

Efeitos da Exposição Crônica ao Mercúrio sobre a Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina e Estresse Oxidativo em Ratos Normotensos e Hipertensos

Effects of Chronic Exposure to Mercury on Angiotensin-Converting Enzyme Activity and Oxidative Stress in Normotensive and Hypertensive Rats

Dalton Valentim Vassallo,^{1,2} Maylla Ronacher Simões,¹ Karina Giuberti,¹ Bruna Fernandes Azevedo,¹ Rogerio Faustino Ribeiro Junior,¹ Mercedes Salaiques,^{3,4} Ivanita Stefanon¹

Departamento de Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Espírito Santo,¹ Vitória, ES – Brasil

Centro de Ciências da Saúde de Vitória - Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM),² Vitória, ES – Brasil

Departamento de Farmacologia - Universidade Autónoma de Madri – Espanha Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Paz,³ Madri – Espanha CIBER de Enfermidades Cardiovasculares,⁴ Madri – Espanha

Resumo

Fundamento: Os efeitos deletérios do mercúrio estão associados ao risco cardiovascular aumentado.

Objetivo: Determinar se a exposição crônica ao mercúrio inorgânico aumenta a atividade da enzima conversora de angiotensina e sua relação com o estresse oxidativo em vários órgãos e tecidos.

Métodos: Estudamos ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (3 meses de idade) expostos ou não a HgCl₂ por 30 dias. Ao final do tratamento, investigamos: alterações de peso, parâmetros hemodinâmicos, atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e estresse oxidativo no coração, aorta, pulmão, cérebro e rim de animais hipertensos comparados a animais normotensos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados: A exposição crônica ao HgCl₂ não afetou o ganho de peso em nenhum dos grupos. A pressão arterial sistólica, medida semanalmente, não aumentou em ratos Wistar, mas mostrou um pequeno aumento nos ratos SHR. Também observamos aumentos na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e na atividade da ECA no plasma e no coração de ratos normotensos. No grupo SHR + Hg, a atividade da ECA aumentou no plasma, mas diminuiu no rim, pulmão, coração, cérebro e aorta. O estresse oxidativo foi avaliado indiretamente pela produção de MDA, que aumentou nos ratos tratados com Hg tanto no plasma quanto no coração. No grupo SHR + Hg, o MDA aumentou no coração e na aorta e diminuiu nos pulmões e no cérebro.

Conclusão: Estes resultados sugerem que a exposição crônica ao mercúrio inorgânico agrava a hipertensão e produz mudanças mais expressivas na atividade da ECA e no estresse oxidativo em SHRs. Essa exposição afeta o sistema cardiovascular, representando um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares em ratos normotensos e para piorar riscos pré-existentes para hipertensão. (Arq Bras Cardiol. 2018; [online].ahead print, PP.0-0)

Palavras-chave: Intoxicação por Mercúrio; Estresse Oxidativo; Peptidil Dipeptidase A; Hipertensão; Ratos.

Abstract

Background: Mercury's deleterious effects are associated with increased cardiovascular risk.

Objective: To determine whether chronic exposure to inorganic mercury increases the activity of angiotensin-converting enzyme and its relationship with oxidative stress in several organs and tissues.

Methods: We studied male Wistar and spontaneously hypertensive rats (SHR) (3-month-old) exposed or not to HgCl₂ for 30 days. At the end of treatment, we investigated the following: changes in body weight, hemodynamic parameters, angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and oxidative stress in the heart, aorta, lung, brain and kidney in hypertensive compared to normotensive animals. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results: Chronic exposure to HgCl₂ did not affect weight gain in either group. Systolic blood pressure, measured weekly, did not increase in Wistar rats but showed a small increase in SHR rats. We also observed increases in left ventricular end-diastolic pressure and ACE activity in the plasma and hearts of normotensive rats. In the SHR+Hg group, ACE activity increased in plasma but decreased in kidney, lung, heart, brain and aorta. Oxidative stress was assessed indirectly by malondialdehyde (MDA) production, which increased in Hg-treated rats in both plasma and heart. In the SHR+Hg group, MDA increased in heart and aorta and decreased in lungs and brain.

