

**Exposição aguda ao cádmio reduz a atividade da
enzima conversora de angiotensina I e aumenta a
concentração tecidual do metal**

Gilson Brás Broseghini Filho

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória

2015

Broseghini-Filho, Gilson Brás 1988

Exposição aguda ao cádmio reduz a atividade da enzima conversora de angiotensina I e aumenta a concentração tecidual do metal [Vitória] 2015

74pp, 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2015)

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha

1. Cádmio 2. Enzima Conversora de Angiotensina 3. Sistema Renina Angiotensina Local. 4. Zinco

Exposição aguda ao cádmio reduz a atividade da enzima conversora de angiotensina I e aumenta a concentração tecidual do metal

Gilson Brás Broseghini Filho

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha - Orientadora
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Jhuli Keli Angeli - Coorientadora
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Frank Maciel Peçanha
Universidade Federal do Pampa

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, 2015

Aos meus pais, ao meu irmão, aos meus amigos e a Camila.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King Jr.

Agradecimentos

A Deus, por me guiar e me fornecer todos os dons necessários para que essa etapa fosse realizada

À Prof^a. Dr^a. Alessandra, pelo voto de confiança ao me aceitar como aluno desde a iniciação científica. Obrigado por dividir comigo seu conhecimento inestimável. Obrigado por me mostrar o caminho, mas sempre permitir que eu o percorresse com os meus próprios pés. Obrigado por deixar que eu cometesse meus próprios erros, e, por estar sempre atenta e disposta a me ajudar a corrigi-los. Ou seja, obrigado pela verdadeira orientação.

À Dr^a. Jhuli, por ter, inicialmente, aberto as portas do LEMC para mim, além de estar comigo ao longo desses anos sempre disposta a me ajudar.

À Maylla, pelo direcionamento durante os meus primeiros passos dentro do laboratório, durante o primeiro contato com a pesquisa, obrigado a minha primeira coorientadora.

Ao Prof Dr. Leonardo, pelas sugestões e observações científicas dadas sempre de bom grado em todos os momentos que lhe procurei.

À Prof^a. Dr^a Ivanita e ao Prof. Dr. Dalton, pela disponibilidade e por fomentarem essa etapa.

Ao team Padilha e apêndice. Marito, Dieli, Camila e Renata, mais que colegas nessa jornada vocês são ótimos amigos

Aos amigos do LEMC: Jonaína, Bruna Fernandes, Bruna Marquezini, Carol, Karol, Cindy, Dani, David, Dieli, Edna, Emily, João, Fabiana Siman, Fabiana Simões, Thiago, Larissa, Lorena, Maylla, Marito, Mirian, Priscila, Rogério, Sâmia, Tereza, Sabrina, Renata e Vinícius. Obrigado pela e companhia.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, por compartilharem os seus conhecimentos e por se dedicarem à formação dos alunos. Foi uma honra aprender com tantos ases da Fisiologia, da Bioquímica e da Genética.

Aos colegas de outros laboratórios com quem tive o prazer de trabalhar e trocar informações. O aprendizado que obtive com vocês foi essencial para esta formação. Dentre esses, agradeço em especial ao Dr. Marcelo que, em meio a conversas sérias e outras nem tão sérias assim, sempre se importou com o desenvolvimento dos meus experimentos, me aconselhou e me impulsionou a finalizar essa etapa.

Ao Guruça, pelas dosagens de metais e pela amizade.

À Thaís, pelo tempo, conselhos e participação no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão, obrigado por todo o apoio, paciência, compreensão, suporte, carinho, admiração e confiança que permitiram que eu sempre seguisse em frente.

À Camila, pois tudo começou com ela. Pela paciência, dedicação, apoio, carinho, incentivo e mais incentivo, por todo o trabalho dedicado a esse e aos nossos demais projetos. Obrigado por sempre me ajudar e me ouvir, sobre qualquer assunto que seja. Obrigado por, além de ser minha parceira no laboratório, ser minha parceira na vida!

Sumário

Agradecimentos	6
Lista de tabelas	10
Lista de figuras	11
Lista de abreviações	13
Resumo	14
Abstract	16
1. Introdução	17
1.1. Cádmio	17
1.2. Contaminação ambiental e exposição.....	18
1.3. Cinética	20
1.4. Ações do cádmio sobre o sistema cardiovascular	22
1.5. Sistema renina-angiotensina aldosterona	23
1.5.1. Enzima conversora de angiotensina	25
1.5.2. Ação do cádmio sobre o sistema renina-angiotensina	26
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. Material e métodos.....	29
3.1. Animais experimentais	29
3.2. Modelo experimental de exposição ao cádmio	29
3.3. Aferição da pressão arterial	30
3.4. Dosagem de cádmio	31
3.5. Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina I .	31
3.6. Análise estatística	35
4. Resultados	36

4.1. Efeitos da exposição durante 120 minutos ao cádmio sobre a pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca.	36
4.2. Efeitos da exposição durante 120 minutos ao cádmio sobre a concentração sérica e tecidual do metal.....	38
4.3. Efeitos da exposição durante 120 minutos ao cádmio sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina sérica e tecidual	39
4.4. Efeitos da exposição <i>in vitro</i> ao cádmio sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina sérica e tecidual.....	39
4.5. Efeitos da suplementação <i>in vitro</i> com zinco sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina	41
4.6. Efeito inibitório promovido pelo captopril sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina sérica e tecidual.....	42
5. Discussão.....	44
6. Conclusão	48
7. Referências	50
Anexo I - Artigo.....	55

Lista de tabelas

Tabela 1: Atividade da ECA frente a doses crescentes de captopril.

Lista de figuras

Figura 1. Fluxograma de distribuição do cádmio em condições normais de exposição.

Figura 2. Visão simplificada do sistema renina-angiotensina circulatório.

Figura 3. Clivagem sequencial que origina a angiotensina II.

Figura 4. Avaliação pressórica ao longo de duas horas de exposição ao cádmio ou a solução salina.

Figura 5. Registro típico de medida direta de pressão arterial.

Figura 6. Representação esquemática do método de avaliação da atividade da ECA.

Figura 7. Avaliação pressórica durante 120 minutos de exposição ao cádmio. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. PAS (A), PAD (B) e FC (C) durante 120 minutos de exposição ao cádmio. * $p < 0.05$ vs tempo 0', determinado pela ANOVA duas vias com pós-teste de Bonferroni. $n = 8$.

Figura 8. Atividade da ECA e concentração de cádmio após 120 minutos de exposição. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. A atividade da Eca sérica foi expressa em $\text{nmol His-Leu} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$. A atividade da ECA tecidual foi expressa como $\text{nmol His-Leu} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$. As Concentrações sanguínea e tecidual de cádmio foram expressos, respectivamente, em $\mu\text{g/dL}$ e $\mu\text{g/g}$. * $p < 0.05$ vs grupo controle determinado pelo teste t-student. $n = 8$.

