezvan, Jin Suo, Klaudia Budzyn, Alexander Llanos, David G. Harrison, Don P. Giddens, and Hanjoong Jo. 2010. “A Model of Disturbed Flow-Induced Atherosclerosis in Mouse Carotid Artery by Partial Ligation and a Simple Method of Rna Isolation from Carotid Endothelium.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 40. <https://doi.org/10.3791/1861>.
- Nathan and, Lauren, and Gautam Chaudhuri. 1997. “ESTROGENS AND ATHEROSCLEROSIS.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37 (1): 477–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.477>.
- Nelson, David L., Cox, Michael M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 2014. 6ª Ed. Artmed, São Paulo. 1296 p.
- Newcomer, Marcia E., and Alan R. Brash. 2015. “The Structural Basis for Specificity in Lipoxygenase Catalysis.” *Protein Science*. Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1002/pro.2626>.
- Nofer, Jerzy Roch, Beate Kehrel, Manfred Fobker, Bodo Levkau, Gerd Assmann, and Arnold Von Eckardstein. 2002. “HDL and Arteriosclerosis: Beyond Reverse Cholesterol Transport.” *Atherosclerosis*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00651-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00651-7).
- Oliveira, Helena C.F., and Anibal E. Vercesi. 2019. “Mitochondrial Bioenergetics and Redox Dysfunctions in Hypercholesterolemia and Atherosclerosis.” *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100840>.
- Oliveira, Vitor Antunes, Gaia Favero, Alessandra Stacchiotti, Lorena Giugno, Barbara Buffoli, Claudia Sirlene de Oliveira, Antonio Lavazza, et al. 2017. “Acute Mercury

- Exposition of Virgin, Pregnant, and Lactating Rats: Histopathological Kidney and Liver Evaluations.” *Environmental Toxicology* 32 (5): 1500–1512.
<https://doi.org/10.1002/tox.22370>.
- Park, Sung Kyun, Sunghee Lee, Niladri Basu, and Alfred Franzblau. 2013. “Associations of Blood and Urinary Mercury with Hypertension in U.S. Adults: The NHANES 2003–2006.” *Environmental Research* 123 (May): 25–32.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.02.003>.
- Peters, Owen M., Mehdi Ghasemi, and Robert H. Brown. 2015. “Emerging Mechanisms of Molecular Pathology in ALS.” *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI71601>.
- Petranich, Elisa, Stefano Covelli, Alessandro Acquavita, Jadran Faganeli, Milena Horvat, and Marco Contin. 2018. “Evaluation of Mercury Biogeochemical Cycling at the Sediment–Water Interface in Anthropogenically Modified Lagoon Environments.” *Journal of Environmental Sciences (China)* 68 (June): 5–23.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.11.014>.
- Ratcliffe, H. E., G. M. Swanson, and L. J. Fischer. 1996. “Human Exposure to Mercury: A Critical Assessment of the Evidence of Adverse Health Effects.” *Journal of Toxicology and Environmental Health* 49 (3): 221–70.
<https://doi.org/10.1080/00984108.1996.11667600>.
- Richter, Rebecca J., Gail P. Jarvik, and Clement E. Furlong. 2009. “Paraoxonase 1 (PON1) Status and Substrate Hydrolysis.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 235 (1): 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.11.001>.
- Rumbold, Darren G., Christopher T. Lienhardt, and Michael L. Parsons. 2018. “Mercury Biomagnification Through a Coral Reef Ecosystem.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 75 (1): 121–33. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0523-0>.
- Salonen, Jukka T., Kari Seppänen, Kristiina Nyyssönen, Heikki Korpela, Jussi Kauhanen, Marjatta Kantola, Jaakko Tuomilehto, Hermann Esterbauer, Franz Tatzber, and Riitta Salonen. 1995. “Intake of Mercury from Fish, Lipid Peroxidation, and the Risk of Myocardial Infarction and Coronary, Cardiovascular, and Any Death in Eastern Finnish Men.” *Circulation* 91 (3): 645–55. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.91.3.645>.
- Samson, Rohan, Abhishek Jaiswal, Pierre V Ennezat, Mark Cassidy, and Thierry H Le Jemtel. 2016. “Clinical Phenotypes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.” *Journal of the American Heart Association* 5 (1).