Conclusion: These results suggest that chronic exposure to inorganic mercury aggravates hypertension and produces more expressive changes in ACE activity and oxidative stress in SHRs. Such exposure affects the cardiovascular system, representing a risk factor for the development of cardiovascular disorders in normotensive rats and worsening of pre-existing risks for hypertension. (Arq Bras Cardiol. 2018; [online].ahead print, PP.0-0)

Keywords: Mercury Poisoning; Oxidative Stress/radiation effects; Peptidyl-Dipeptidase A; Hypertension; Rats

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Maylla Ronacher Simões •

Departamento de Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Espírito Santo - Av. Marechal Campos, 1468. CEP 29043-900, Maruípe, Vitória, ES – Brasil

E-mail: yllars@hotmail.com, mayllaronacher@gmail.com

Artigo recebido em 27/04/2018, revisado em 04/07/2018, aceito em 02/08/2018

DOI: 10.5935/abc.20180271

Introdução

O mercúrio é um metal tóxico que causa vários efeitos deletérios ao sistema cardiovascular. Níveis sanguíneos em torno de 8 ng/mL são encontrados em indivíduos expostos,^{1,2} o que pode ter uma relação com o desenvolvimento da hipertensão.³

Vários estudos demonstraram que o mercúrio induz estresse oxidativo e pode causar danos a órgãos e sistemas.⁴⁻⁹ Além disso, estudos mostraram associação entre exposição aumentada ao mercúrio e doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, aterosclerose carotídea, infarto do miocárdio e doença arterial coronariana.^{10,11} Ainda, o estresse oxidativo parece ser um mecanismo eficiente para a geração de lipoproteína de baixa densidade oxidada, e subsequentemente aterosclerose;^{12,13} a produção subsequente de produtos finais da glicação avançada e a participação de células inflamatórias promovem a manutenção da injúria vascular.¹⁴

Um dos principais efeitos deletérios do mercúrio é a geração de radicais livres de oxigênio. O estímulo da NADPH oxidase e da ciclooxigenase (COX) induzido pelo mercúrio pode estimular a síntese de espécies reativas do oxigênio (EROs).^{11,15,16} Ainda, em modelos animais, a exposição crônica ao mercúrio por 30 dias promoveu disfunção da contratilidade em corações isolados, resultante de atividade reduzida Na⁺-K⁺-ATPase (NKA), redução na atividade do trocador de sódio e cálcio NCX e de ATPases transportadoras de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA), e aumento na expressão da proteína fosfolambano (PLB).¹⁷ Apesar de nenhum efeito ter sido relatado do mercúrio sobre a pressão arterial, frequência cardíaca ou pressão sistólica do ventrículo esquerdo, o mercúrio causa um pequeno aumento na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo em ratos.¹⁷

Além disso, a nível vascular, a resposta vasoconstritora à fenilefrina aumentou nas artérias caudal, mesentérica, coronária e aorta de ratos, efeitos comumente relacionados a menor biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e estresse oxidativo aumentado.^{4,18,19} Ao interagir com NO, o ânion superóxido (O₂⁻) forma peroxinitrito, diminuindo a disponibilidade de NO para o relaxamento de músculo liso.²⁰⁻²²

Em estudo prévio,¹⁸ relatamos que a administração de mercúrio aumenta a atividade local da enzima conversora da angiotensina (ECA),¹⁸ liberando-se mais angiotensina II, a qual aumenta a produção de radicais livres.²³ Esses resultados mostram que os efeitos do mercúrio sobre a pressão sanguínea podem ser dependentes da produção de angiotensina II, e estar envolvidos na geração de estresse oxidativo. Estudos anteriores mostraram que o mercúrio pode aumentar a atividade local da ECA e estresse oxidativo com subsequente dano oxidativo em vários órgãos e sistemas,^{5,11,24-27} mas os efeitos *in vivo* da exposição crônica ao mercúrio sobre a atividade cardiovascular ainda não foram completamente esclarecidos.

Ainda, estudos sobre os efeitos do mercúrio têm focado principalmente o sistema cardiovascular de animais normotensos. Contudo, há pouca informação sobre os efeitos crônicos de baixas doses de mercúrio inorgânico sobre a atividade da ECA em órgãos e tecidos de animais normotensos e hipertensos. Para investigar esses efeitos, níveis aumentados de mercúrio foram induzidos a concentrações similares às observadas em indivíduos expostos ao metal. Portanto, nosso

objetivo foi determinar se a exposição crônica ao mercúrio inorgânico aumenta a atividade da ECA, e a relação dessa exposição com estresse oxidativo no coração, artéria aorta, pulmão, cérebro e rim em ratos hipertensos em comparação a animais normotensos.