Figura 9. Atividade da ECA após a exposição *in vitro* ao cádmio. Atividade da ECA (A) sérica, (B) aórtica, (C) pulmonar e (D) renal após 5 minutos de exposição *in vitro* ao cádmio. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. A atividade da Eca foi expressa em $\text{nmol His-Leu} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$.

*p<0.05 vs Controle grupo; #p<0.05; determinados pela ANOVA uma via com pós-teste de Tukey. n = 8.

Figura 10. Atividade da ECA após 120 minutos de exposição *in vitro* ao cádmio e ao zinco. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. As concentrações de cádmio foram expressas em $\mu\text{g/dL}$. A concentração de zinco utilizada foi expressa em $120 \mu\text{g/dL}$ e a concentração de captopril utilizada foi expressa em μM . *p<0.05 vs Controle; #p<0.05 vs Cd $1.5 \mu\text{g/dL}$, determinado pela ANOVA uma via com pós-teste de tukey. n = 8.

Figura 11. Atividade da ECA após a exposição *in vitro* ao mercúrio. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. As concentrações de cádmio foram expressas em $\mu\text{g/dL}$. As concentrações de mercúrio utilizadas foram expressas em mM e as concentrações de captopril utilizadas foram expressas em μM . *p<0.05 vs grupo controle, determinado pela ANOVA uma via com pós-teste de tukey. n = 5

Lista de abreviações

AAS - Espectrometria de Absorção Atômica

ACGIH - American conference of governmental industrial hygienists

Ang I - Angiotensina I

Ang II - Angiotensina II

ANOVA - Análise de Variância

AT1 - Receptor tipo 1 para angiotensina

AT2 - Receptor tipo 2 para angiotensina

ATSDR - Agency for toxic substances and disease registry

Cd - Cádmio

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

EPM - Erro padrão da média

FC - Frequência cardíaca

HCl - Ácido clorídrico

HIP-HIS-LEU - Hipuril-histidil-leucina

Hg - Mercúrio

O-PHA - Orto-phitaldialdeído

i.p. - Intraperitonal

LD - Limite de detecção

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NCM - Nordic council of ministers

PA - Pressão arterial

PAD - Pressão arterial diastólica

PAS - Pressão arterial sistólica

pH - Potencial hidrogeniônico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

VS - Versus

WHO - Organização Mundial da Saúde

Zn - Zinco

Resumo

A exposição ao cádmio causa diversos problemas cardiovasculares que podem ser resultado de mecanismos como o aumento do estresse oxidativo e alterações da atividade de metaloproteases como a enzima conversora de angiotensina (ECA). De fato, o cádmio exerce efeito inibidor sobre a ECA do soro, mas não se sabe como esse metal afeta a ECA nos tecidos e também não se sabe se após a exposição aguda já ocorre aumento da concentração tecidual do metal.

Para elucidar essas questões, uma solução de cádmio foi injetada intravenosamente em ratos Wistar e, após duas horas de exposição, o conteúdo de cádmio e a atividade da ECA foram mensurados em amostras de soro, aorta, pulmão e rim coletadas desses animais. Além disso, para elucidar se o cádmio age diretamente sobre a ECA sérica e tecidual, ensaios de atividade da enzima foram realizados também após a exposição *in vitro* ao cádmio.

Nossos resultados demonstraram que após 120 minutos de exposição ao cádmio o conteúdo de cádmio no sangue e nos tecidos aumentou. A atividade da ECA sérica e pulmonar foram reduzidas após 120 minutos de exposição ao cádmio, entretanto, a atividade da ECA renal e aórtica não foram alteradas. O efeito inibitório induzido sobre a ECA pelo cádmio também foi observado no soro, na aorta e no pulmão, mas não no rim após a exposição *in vitro*. Além disso, esse efeito inibitório foi parcialmente revertido após a suplementação *in vitro* de zinco, sugerindo que, possivelmente, ambos os metais interajam ou compitam entre si a nível de sítio ativo da ECA.

Sumariando, nossos resultados sugerem que a exposição aguda ao cádmio promove aumento da concentração sanguínea e tecidual do metal. Esse aumento foi acompanhado ação inibitória direta do cádmio sobre a atividade da ECA sérica, pulmonar e aórtica, um efeito que é cádmio-concentração dependente e parcialmente revertido pelo zinco.

Palavras-chave: cádmio, exposição aguda ao cádmio, enzima conversora de angiotensina I, sistema renina angiotensina local, zinco.

Abstract

Cadmium exposure causes health problems that may result from increased oxidative stress and from changes in enzyme metalloproteases activities as angiotensin converting enzyme (ACE). In fact, cadmium produces inhibition of serum ACE, but it is not known how cadmium acts on tissue ACE activity and whether following acute exposure tissue cadmium content is increased.

In order to elucidate these issues, a cadmium bolus was injected intravenously in Wistar rats and the cadmium content and the ACE activity were measured in the serum, lungs, aorta and kidneys. Moreover, in order to clarify if the cadmium affects directly tissue ACE activity, acute metal exposure *in vitro* was performed.

Our results demonstrated that 120 minutes following cadmium administration, blood and organ cadmium content were both increased. Serum and lung ACE activity were reduced following acute cadmium exposure, but aortic and kidney ACE activity were not affected. The inhibitory effects induced by cadmium on ACE activity were also observed in the serum, as well as the lungs and the aorta, but not in the kidneys following *in vitro* exposure. Moreover, the inhibitory effects induced by cadmium on ACE activity were partially restored *in vitro* by zinc supplementation, suggesting a possible interaction or competition between cadmium and zinc by at the active site of ACE.

Summarizing, our results suggest that acute cadmium exposure promotes an increase in the tissue metal content that was accompanied by direct inhibition of serum, aorta and lung ACE activity, an effect that is cadmium concentration-dependent and is partially reversed by zinc.

Keywords: cadmium, cadmium acute exposure, angiotensin I converting enzyme, local renin angiotensin system, zinc.

1. Introdução

1.1. Cádmio

O cádmio é um metal de transição externa, da família 12B, mesma família ocupada pelo zinco e pelo mercúrio. Como é inerente a muitos metais, o cádmio é cinza claro, dúctil e maleável, facilmente oxidado na presença de oxigênio. Foi descoberto em 1817 pelo professor de Química e Farmácia da Universidade de Gottinger, na Alemanha, Friedrich Stromeyer (WEEKS E LEICESTER, 1968).

O cádmio é raramente encontrado sob a forma de íon livre nos ecossistemas, naturalmente, sua ocorrência está associada à contaminação de outros metais e, por isso, o cádmio é obtido da natureza principalmente como coproduto da mineração, fundição e refinamento de zinco, chumbo e cobre. O cádmio é amplamente utilizado pela indústria, por exemplo, é utilizado na produção de pigmentos, estabilizantes de PVC e na galvanização. Na União Europeia, tais fins representam uma grande porção do consumo total de cádmio (NCM, 2003). A produção de baterias níquel-cádmio contribui para cerca de 78% do consumo total do metal (NCM, 2003).