- <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002477>.
- Sanfeliu, Coral, Jordi Sebastià, Rosa Cristàfol, and Eduard Rodríguez-Farré. 2003. "Neurotoxicity of Organomercurial Compounds." *Neurotoxicity Research* 5 (4): 283–306. <https://doi.org/10.1007/BF03033386>.
- Schaefer, Ernst J., Marie C. Audelin, Judith R. McNamara, Paulesh K. Shah, Timothy Tayler, Jennifer A. Daly, Joi L. Augustin, Leo J. Seman, and Joel J. Rubenstein. 2001. "Comparison of Fasting and Postprandial Plasma Lipoproteins in Subjects with and without Coronary Heart Disease." *American Journal of Cardiology* 88 (10): 1129–33. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(01\)02047-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(01)02047-1).
- Şener, Göksel, A. Özer Şehirli, and Gül Ayanoğlu-Dülger. 2003. "Melatonin Protects Against Mercury(II)-Induced Oxidative Tissue Damage in Rats." *Pharmacology and Toxicology* 93 (6): 290–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.2003.pto930607.x>.
- Sodhi, Komal, Krithika Srikanthan, Perrine Goguet-Rubio, Alexandra Nichols, Amrita Mallick, Athar Nawab, Rebecca Martin, et al. 2017. "PNaKtide Attenuates Steatohepatitis and Atherosclerosis by Blocking Na/K-ATPase/ROS Amplification in C57Bl6 and ApoE Knockout Mice Fed a Western Diet." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00306-5>.
- Soran, Handrean, Nahla N. Younis, Valentine Charlton-Menys, and Paul Durrington. 2009. "Variation in Paraoxonase-1 Activity and Atherosclerosis." *Current Opinion in Lipidology*. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32832ec141>.
- Spiller, Henry A. 2018. "Rethinking Mercury: The Role of Selenium in the Pathophysiology of Mercury Toxicity." *Clinical Toxicology*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1400555>.
- Stachowicz, Aneta, Anna Wiśniewska, Katarzyna Kuś, Anna Kiepusa, Anna Gębska, Mariusz Gajda, Magdalena Białas, et al. 2019. "The Influence of Trehalose on Atherosclerosis and Hepatic Steatosis in Apolipoprotein E Knockout Mice." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (7): 1552. <https://doi.org/10.3390/ijms20071552>.
- Suda, I, and K Hirayama. 1992. "Degradation of Methyl and Ethyl Mercury into Inorganic Mercury by Hydroxyl Radical Produced from Rat Liver Microsomes." *Archives of Toxicology* 66 (6): 398–402. <https://doi.org/10.1007/bf02035129>.
- Sviridov, Dmitri, and Paul Nestel. 2002. "Dynamics of Reverse Cholesterol Transport: Protection against Atherosclerosis." *Atherosclerosis*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00677-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00677-3).
- Takahashi, Tetsuya, and Takayoshi Shimohata. 2019. "Vascular Dysfunction Induced by

- Mercury Exposure.” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (10).
<https://doi.org/10.3390/ijms20102435>.
- Tanaka-Kagawa, T, A Naganuma, and N Imura. 1993. “Tubular Secretion and Reabsorption of Mercury Compounds in Mouse Kidney.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 264 (2): 776–82.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8094752>.
- Tangirala, R. K., E. M. Rubin, and W. Palinski. 1995. “Quantitation of Atherosclerosis in Murine Models: Correlation between Lesions in the Aortic Origin and in the Entire Aorta, and Differences in the Extent of Lesions between Sexes in LDL Receptor-Deficient and Apolipoprotein E-Deficient Mice.” *Journal of Lipid Research* 36 (11): 2320–28.
- Terasaki, Michishige, Munenori Hiromura, Yusaku Mori, Kyoko Kohashi, Masaharu Nagashima, Hideki Kushima, Takuya Watanabe, and Tsutomu Hirano. 2015. “Amelioration of Hyperglycemia with a Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Prevents Macrophage-Driven Atherosclerosis through Macrophage Foam Cell Formation Suppression in Type 1 and Type 2 Diabetic Mice.” *PLoS ONE* 10 (11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143396>.
- Teupser, Daniel, Adam D. Persky, and Jan L. Breslow. 2003. “Induction of Atherosclerosis by Low-Fat, Semisynthetic Diets in LDL Receptor-Deficient C57BL/6J and FVB/NJ Mice: Comparison of Lesions of the Aortic Root, Brachiocephalic Artery, and Whole Aorta (En Face Measurement).” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (10): 1907–13. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000090126.34881.B1>.
- Ullrich, Susanne M., Trevor W. Tanton, and Svetlana A. Abdrashitova. 2001. “Mercury in the Aquatic Environment: A Review of Factors Affecting Methylation.” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 31 (3): 241–93.
<https://doi.org/10.1080/20016491089226>.
- Vasconcelos, Nathalia M. de, Nina Van Opdenbosch, and Mohamed Lamkanfi. 2016. “Inflammasomes as Polyvalent Cell Death Platforms.” *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2204-3>.
- Venegas-Pino, Daniel E., Andrew Lagrotteria, Pei Wen Wang, Jaiya Morphet, Cassaundra Clapdorp, Yuanyuan Shi, and Geoff H. Werstuck. 2018. “Evidence of Extensive Atherosclerosis, Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction in the ApoE^{-/-}:Ins2^{+/+}Akita Mouse Fed a Western Diet.” *Atherosclerosis* 275: 88–96.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.044>.