Métodos

Animais

Ratos Wistar machos, de três meses de idade e ratos espontaneamente hipertensos (do inglês, *spontaneously hypertensive rats*, SHR) foram obtidos de colônias conservadas no biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Durante o tratamento, os ratos foram mantidos sob temperatura ambiente e umidade constantes, e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os animais tinham acesso livre à água e à ração padronizada. Todos os experimentos foram conduzidos seguindo-se as diretrizes para pesquisa biomédica (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA) e as diretrizes para o cuidado e uso de animais em laboratório dos Institutos Nacionais da Saúde (NIH – *National Institutes of Health*). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Brasil (CEUA-EMESCAM 003/2007). Ratos Wistar e SHRs foram divididos em quatro grupos: ratos Wistar controles (n = 6) e SHRs (n = 9) tratados com veículo (solução salina, intramuscular) e ratos Wistar (n = 8) e SHR (n = 9) tratados com cloreto de mercúrio (HgCl₂) por 30 dias (primeira dose 4,6 µg/kg, dose subsequente 0,07 µg/kg/dia, intramuscular, para cobrir perdas diárias). Utilizamos o modelo descrito por Wiggers et al.,⁴ para atingir concentrações sanguíneas (7,97 ng/mL) similares àquelas observadas em indivíduos expostos.

Medidas de pressão sanguínea

Pressão sistólica indireta foi medida no início e no final do tratamento utilizando o pletismógrafo de cauda (IITC Life Science Inc.). Para essa medida, ratos conscientes foram mantidos por 5-10 minutos em uma sala quente e quieta, e submetidos a ciclos de inflação e deflação do manguito por um operador treinado. Em seguida, foi medida pressão arterial sistólica, e a média de três medidas foi registrada.

Medidas dos parâmetros hemodinâmicos

No final do tratamento, ratos controle e tratados com HgCl₂ (n = 26) foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, Sigma, St Louis, MO, EUA). Implantou-se um cateter de polietileno (PE50/Clay-Adams) com salina heparinizada (50 U/mL) na artéria carótida para medir a pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD). O cateter na artéria carótida foi introduzido no ventrículo esquerdo. Foi introduzido um cateter na veia jugular até o ventrículo direito, para medidas da pressão sistólica ventricular esquerda e direita (PSVE e PSVD) e as derivadas temporais positivas e negativas (+dP/dt e -dP/dt, respectivamente), bem como a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) e direito (PDFVD). Os registros foram realizados durante 30 minutos com um transdutor de pressão (TSD 104A-Biopac) e com um programa

computacional e interface para coleta de dados (MP100A, Biopac System, Inc., Santa Barbara, CA, EUA). A frequência cardíaca (FC) foi determinada nos intervalos entre batimentos.

Medida da produção de malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA no plasma, coração, aorta, rim e pulmões foram medidos utilizando-se o teste de ácido tiobarbitúrico (TBA) modificado.²⁸ Amostras do plasma de tecidos foram misturadas com ácido tricloroacético 20% em HCl 0.6 M (1:1, v/v); os tubos foram mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar componentes do plasma e evitar possíveis interferências. As amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 15 minutos antes de se adicionar TBA (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante em uma proporção de 1:5 (v/v); em seguida, a mistura foi aquecida a 97°C por 30 minutos. Foram obtidas medidas por espectrofotometria a 535 nm a 20°C.

Teste da atividade da ECA

A atividade da ECA foi medida no plasma, coração, artéria aorta, cérebro, rim, e pulmões pelo método fluorométrico adaptado de Friedland e Silverstein.²⁹ Em resumo, amostras de tecido e de plasma em triplicata foram incubadas por 15-90 minutos a 37°C com 40 µL de tampão do ensaio contendo o substrato da ECA 5 mM Hip-His-Leu (Sigma). A reação foi interrompida pela adição de 190 µL de 0,35 M HCl. O produto gerado, His-Leu, foi medido por fluorometria após 10 minutos de incubação com 100 µL de o-ftalaldeído 2% em metanol. As medidas de fluorescência foram obtidas a 37% em um leitor de placa FLUOstar Optima (BMG Labtech, Ofenbugo, Alemanha), com excitação de 350 nm e filtros de emissão 520 nm. O leitor de placa de fluorescência foi controlado utilizando-se o programa FLUOstar Optima. Microplacas de poliestireno de 96 poços (Biogen Científica, Madri, Espanha) foram usadas. Uma curva de calibração com ECA de pulmão de coelho (Sigma) foi incluída em cada placa.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± DP. Todos os parâmetros foram testados quanto à normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov para uma amostra. As diferenças foram analisadas pelo teste ANOVA de um fator (one-way

ANOVA), seguido do teste post-hoc de Tukey (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

No trigésimo dia de tratamento com mercúrio, os ratos Wistar controle, ratos Wistar tratados, SHRs tratados e não tratados apresentavam peso corporal similares, apesar de os SHRs apresentarem menor peso em comparação aos ratos Wistar (Tabela 1).