Por reflexo de sua ampla utilização e dos riscos gerados a saúde de quem a ele se expõe, o cádmio se tornou um dos principais contaminantes ambientais. A exposição ao cádmio é intimamente associada à disfunção renal (SATARUG et al., 2005), edema pulmonar (ZHANG et al., 2010), câncer (MENKE et al., 2009; NAWROT et al., 2008; NISHIJO et al., 2006), alteração da atividade de enzimas (VASSALLO et al., 2011) e doenças cardiovasculares como a aterosclerose e hipertensão (AFRIDI et al., 2010).

1.2. Contaminação ambiental e exposição

As erupções vulcânicas e o intemperismo de rochas são as principais fontes naturais de emissão de cádmio para o ambiente. Em 1983, cerca de 140-1500 toneladas de cádmio foram lançadas para a atmosfera por meio de erupções vulcânicas (NRIAGU, 1989). Para o mesmo ano, Nriagu e Pacyna (1988) estimaram a contaminação atmosférica por fontes antropogênicas em 7600 toneladas de cádmio (NRIAGU; PACYNA, 1988). As principais fontes antropogênicas de contaminação ambiental pelo cádmio são a queima de combustíveis fósseis, produção de metais não ferrosos, ferro e aço; produção de cimento e eliminação de resíduos por incineração ou despejo (PACYNA; PACYNA, 2001). As concentrações relatadas de cádmio no sangue de trabalhadores expostos estão geralmente compreendidas entre 5 e 50 µg/L, mas exposições extremas tiveram como resultado os níveis de cádmio no sangue entre 100 e 300 µg/L (HASSLER; LIND; PISCATOR, 1983; ROELS et al., 1982).

Além da exposição ocupacional, essas usinas também são responsáveis pela contaminação da população de áreas vizinhas. Cita-se como exemplo o acidente ocorrido na região de Funchu Machi, no Japão, após o despejo de resíduos da jazida de zinco e chumbo, denominada Kamioka, e sua usina de processamento, a 50 km do rio Jintsu. Em 1910, plantadores de arroz e pescadores da região relataram dores reumáticas e mialgias, decorrentes de uma doença causada pela intoxicação pelo cádmio, conhecida como doença de Itai-Itai (ai, ai em japonês). Apesar dos protestos da população contra a contaminação dos arrozais, com a intensificação dos conflitos das Guerras Mundiais, e da guerra com a Coreia, a produção de chumbo e zinco teve aumento para atender à demanda. Tal fato elevou a concentração de cádmio nos efluentes do referido rio, o que resultou no agravamento da contaminação da população (FRIBERG et al., 1974).

Já em Itaguaí, Rio de Janeiro, em 1996, uma fábrica de zinco eletrolítico foi denunciada por despejar na região mais de 50 milhões de litros de água e lama contendo zinco e cádmio, contaminando os manguezais que abrigavam

caranguejos, siris, ostras e mexilhões, consumidos pelas populações locais e pela cidade do Rio de Janeiro (GONÇALVES et al., 1996).

Fertilizantes fosfatados apresentam cádmio em sua constituição e o crescente uso desses produtos em solos cultivados, levou ao aumento da incidência de intoxicação por cádmio na população não exposta ocupacionalmente (WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. CADMIUM, 1992). Vegetais folhosos, sementes oleosas e folhas de tabaco acumulam altos níveis de cádmio do solo (WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. CADMIUM, 1992). Fumantes apresentam aproximadamente o triplo da concentração sanguínea de cádmio encontrada na população não fumante (1.58 µg/L para fumantes vs 0.47 µg/L para não fumantes), o que faz do fumo do tabaco, a principal forma de exposição não ocupacional ao cádmio ((ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2008). Esse conteúdo de cádmio nos fumantes tem sido associado ao aumento do risco de hipertensão e doenças relacionadas (AFRIDI et al., 2010).

No ambiente aquático, os moluscos filtradores são os principais acumuladores de metais, independente da poluição ambiental, mas águas contaminadas podem aumentar significativamente a concentração de metais nesses seres (WHYTE et al., 2009). O conteúdo de cádmio em ostras do oceano Pacífico chega a 13,5 mg/kg de peso seco, enquanto que, a quantidade de cádmio observada nas ostras da costa da Nova Zelândia, é duas vezes maior, devido à contaminação dessa área (COPEES et al., 2008).

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu um limite de segurança para a ingestão de cádmio de 7 µg/semana/kg de peso corporal. Esse valor foi baseado na concentração renal crítica de cádmio de 100 a 200 µg/g de peso seco, o que corresponde à concentração urinária de cádmio de 5 a 10 µg/g de creatinina (WHO, 1993). Entretanto, já foram observados efeitos renais em concentrações abaixo da excreção urinária dita segura (SATARUG; MOORE, 2004).

O cádmio pode ser detectado em diversos tecidos, dependendo do tempo de exposição ao metal, mas os principais marcadores de exposição ao cádmio são as concentrações de cádmio na urina e no sangue total. A concentração de

cádmio na urina de 24 horas é um marcador para a exposição de longo prazo (NORDBERG et al., 2007). Já a concentração sanguínea de cádmio reflete exposição mais recente, decorrentes dos últimos meses (NORDBERG et al., 2007) e tem como limite de tolerância biológica o valor de 5 µg/L de cádmio no sangue (ACGIH AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS, 2007).

1.3. Cinética

Como já citado, o fumo do tabaco é a principal forma de exposição não ocupacional ao cádmio. Isso não se deve somente ao fato de que as folhas de tabaco acumulam grandes quantidades do cádmio presente no solo, mas sim, por que, em torno de 50% do cádmio inalado é absorvido, enquanto que a via gastrointestinal permite a absorção de apenas 5% da dose do metal (WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. CADMIUM, 1992).

O cádmio não apresenta função essencial conhecida para os organismos, não tendo assim, mecanismos específicos para sua absorção, transporte e entrada nas células. Para tal, ele utiliza os mecanismos desenvolvidos para os metais essenciais, em especial o ferro, zinco, magnésio e cálcio, o transportador de metais divalentes 1 (DMT1). Assim, o estado nutricional do indivíduo, como seu conteúdo de ferro, irá influenciar na absorção intestinal do cádmio devido à competição do ferro e do cádmio pelos carreadores. A dieta pobre em ferro aumenta a expressão do DMT1, que transporta ferro, mas também cádmio, o que aumenta a absorção de Cd^{2+} (KLASSEN et al., 2009). Satarug e Moore (2004), em um estudo realizado com tailandeses, observaram que mulheres com depleção de ferro apresentavam conteúdo de cádmio 3 a 4 vezes maior que o observado em mulheres de mesma idade e com estoques normais de ferro.