- Virtanen, Jyrki K., Tiina H. Rissanen, Sari Voutilainen, and Tomi Pekka Tuomainen. 2007. "Mercury as a Risk Factor for Cardiovascular Diseases." *Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (2): 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.05.001>.
- Watson, Karol E., Kristina Boström, Raji Ravindranath, Thach Lam, Brent Norton, and Linda L. Demer. 1994. "TGF-B1 and 25-Hydroxycholesterol Stimulate Osteoblast-like Vascular Cells to Calcify." *Journal of Clinical Investigation* 93 (5): 2106–13. <https://doi.org/10.1172/JCI117205>.
- Wells, Ellen M., Julie B. Herbstman, Yu Hong Lin, Joseph R. Hibbeln, Rolf U. Halden, Frank R. Witter, and Lynn R. Goldman. 2017. "Methyl Mercury, but Not Inorganic Mercury, Associated with Higher Blood Pressure during Pregnancy." *Environmental Research* 154: 247–52. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.013>.
- World Health Organization. The Environmental, and Health Criteria. 1990. "Environmental Health Criteria 101: Methylmercury." *Environmental Health Criteria*, no. 101: 1–144.
- World Health Organization. Cardiovascular diseases. 2013. "2013-2020 Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases" 1-55.
- Wildemann, Tanja M., Naghmeh Mirhosseini, Steven D. Siciliano, and Lynn P. Weber. 2015. "Cardiovascular Responses to Lead Are Biphasic, While Methylmercury, but Not Inorganic Mercury, Monotonically Increases Blood Pressure in Rats." *Toxicology* 328 (February): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.009>.
- Wouters, Kristiaan, Ronit Shiri-Sverdlov, Patrick J. van Gorp, Marc van Bilsen, and Marten H. Hofker. 2005. "Understanding Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Lessons from Genetically Modified Apoe and Ldlr Mice." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.085>.
- Xu, Yi Yuan, Ling Xia Zeng, Tian Rong He, Meng Yu Chen, Xiao Li Qian, and Zhen Ji Li. 2018. "Mercury Distribution of Benthonic Animals and Response to Mercury in Sediments in Caohai Wetland, Guizhou Province." *Huanjing Kexue/Environmental Science* 39 (6): 2953–62. <https://doi.org/10.13227/j.hjlx.201709259>.
- Yang, Lixin, Yuanyuan Zhang, Feifei Wang, Zidie Luo, Shaojuan Guo, and Uwe Strähle. 2020. "Toxicity of Mercury: Molecular Evidence." *Chemosphere*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586>.
- Yang, Min Hee, Sang Hoon Jung, Gautam Sethi, and Kwang Seok Ahn. 2019. "Pleiotropic Pharmacological Actions of Capsazepine, a Synthetic Analogue of Capsaicin, against Various Cancers and Inflammatory Diseases." *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24050995>.

- Yoshizawa, Kazuko, Eric B. Rimm, J. Steven Morris, Vickie L. Spate, Chung cheng Hsieh, Donna Spiegelman, Meir J. Stampfer, and Walter C. Willett. 2002. "Mercury and the Risk of Coronary Heart Disease in Men." *New England Journal of Medicine* 347 (22): 1755–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021437>.
- Zhang, Yuxi, Cheng Xu, Zhi Fu, Yaqin Shu, Jie Zhang, Changgui Lu, and Xuming Mo. 2018. "Associations between Total Mercury and Methyl Mercury Exposure and Cardiovascular Risk Factors in US Adolescents." *Environmental Science and Pollution Research* 25 (7): 6265–72. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0905-2>.