A Tabela 1 também mostra que o peso de vários órgãos, normalizado pelo peso corporal, foi similar, incluindo cérebro, coração, rim e pulmões, fato que não mudou após o tratamento com mercúrio.

PAS indireta no dia zero em ratos acordados mostrou que SHRs apresentaram maior pressão arterial média em comparação a ratos Wistar (Tabela 2). No entanto, ao final do tratamento, o mercúrio produziu aumento significativo da pressão arterial nos SHRs tratados com HgCl₂ (Tabela 2).

Valores de pressão arterial, pressão ventricular e seus respectivos derivados, bem como as medidas de FC nos ratos anestesiados não foram diferentes entre os grupos (Tabela 3). Porém, a PDFVE aumentou após o tratamento com mercúrio no grupo Wistar, em concordância com o descrito anteriormente.¹⁷

Estudos prévios com animais e humanos relataram que o mercúrio aumenta a síntese de radicais livres, levando ao estresse oxidativo.^{4,24,30,31} Em seguida, avaliamos o estado oxidante no sangue e em vários outros tecidos pela medida dos níveis de MDA (Tabela 4). Níveis plasmáticos de MDA foram maiores nos ratos Wistar tratados com mercúrio em comparação àqueles não tratados, mas não houve diferença entre SHRs tratados e não tratados com mercúrio. Mercúrio aumentou os níveis de MDA no coração de ratos Wistar e SHRs. Na aorta, diferentemente do plasma, os níveis de MDA foram maiores nos SHRs tratados com mercúrio, mas não nos ratos Wistar. Em relação a cérebro e pulmões, nenhuma diferença foi observada nos níveis de MDA nos ratos Wistar tratados e não tratados com mercúrio; nos SHRs, contudo, a intervenção com mercúrio reduziu os níveis de MDA nesses órgãos. Nos rins, o tratamento com mercúrio reduziu os níveis de MDA nos ratos tratados com mercúrio, Wistar e SHRs.

Tabela 1 – Peso corporal (PC), Cérebro/PC, Coração/PC, Rim/PC, Pulmão/PC, Adrenais/PC, Baço/PC e Fígado/PC de ratos Wistar tratados com HgCl₂ e ratos não tratados e ratos espontaneamente hipertensos (SHRs: *spontaneously hypertensive rats*)

	Wistar controles n = 6	Wistar tratados com HgCl ₂ n = 8	SHRs controles n = 9	SHR tratados com HgCl ₂ n = 9
Peso corporal (PC) (g)	399 ± 58,3	384 ± 18,1	216 ± 20,1 ^{††}	222 ± 14,4 ^{††}
Cérebro/PC (mg/g)	4,58 ± 0,7	4,69 ± 0,5	7,48 ± 0,7 ^{††}	7,41 ± 0,5 ^{††}
Coração/PC (mg/g)	3,06 ± 0,6	3,43 ± 0,2	3,77 ± 0,2	3,81 ± 0,2
Rim/PC (mg/g)	6,44 ± 1,7	6,53 ± 0,5	6,78 ± 0,3	6,80 ± 0,6
Pulmão/PC (mg/g)	3,97 ± 1,5	4,53 ± 0,6	6,48 ± 1,2 ^{††}	7,91 ± 1,2 ^{††}

Resultados representam média ± DP; n: número de animais usados. One-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. ^{††}p < 0,05 em comparação a Wistar controles e [†]p < 0,05 em comparação a ratos Wistar tratados com HgCl₂.

Tabela 2 – Valores de pressão arterial sistólica (PAS em mmHg) medidos por pletismógrafo de cauda em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHRs: *spontaneously hypertensive rats*) antes e após tratamento com HgCl₂ por 30 dias

	Wistar CT n = 5	Wistar Hg n = 5	SHR CT n = 5	SHR Hg n = 5
PAS – Dia 0 (mmHg)	123 ± 13	131 ± 15	205 ± 15	198 ± 22
PAS – Dia 7 (mmHg)	119 ± 4	132 ± 9	221 ± 18	197 ± 18
PAS – Dia 14 (mmHg)	115 ± 10	135 ± 9	219 ± 9	199 ± 29
PAS – Dia 21 (mmHg)	132 ± 17	142 ± 14	200 ± 13	199 ± 9
PAS – Dia 30 (mmHg)	117 ± 6	143 ± 11	220 ± 21	232 ± 19 [#]

Resultados representam média ± DP; n: número de animais usados. One-way ANOVA, teste post hoc de Tukey para todos os grupos. [#] p < 0,05 vs. SHR tratado com mercúrio no dia 0

Tabela 3 – Parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHRs, *spontaneously hypertensive rats*) tratados com mercúrio (HgCl₂)