Após absorvido, o Cd^{2+} se liga à metalotioneína (MT), uma proteína de baixo peso molecular, rica em cisteína, com grande afinidade por metais (NORDBERG et al., 2004). A ligação a essa proteína impede as ações do cádmio sobre outras macromoléculas além de dificultar a excreção renal desse

metal (KLASSEN et al., 2009). Assim, quando o complexo MT-Cd²⁺ chega aos rins, é filtrado e reabsorvido pelas células dos túbulos proximais, onde a ligação desse complexo é quebrada, liberando o cádmio bivalente para a circulação. Quando o conteúdo de cádmio excede a capacidade de produção e ligação dessa proteína, a concentração de cádmio livre aumenta e passa a causar seus efeitos deletérios sobre diversos tecidos (FRIDBERG et al., 1986).

O cádmio se acumula em diversos órgãos, principalmente nos rins e no fígado, apresentando meia-vida em torno de 10 a 35 anos. Sua excreção renal diária é de apenas 0.007% do conteúdo corporal de cádmio, apresentando grandes variações entre indivíduos (WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. CADMIUM, 1992)(figura 1).

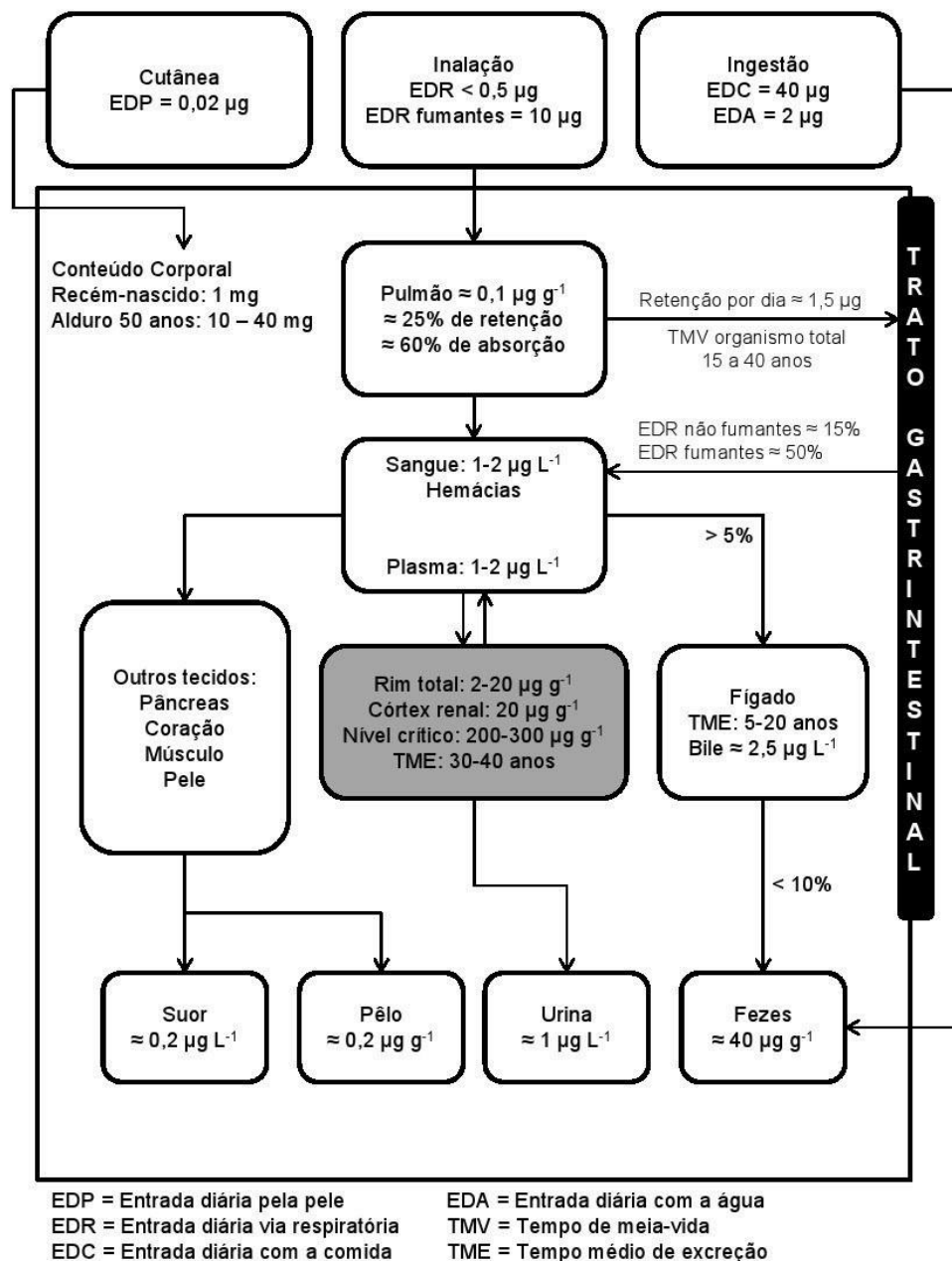


Figura 1. Fluxograma de distribuição do cádmio em condições normais de exposição (NORDBERG; KJELLSTROM, 1979).

1.4. Ações do cádmio sobre o sistema cardiovascular

Estudos populacionais trazem resultados contraditórios a respeito da associação entre exposição ao cádmio e desenvolvimento de hipertensão. Eum e colaboradores (2008) analisaram uma população coreana, quanto à

concentração de cádmio na urina e no sangue, e à ocorrência de hipertensão. Nesse estudo, a média do cádmio sanguíneo foi 1.67 µg/L, e incidência de hipertensão era de 1.51 vezes maior para os indivíduos do tercil superior de cádmio sanguíneo comparado com aqueles do tercil mais baixo (EUM; LEE; PAEK, 2008). Uma associação positiva também foi encontrada entre a concentração sanguínea de cádmio e valores de pressão arterial de uma amostra populacional norte-americana, onde a média da concentração sanguínea de cádmio foi 3.98 vezes menor do que a encontrada no estudo coreano (TELLEZ-PLAZA et al., 2008). Entretanto, estudos transversais e prospectivos relatados por Staessen e colaboradores (1996, 2000) mostraram que pressão arterial e o risco de hipertensão não estavam associados com a concentração de cádmio na urina de indivíduos expostos ambientalmente. Ainda, em uma área contaminada com cádmio, no Japão, 52 mulheres com doença de Itai-itai apresentaram menores valores de pressão arterial sistólica e diastólica comparado com 104 mulheres de idade compatível que viviam fora da área contaminada pelo metal (KAGAMIMORI et al., 1986). Além disso, apesar da nefrotoxicidade, hipertensão não foi relatada como achado típico em pacientes acometidos pela doença Itai-itai em uma área de contaminação pelo cádmio, também no Japão (NORDBERG et al., 2007).

Apesar da associação entre exposição ao cádmio e hipertensão ser inconsistente se tratando de humanos, a indução da hipertensão pela exposição ao cádmio já foi observada em diversos modelos experimentais de exposição aguda e crônica (ALMENARA et al., 2013; BALARAMAN et al., 1989; PURI, 1992; VARONI et al., 2010) e, dentre os possíveis fatores associados à elevação da pressão, um que se destaca, é interação do cádmio com o sistema renina angiotensina.

1.5. Sistema renina-angiotensina aldosterona

Em 1898, Robert Tigerstedt e Per Bagman descobriram que o extrato salino, obtido de rins de coelhos, quando infundido em outros coelhos promovia aumento da pressão arterial. Eles atribuíram essa resposta a uma proteína que estaria presente nesse extrato e a chamaram de renina (BASSO; TERRAGNO,

2001). A partir dessa descoberta, vários estudos foram conduzidos e seus resultados permitiram caracterizar o sistema renina-angiotensina tal como conhecemos hoje. Esse sistema mostrou-se como um dos principais sistemas de controle da pressão arterial e de balanço de líquidos no corpo, tendo a angiotensina II como principal agente efetor (SPARKS et al., 2014).

A angiotensina II, classicamente, é sintetizada a partir de uma cascata enzimática que começa a partir de um estímulo sobre as células justaglomerulares granulares das arteríolas aferentes renais que sintetizam e liberam a renina. A renina é uma enzima que age sobre o polipeptídeo angiotensinogênio, sintetizado pelo fígado, convertendo-o em angiotensina I, um decapeptídeo, que sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), presente principalmente em células endoteliais vasculares, origina um octopeptídeo, a angiotensina II (COSTEROUSSE et al., 1998) (figura 2).

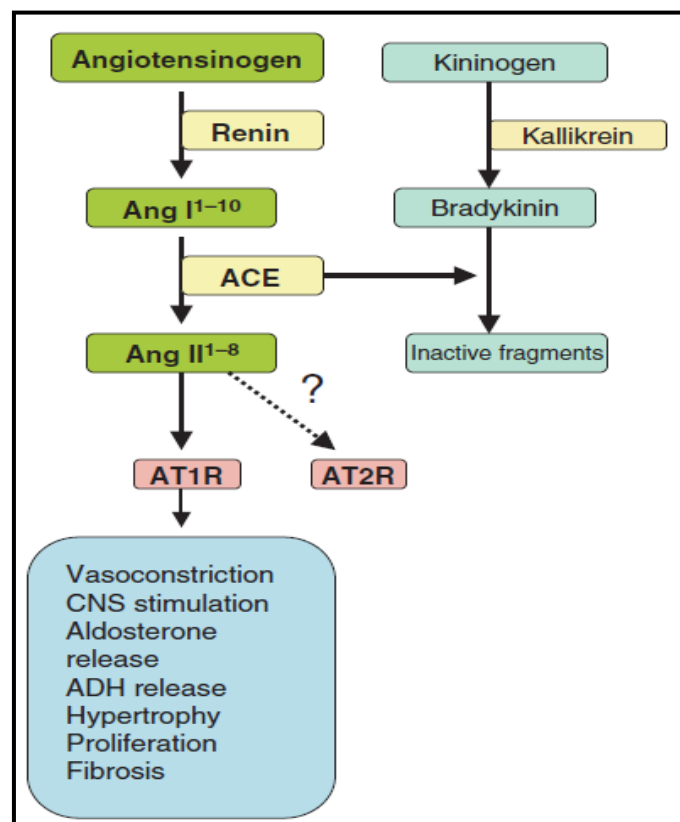


Figura 2. Visão simplificada do sistema renina-angiotensina circulatório (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

A angiotensina II via receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT₁) é um potente vasoconstrictor direto, atuando em veias e artérias levando ao aumento da pressão sanguínea. É, também, um potente liberador de norepinefrina por ação direta nas fibras simpáticas pós-ganglionares. No cérebro age diminuindo o reflexo dos barorreceptores, aumentando o apetite por sal e aumentando a secreção de vasopressina e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Na adrenal, a angiotensina II causa a liberação de aldosterona e nos rins tem um efeito direto no túbulo proximal aumentando a reabsorção de sódio (ZAMAN; OPARIL; CALHOUN, 2002). Além dos efeitos vasoativos da angiotensina II via AT₁, o receptor de angiotensina II do tipo 2 (AT₂) mostra exercer ação anti-proliferativa e pró-apoptótica em células do músculo liso vascular (VSMCs), principalmente por antagonizar os receptores AT₁ (GRIENGLING; LASSEGUE; ALEXANDER, 1996).

Inicialmente, o SRA foi descrito como um sistema circulante, porém, atualmente sabe-se que existe um SRA local presente em diferentes tecidos, como o cérebro, rins, córtex da adrenal, coração e vasos sanguíneos (BADER et al., 2001; DANSER, 1996; DZAU, 1989) e, assim como o SRA circulatório, acredita-se que o SRA local possa desempenhar um importante papel na regulação da pressão arterial (MIN A. E. LEE, MARTIN PAUL, 1992).

1.5.1. Enzima conversora de angiotensina

A ECA é uma zinco-metalopeptidase que cliva o dipeptídeo histidil-leucina da extremidade C-terminal da angiotensina I (**Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu**), convertendo-a em um octopeptídeo, a angiotensina II (**Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe**|His-Leu) (SKEGGS; KAHN; SHUMWAY, 1956) (figura 3).

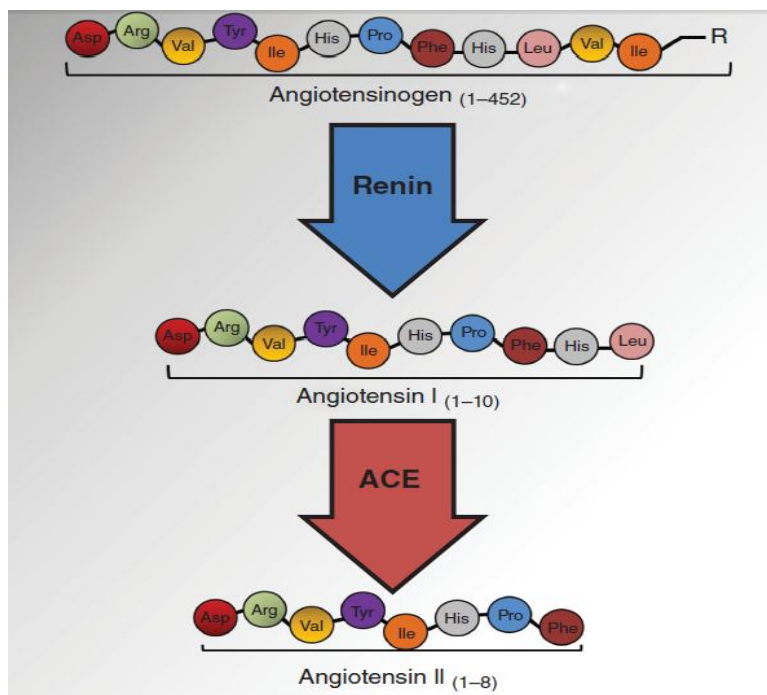


Figura 3. Clivagem sequencial que origina a angiotensina II (SPARKS et al., 2014).