	Wistar Controles n = 6	Wistar tratados com HgCl ₂ n = 7	SHR Controles n = 6	SHRs tratados com HgCl ₂ n = 7
PAS (mmHg)	105 ± 10	97 ± 11	105 ± 7	113 ± 8
PAD (mmHg)	71 ± 10	67 ± 11	58 ± 5	68 ± 11
FC (bpm)	324 ± 88	325 ± 58	343 ± 32	341 ± 34
PSVE (mmHg)	114 ± 20	107 ± 16	117 ± 22	112 ± 8
PDFVE (mmHg)	0,256 ± 1	3,31 ± 1*	1,11 ± 0,2	0,493 ± 0,5
+dP/dt VE (mmHg/s)	8627 ± 3378	8500 ± 2419	7360 ± 1854	7001 ± 1921
-dP/dt VE	-6270 ± 1232	-6249 ± 1234	-7169 ± 1173	-6524 ± 1131
PSVD (mmHg)	32 ± 10	29 ± 5	29 ± 5	33 ± 5
PDFVD (mmHg)	-1,080 ± 1	1,10 ± 2	-0,472 ± 1	0,459 ± 0,3
+dP/dt VD (mmHg/s)	3339 ± 2202	1758 ± 435	2776 ± 1056	2171 ± 405
-dP/dt VD (mmHg/s)	-2560 ± 1553	-1387 ± 469	-1833 ± 478	-1695 ± 368

Mudanças na pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo direito e esquerdo (PSVD e PSVE, respectivamente), pressão diastólica final do ventrículo direito e esquerdo (PDFVD e PDFVE, respectivamente), e primeiras derivadas temporais positiva e negativa (-dP/dt, respectivamente), do ventrículo direito e esquerdo de ratos controles e ratos tratados com mercúrio. Resultados representam média ± DP. N: número de ratos. One-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. *p < 0,05 vs. Wistar controles.

Uma vez que a angiotensina II parece aumentar os níveis de EROs, e que o mercúrio aumenta a atividade da ECA,^{32,33} investigamos se a atividade da ECA foi alterada após 30 dias de tratamento com mercúrio nos animais Wistar e SHRs. A Tabela 5 mostra que a atividade da ECA aumentou em ambos os grupos após o tratamento com mercúrio. Nos corações dos ratos Wistar, o mercúrio causou um pequeno aumento na atividade da ECA, mas não foram observadas mudanças na aorta, nos pulmões, no cérebro ou nos rins. No entanto, em SHRs tratados com mercúrio, a atividade da ECA foi reduzida no coração, aorta, pulmões, cérebro e rins. Um resultado interessante foi o fato de atividade da ECA ser maior no coração, aorta e rins, e mais baixa no plasma de SHRs controle em comparação a ratos Wistar controles.

Discussão

Os resultados aqui apresentados sugerem que os ratos Wistar e os SHRs, submetidos à exposição crônica ao mercúrio inorgânico por 30 dias apresentam concentrações sanguíneas similares a de seres humanos expostos ao metal.^{1,2} Além disso, SHR, mas não ratos Wistar tratados com HgCl₂, apresentaram

pressão sanguínea aumentada no final do tratamento. A intervenção também teve influência sobre a atividade da ECA e o stress oxidativo, aumentando-os ou diminuindo-os, principalmente em SHRs.

Estudos prévios relataram que mudanças resultantes da exposição crônica ao mercúrio abordaram seus efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular e associações com hipertensão, aterosclerose carotídea, infarto do miocárdio e doença arterial coronariana.^{9,10,34} A exposição ao mercúrio, tanto agudo como crônico, afeta o coração e a função endotelial, reduzindo a biodisponibilidade de NO e aumentando as atividades de ECA e NADPH.^{15,18,19} Além disso, experimentos com ratos demonstraram que o ganho de peso corporal e a pressão arterial não foram afetados com a exposição crônica,^{4,17} sugerindo que tal intervenção não foi suficiente, quanto à quantidade ou ao tempo, para produzir mudanças. Nossos resultados reproduziram esses achados, mostrando ausência de mudanças no peso corporal; ainda, comportamento similar foi observado para coração, cérebro, rins, e pulmão, reforçando a hipótese de que esse tratamento não seja suficiente para produzir tais mudanças, apesar de um início de alteração na função cardiovascular.