A enzima apresenta duas isoformas conhecidas. A isoforma somática apresenta massa molecular de 150 a 180 kDa (SOFFER, 1981) e é expressa em células endoteliais, epiteliais e neuronais. A clonagem do gene que codifica a ECA revelou que esta isoforma é composta por dois domínios catalíticos (SOUBRIER et al., 1988), um C-domínio e um N-domínio, sendo o C-domínio o sítio majoritário de clivagem da angiotensina I *in vivo* (FUCHS et al., 2008).

A isoforma testicular de aproximadamente 90 kDa é encontrada ancorada à membrana plasmática exclusivamente de espermátides e espermatozoides em desenvolvimento e nos espermatozoides diferenciados, sendo portanto testículo-específica (EL-DORRY et al., 1982). Essa isoforma apresenta apenas o sítio ativo C-domínio, apesar disso, apresenta atividade catalítica semelhante à isoforma somática (WILLIAMS et al., 1992).

1.5.2. Ação do cádmio sobre o sistema renina-angiotensina

Alguns metais traço, assim como o chumbo, podem causar aumento da pressão arterial via aumento da atividade da ECA sérica (SHARIFI et al., 2004; SIMÕES et al., 2011; VASSALLO et al., 2011). Contraditoriamente, estudos

prévios observaram que o cádmio reduz a atividade da ECA apesar de promover aumento de pressão arterial (PURI; SAHA, 2003; PURI, 1992).

No entanto, o efeito do cádmio sobre a atividade da ECA local não é elucidado e, sabendo que o SRA local pode influenciar na regulação da pressão arterial, estudar esse efeito se faz fortemente necessário e, por isso, o presente estudo procurou avaliar a ação do cádmio sobre a atividade da ECA local após sua exposição *in vivo* e *in vitro*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do cádmio sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina I tecidual, avaliar se após 120 minutos de exposição já há aumento da concentração tecidual de cádmio e, também, avaliar a pressão arterial dos animais expostos agudamente ao metal.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a pressão arterial sistólica, diastólica e a frequência cardíaca de ratos expostos por 120 minutos ao cádmio;
- Determinar se o cádmio altera a atividade da enzima conversora de angiotensina I sérica, aórtica, pulmonar e renal após 120 minutos de exposição;
- Determinar se o cádmio tem ação direta sobre a enzima conversora de angiotensina I sérica, aórtica, pulmonar e renal, realizando ensaios de exposição *in vitro*;
- Determinar se a suplementação *in vitro* de zinco pode reverter os efeitos que o cádmio exerce sobre a enzima conversora de angiotensina I.

3. Material e métodos

3.1. Animais experimentais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com aproximadamente 14 semanas de idade, pesando entre 250 e 300 g, cedidos pelo biotério do campus de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES- CEUA 053/2011).

3.2. Modelo experimental de exposição ao cádmio

Os ratos foram anestesiados com uretana (1.2 g/kg, i.p.) e então a artéria carótida direita e a veia jugular direita foram canuladas com um cateter de polietileno (PE-50) previamente preenchido com solução salina heparinizada (0,9 % cloreto de sódio + heparina 50 U/mL).

Os animais foram classificados em dois grupos. Em grupo cádmio, cujo os animais receberam cloreto de cádmio (0.32 mg/kg, i.v., em um volume de 5 µl/100 g de rato) via veia jugular previamente cateterizada e, em grupo controle, cujo os animais receberam solução salina (0,9% cloreto de sódio, i.v., 5 µl/100 g de rato) via veia jugular previamente cateterizada. Durante 120 minutos os animais tiveram seus parâmetros pressóricos acompanhados. Transcorrido esse tempo, amostras de sangue, aorta, rim e pulmão foram coletadas e armazenadas a temperatura de - 80°C (figura 4).

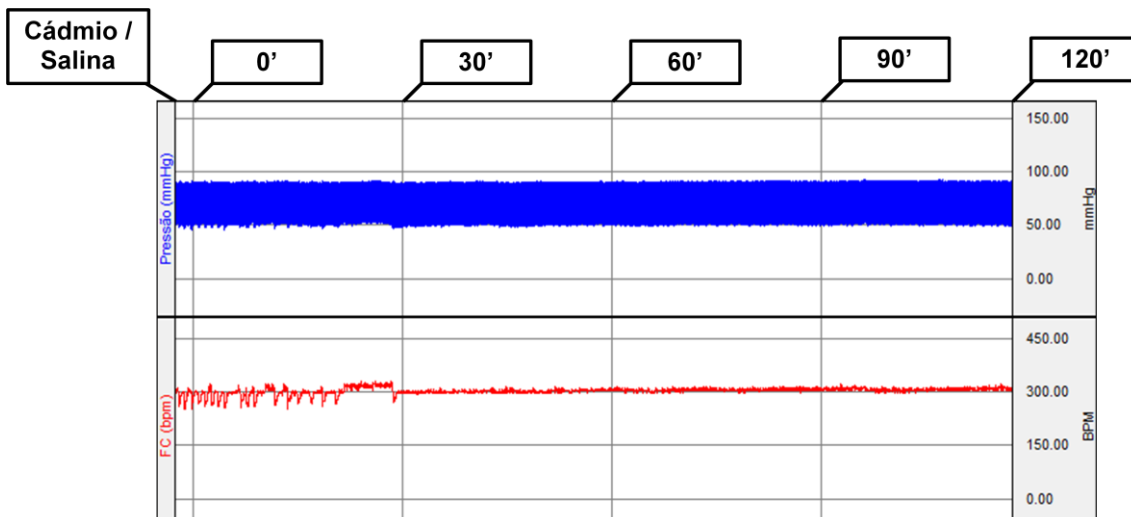


Figura 4. Avaliação pressórica ao longo de duas horas de exposição ao cádmio ou a solução salina.

3.3. Aferição da pressão arterial

Para aferir a pressão arterial sistólica (PAS), a pressão arterial diastólica (PAD) e a frequência cardíaca (FC), o cateter previamente inserido na artéria carótida direita foi acoplado a um transdutor de pressão (modelo TSD 104A) que estava conectado a um pré-amplificador e a um sistema de aquisição de dados (modelo MP30, BIOPAC system, Inc. Santa Barbara, CA). Os experimentos foram realizados utilizando-se ratos anestesiados devido a sua duração e a necessidade de manter a pressão estável (figura 5).

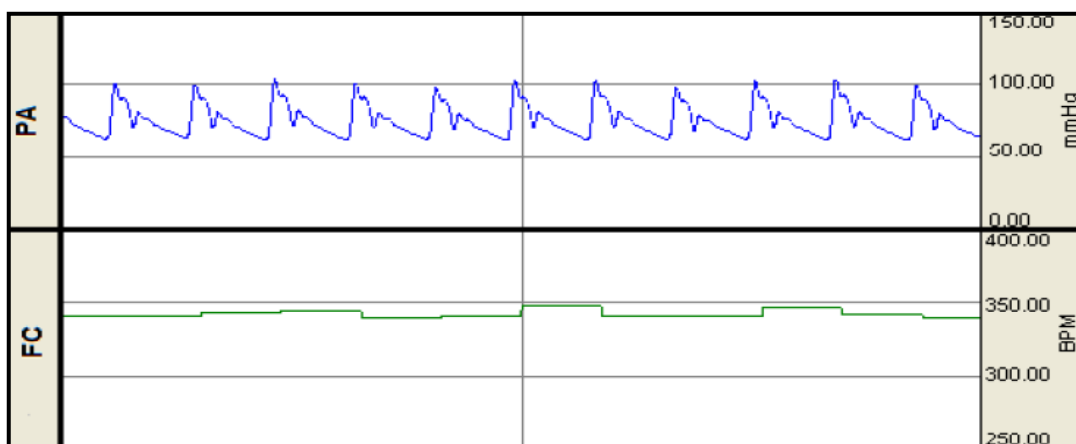


Figura 5. Registro típico de medida direta de pressão arterial.

Os animais de cada grupo (n = 9) foram acompanhados durante 120 minutos e a PAS, PAD e FC foram aferidas antes da infusão de cádmio ou salina e 30, 60, 90 e 120 minutos após a infusão.

3.4. Dosagem de cádmio

Após 120 minutos de exposição ao cádmio ou a salina, amostras de sangue, aorta, rim e pulmão foram coletadas dos animais. As amostras foram processadas e a concentração de cádmio foi medida em duplicata por meio da técnica de espectrométrica de absorção atômica (modelo AAS5 EA com forno de grafite, Carl Zeiss, Germany) no Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.5. Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina I

3.5.1. Processamento das amostras

As amostras de sangue total coletadas após 120 minutos de exposição ao cádmio ou a solução salina, foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 15 minutos , 6.000 rpm a 4^oC e, em seguida, o soro foi retirado e 3 µL foi utilizado por poço para realização da reação fluorimétrica.

As amostras de aorta, pulmão e rim coletadas após 120 minutos de exposição ao cádmio ou a solução salina, foram homogeneizadas por homogeneizador de metal em um tubo contendo solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH:7,4, em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos , 6.000 rpm a 4^oC e, em seguida, o sobrenadante foi retirado e feita então à quantificação proteica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford.

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 80 µg de proteína, sendo este volume de amostra utilizado para realização da reação fluorimétrica nos poços.

3.5.2. Atividade da enzima conversora de angiotensina I após 120 minutos de exposição *in vivo* ao cádmio.

A ação do cádmio sobre a atividade da ECA foi mensurada por método fluorimétrico. As amostras de ambos os grupos, em triplicata, foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37 °C com 40 µL de “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Hipuril-l-histidil-leucina) (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e NaCl 0,9 M, pH 8.3. A reação foi interrompida pela adição de 190 µL de NaOH 0,34 M. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente (Synergy 2, Biotek, U.S.A.) antecedido por 10 minutos de incubação com 17 µL de o-phataldialdehyde (O-PHA) a 2% em metanol.

As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C em uma placa de leitura negra com 96 poços (Black polystyrene, Corning, U.S.A.) com filtros de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo software Gen5. Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa. Para o branco foi adicionado 40 µL “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3, 190 µL de 0,34 M NaOH, 17 µL de OPA (figura 6)

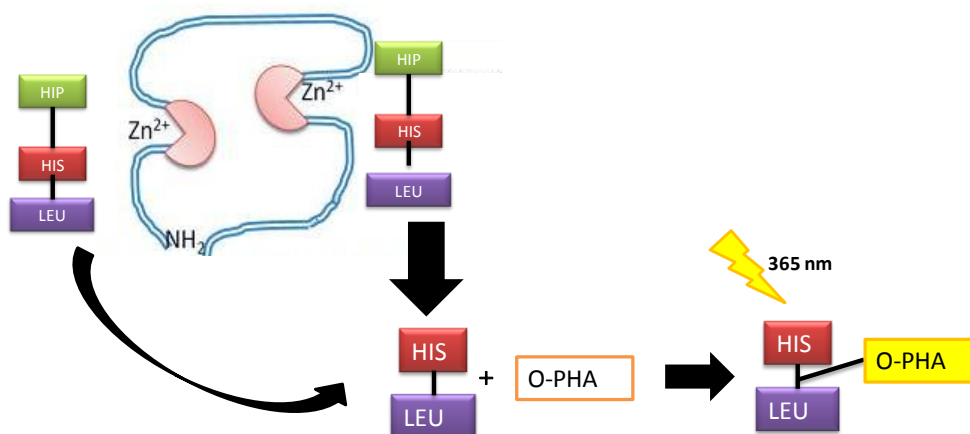


Figura 6. Representação esquemática do método de avaliação da atividade da ECA.

3.5.3. Atividade da enzima conversora de angiotensina I após 5 minutos de exposição *in vitro* ao cádmio.

A ação *in vitro* do cádmio sobre a atividade da ECA foi mensurada por método fluorimétrico. As amostras do grupo controle, em triplicata, foram incubadas por 5 minutos com cloreto de cádmio (0.05 µg/dL, 0.5 µg/dL, 8 µg/dL e 30 µg/dL) e, então, foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37 °C com 40 µL de “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Hipuril-I-histidil-leucina) (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e NaCl 0.9 M, pH 8.3. A reação foi interrompida pela adição de 190 µL de NaOH 0,34 M. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente (Synergy 2, Biotek, U.S.A.) antecedido por 10 minutos de incubação com 17 µL de o-phataldialdehyde (OPA) a 2% em metanol.

As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C em uma placa de leitura negra com 96 poços (Black polystyrene, Corning, U.S.A.) com filtros de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo software Gen5. Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa. Para o branco foi adicionado 40 µL “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3, 190 µL de 0,34 M NaOH, 17 µL de OPA.

3.5.4. Atividade da enzima conversora de angiotensina I após 120 minutos de exposição *in vitro* ao cádmio e suplementação *in vitro* com zinco.

As amostras de soro do grupo controle, em triplicata, foram incubadas por 120 minutos com cloreto de cádmio (1,5 µg/dL, e 30 µg/dL), na presença ou ausência de sulfato de zinco (120 µg/L), e, então, foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37 °C com 40 µL de “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Hipuril-l-histidil-lleucina) (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e NaCl 0,9 M, pH 8.3. A reação foi interrompida pela adição de 190 µL de NaOH 0,34 M. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente (Synergy 2, Biotek, U.S.A.) antecedido por 10 minutos de incubação com 17 µL de o-phthalaldehyde (OPA) a 2% em metanol.

As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C em uma placa de leitura negra com 96 poços (Black polystyrene, Corning, U.S.A.) com filtros de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo software Gen5. Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa. Para o branco foi adicionado 40 µL “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3, 190 µL de 0,34 M NaOH, 17 µL de OPA.