Tabela 4 – Concentrações de malondialdeído (MDA) no plasma, coração, aorta, pulmões, cérebro e rins de ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHRs, *spontaneously hypertensive rats*) tratados com mercúrio (HgCl₂) e não tratados

	Wistar Controles n = 6	Wistar tratados com HgCl ₂ - n = 6	SHR Controles n = 6	SHRs tratados com HgCl ₂ n = 7
Plasma	0,93 ± 0,15	1,28 ± 0,44*	0,89 ± 0,22	0,92 ± 0,05
Coração	0,22 ± 0,03	0,28 ± 0,03*	0,45 ± 0,05	0,55 ± 0,05 [§]
Aorta	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,05	0,96 ± 0,27	1,51 ± 0,37 [§]
Pulmões	0,18 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,12 ± 0,03 [§]
Cérebro	0,13 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,54 ± 0,07	0,34 ± 0,03 [§]
Rins	0,38 ± 0,07	0,14 ± 0,03*	0,96 ± 0,07	0,51 ± 0,03 [§]

Valores expressos em mM/mg de proteína (MDA). Resultados representam média ± DP. N: número de animais. One-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. *p < 0,05 vs Wistar controles e [§]p < 0,05 vs SHRs controles.

Tabela 5 – Níveis de atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma, coração, aorta, pulmões, e rins de ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHRs, *spontaneously hypertensive rats*) tratados com mercúrio (HgCl₂) e não tratados

	Wistar Controles n = 6	Wistar tratados com HgCl ₂ - n = 6	SHR Controles n = 6	SHRs tratados com HgCl ₂ n = 6
Plasma	187 ± 39,2	235 ± 34,3*	114 ± 27,9*	163 ± 38,7 [§]
Coração	3,4 ± 0,5	4,1 ± 0,3*	17,9 ± 2,7*	14,8 ± 1,4 [§]
Aorta	213 ± 53,9	221 ± 61,3	670 ± 39,9*	535 ± 47,0 [§]
Pulmões	95 ± 6,1	99,4 ± 11,3	87,6 ± 5,4	75,1 ± 9,8 [§]
Cérebro	46,4 ± 7,9	42,6 ± 9,9	40,3 ± 5,6	27,8 ± 4,4 [§]
Rins	47,8 ± 16,2	45,4 ± 14,2	80,0 ± 15,4*	61,4 ± 6,9 [§]

Valores expressos em nmol/mL/min/mg de proteína em tecidos e nmol/mL de plasma/min no plasma (ACE). Resultados representam média ± DP. N: número de animais. One-way ANOVA, teste post hoc de Tukey. *p < 0,05 vs Wistar controles e [§]p < 0,05 vs SHRs controles.

Em relação à avaliação hemodinâmica, não foram observadas mudanças no ventrículo esquerdo ou direito em ambos os grupos. Observou-se somente um aumento na PDFVE nos ratos normotensos tratados com mercúrio, indicando que efeitos deletérios do mercúrio sobre a função ventricular.³⁵ Investigamos também a pressão ventricular direita devido a nossos achados prévios mostrando que, sob exposição aguda do mercúrio (0,5 mg/kg), houve um aumento na pressão sistólica ventricular direita devido à hipertensão pulmonar.^{3,36-39} Esses achados não foram observados com o tratamento crônico utilizado no presente estudo. O fato de que a atividade da ECA nos pulmões não ter sido afetada em ambos os grupos de ratos Wistar, apesar de ligeiramente reduzida nos SHRs tratados com HgCl₂ pode explicar por que a pressão ventricular direita manteve-se inalterada.

A redução da biodisponibilidade do NO é um marco, resultante do aumento da geração de EROs, contribuindo ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose e hipertensão.^{10,11,34} A interação do ânion superóxido com NO gera peroxinitrito que diminui a biodisponibilidade de NO, aumentando a reatividade vascular.²⁰⁻²² De fato, nossos estudos anteriores mostraram uma associação do mercúrio com aumento do estresse oxidativo e a redução da biodisponibilidade de NO.^{15,19} Ainda, foi demonstrado que um aumento da atividade local da ECA poderia aumentar a atividade de NADPH oxidase^{16,40} e EROs nas artérias aortas de ratos normotensos e de SHRs.

Assim, nós investigamos se os efeitos do mercúrio alteram o sistema renina-angiotensina e o estresse oxidativo em órgãos e tecidos de ratos hipertensos e normotensos. O aumento na atividade da ECA induzida pelo mercúrio poderia levar à atividade aumentada da NADPH oxidase, que, por sua vez, aumenta a liberação de EROs, gerando um estresse oxidativo, conforme observado no presente estudo.

Considerando que tanto o mercúrio como a atividade aumentada da ECA podem induzir o estresse oxidativo, devemos observar uma correlação entre o grau de estresse oxidativo e a atividade da ECA medida pelo MDA. Um fator interessante é que os níveis de atividade da ECA e as concentrações de MDA apresentaram comportamento similar no plasma e nos órgãos analisados. Ainda, deve-se destacar que tanto a atividade da ECA como concentrações de MDA apresentaram mudanças mais expressivas nos SHRs tratados com HgCl₂. De maneira similar, o tratamento com mercúrio inorgânico agravou hipertensão em SHRs, sugerindo que uma condição pré-existente de hipertensão melhora a ação do mercúrio inorgânico.

EROs estão reduzidas no plasma de todos os locais em que são produzidas e, conseqüentemente, espera-se um aumento nos níveis de MDA. Mostramos que a atividade da ECA aumenta após exposição aguda a baixas concentrações de mercúrio, e reduz após exposição a altas concentrações.^{18,39} No entanto, podemos especular que no grupo de SHRs, quando expostos ao mercúrio, nos tecidos que produzem

mais EROs, tais como aorta, pulmões e rins, a atividade da ECA está reduzida. Similarmente, no tecido cerebral, que concentra mercúrio, a atividade da ECA também está diminuída. Aumentos da PDFVE em ratos Wistar poderiam ser explicados pelo aumento local na atividade da ECA e no estresse oxidativo no coração. Esses dois fatores poderiam explicar o pequeno, mas significativo aumento na PDFVE, provavelmente induzido por uma sobrecarga de cálcio.

Embora não possamos dar uma explicação adequada para todos os eventos, pode-se sugerir que o mercúrio, mesmo em concentrações que não afetam a pressão arterial e o peso corporal em ratos normotensos, tem efeitos na atividade da ECA e no estresse oxidativo. Contudo, em animais hipertensos, as ações do mercúrio inorgânico foram mais expressivas. Esses achados levantam algumas questões que não foram abordadas no presente estudo: a exposição ao mercúrio inibiria a atividade da ECA em situações em que ela já se encontra aumentada? A atividade da ECA em diferentes órgãos depende da concentração de mercúrio em cada um deles? Uma doença cardiovascular pré-existente seria agravada pela exposição a mercúrio inorgânico? Essas questões podem ser consideradas limitações de nosso estudo, e questões para estudos futuros.

Conclusões

Os resultados aqui descritos nos permitem afirmar que a exposição crônica ao mercúrio inorgânico, similar ao descrito anteriormente, produz concentrações sanguíneas compatíveis àquelas encontradas em indivíduos expostos, e representa um fator de risco cardiovascular. Tal exposição influenciou a atividade da ECA, aumentou o estresse oxidativo e promoveu hipertensão em SHR (os quais apresentaram maior aumento na pressão sanguínea em comparação a SHR não tratados), bem como aumentou a PDFVE em ratos Wistar. Essa exposição controlada ao mercúrio afetou o sistema cardiovascular, causou mudanças mais expressivas da atividade da ECA e de

estresse oxidativo em SHR, representando um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em ratos normotensos e um fator contribuinte para aumentar riscos pré-existentes em condição de hipertensão.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Vassallo DV, Simões MR, Giuberti K, Stefanon I; obtenção de dados: Giuberti K, Azevedo BF, Ribeiro Junior RF; análise e interpretação dos dados e análise estatística: Vassallo DV, Simões MR, Giuberti K, Azevedo BF, Ribeiro Junior RF, Salaices M, Stefanon I; obtenção de financiamento: Vassallo DV, Salaices M; redação do manuscrito: Vassallo DV, Simões MR; revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Vassallo DV, Simões MR, Salaices M, Stefanon I.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPES, CAPES, CNPq, Ministério da Economia e Competitividade (SAF 2016-80305-P).

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Maylla Ronacher Simões pela Universidade Federal do Espírito Santo.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória sob o número de protocolo CEUA-EMESCAM 003/2007.

Referências

1. Gupta M, Bansal JK, Khanna CM. Blood mercury in workers exposed to the preparation of mercury cadmium telluride layers on cadmium telluride base. *Ind Health*. 1996;34(4):421-5.
2. Asgary S, Movahedian A, Keshvari M, Taleghani M, Sahebkar A, Sarrafzadegan N. Serum levels of lead, mercury and cadmium in relation to coronary artery disease in the elderly: a cross-sectional study. *Chemosphere*. 2017;180:540-4.
3. Torres AD, Rai AN, Hardiek ML. Mercury intoxication and arterial hypertension: report of two patients and review of the literature. *Pediatrics*. 2000;105(3):E34.
4. Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, et al. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(3):H1033-43.
5. Mahboob M, Shireen KF, Atkinson A, Khan AT. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B*. 2001;36(5):687-97.
6. Azevedo BF, Simões MR, Fiorim J, Botelho T, Angeli JK, Vieira J, et al. Chronic mercury exposure at different concentrations produces opposed vascular responses in rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016;43(7):712-9.
7. Rizzetti DA, Altermann CD, Martinez CS, Peçanha FM, Vassallo DV, Uranga-Ocio JA, et al. Ameliorative effects of egg white hydrolysate on recognition memory impairments associated with chronic exposure to low mercury concentration. *Neurochem Int*. 2016;101:30-7.
8. Rizzetti DA, Martinez CS, Escobar AG, da Silva TM, Uranga-Ocio JA, Peçanha FM, et al. Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2017;100:253-64.
9. Rizzetti DA, Martín Á, Corrales P, Fernandez F, Simões MR, Peçanha FM, et al. Egg white-derived peptides prevent cardiovascular disorders induced by mercury in rats: role of angiotensin-converting enzyme (ACE) and NADPH oxidase. *Toxicol Lett*. 2017;281:158-74.
10. Salonen JT, Seppanen K, Lakka TA, Salonen R, Kaplan GA. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis*. 2000;148(2):265-73.

- Houston MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med*. 2007;13(2):S128-33.
- Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci*. 2011;342(2):135-42.
- Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of oxidative stress on the heart and vasculature: part 2 of a 3-part series. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(2):212-29.
- Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest*. 2008;118(1):183-94.
- Pecanha FM, Wiggers GA, Briones AM, Perez-Giron JV, Miguel M, García-Redondo AB, et al. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(1):29-36.
- Aguado A, Galán M, Zhenyukh O, Wiggers GA, Roque FR, Redondo S, et al. Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;268(2):188-200.
- Furieri LB, Fiorese M, Junior RF, Bartolomé MV, Fernandes AA, Cachofeiro V, et al. Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;255(2):193-9.
- Wiggers GA, Stefanon I, Padilha AS, Peçanha FM, Vassallo DV, Oliveira EM. Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2008;147(2):252-60.
- Furieri LB, Galán M, Avendaño MS, García-Redondo AB, Aguado A, Martínez S, et al. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. *Br J Pharmacol*. 2011;162(8):1819-31.
- Frisbee JC, Maier KG, Stepp DW. Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(6):H2160-8.
- Zou MH. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007;82(1-4):119-27.
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37.
- Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells-- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(8):1263-73.
- Huang YL, Cheng SL, Lin TH. Lipid peroxidation in rats administered with mercuric chloride. *Biol Trace Elem Res*. 1996;52(2):193-206.
- Miller DM, Woods JS. Urinary porphyrins as biological indicators of oxidative stress in the kidney. Interaction of mercury and cephaloridine. *Biochem Pharmacol*. 1993;46(12):2235-41.
- Reus IS, Bando I, Andrés D, Cascales M. Relationship between expression of HSP70 and metallothionein and oxidative stress during mercury chloride induced acute liver injury in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(3):161-8.
- Kim SH, Sharma RP. Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;196(1):47-57.
- Rodríguez-Martínez MA, Ruiz-Torres A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev*. 1992;66(2):213-22.
- Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol*. 1976;66(2):416-24.
- Kobal AB, Horvat M, Prezelj M, Briski AS, Krsnik M, Dizdarevic T, et al. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol*. 2004;17(4):261-74.
- Wolf MB, Baynes JW. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biomaterials*. 2007;20(1):73-81.
- García-Redondo AB, Briones AM, Avendaño MS, Hernanz R, Alonso MJ, Salaices M. Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. *J Hypertens*. 2009;27(9):1814-22.
- Vassallo DV, Simões MR, Furieri LB, Fiorese M, Fiorim J, Almeida EA, et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(9):939-46.
- Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Tuomainen TP, Korhonen MJ, et al. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):228-33.
- Boffetta P, Sällsten G, García-Gómez M, Pompe-Kirn V, Zaridze D, Bulbulyan M, et al. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med*. 2001;58(7):461-6.
- García Gómez M, Boffetta P, Caballero Klink JD, Español S, Gómez Quintana J. Cardiovascular mortality in mercury miners. *Med Clin (Barc)*. 2007;128(20):766-71.
- Wakita Y. Hypertension induced by methyl mercury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1987;89(1):144-7.
- Carmignani M, Boscolo P, Artese L, Del Rosso G, Porcelli G, Felaco M, et al. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats. *Br J Ind Med*. 1992;49(4):226-32.
- Rossoni LV, Amaral SM, Vassallo PF, França A, Oliveira EM, Varner KJ, et al. Effects of mercury on the arterial blood pressure of anesthetized rats. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(8):989-97.
- Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(1):51-65.