3.5.5. Controle metodológico realizado com captopril.

A ação do captopril sobre a atividade da ECA foi mensurada por método fluorimétrico. As amostras do grupo controle, em triplicata, foram incubadas por 10 minutos com captopril (0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM e 5 µM) e, então, foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37 °C com 40 µL de “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Hipuril-l-histidil-lleucina) (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e NaCl 0,9 M, pH 8.3. A reação foi interrompida pela adição de 190 µL de NaOH 0,34 M. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente (Synergy 2, Biotek, U.S.A.)

antecedido por 10 minutos de incubação com 17 μ L de o-phataldialdehyde (OPA) a 2% em metanol.

As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C em uma placa de leitura negra com 96 poços (Black polystyrene, Corning, U.S.A.) com filtros de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo software Gen5. Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa. Para o branco foi adicionado 40 μ L “buffer” contendo o substrato da ECA, 5 mM Hip-His-Leu (Sigma Chemical), tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3, 190 μ L de 0,34 M NaOH, 17 μ L de OPA.

3.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student* não pareado, análise de variância (ANOVA), de uma via para medidas randomizadas e quando a ANOVA apresentou significância estatística foi realizado o *pos-hoc* de Tuckey. A análise de variância (ANOVA), de duas vias para medidas randomizadas também foi utilizada e quando apresentou significância estatística foi realizado o *pos-hoc* de Bonferroni utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Efeitos da exposição durante 120 minutos ao cádmio sobre a pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca.

Após 90 minutos de exposição aguda ao cádmio, ocorreu elevação da pressão arterial sistólica (Controle: 93 ± 4 vs Cádmio: 109 ± 3 mmHg; $p < 0,05$), persistindo tal aumento após 120 minutos de exposição (Controle: 91 ± 5 vs Cádmio: 112 ± 5 mmHg; $p < 0,05$). Entretanto, nem a pressão arterial diastólica (Controle: 53 ± 4 mmHg vs Cádmio: 54 ± 3 mmHg) e nem a frequência cardíaca (Controle: 413 ± 14 bpm vs Cádmio: 389 ± 18 bpm) foram afetadas por 120 minutos de exposição ao metal (figura 7)

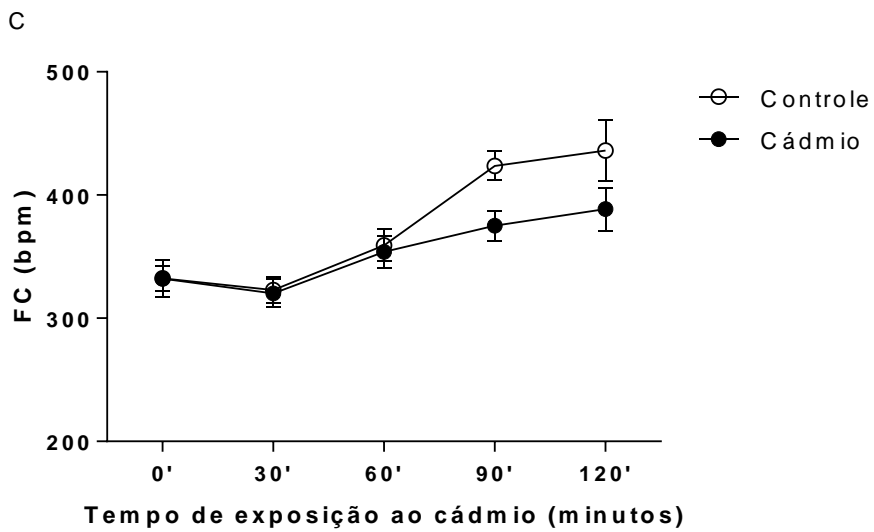
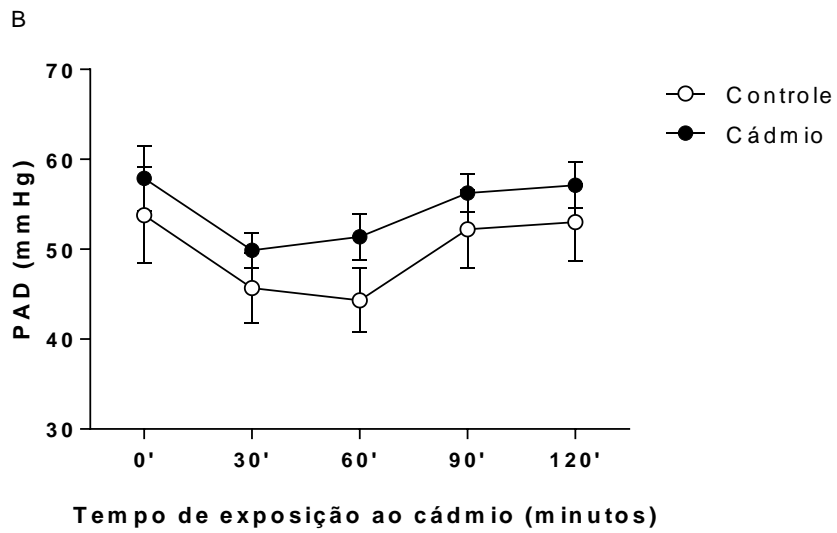
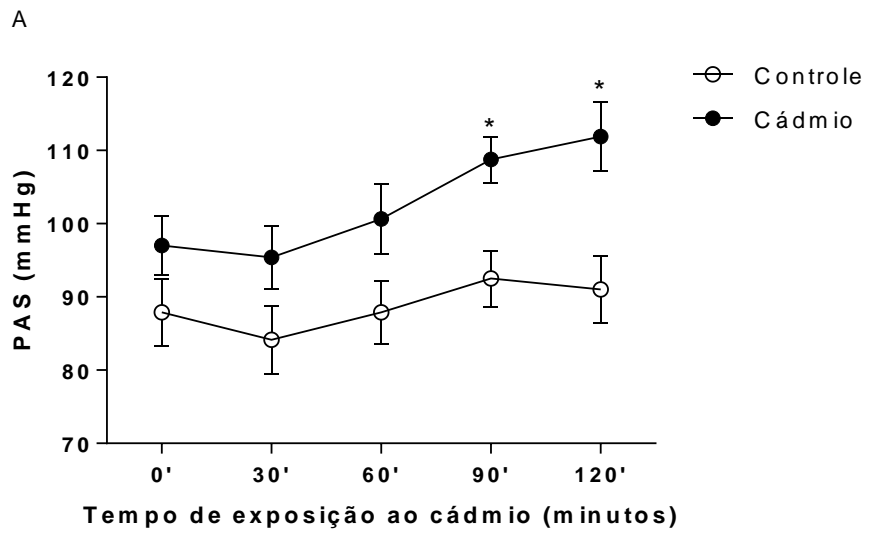


Figura 7. Avaliação pressórica durante 120 minutos de exposição ao cádmio. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. PAS (A), PAD (B) e FC (C) durante 120 minutos de exposição ao cádmio. * $p < 0.05$ vs tempo 0', determinado pela ANOVA duas vias com pós-teste de Bonferroni. $n = 8$.

4.2. Efeitos da exposição durante 120 minutos ao cádmio sobre a concentração sérica e tecidual do metal.

A concentração sanguínea de cádmio atingida no grupo exposto por 120 minutos ao metal foi de $1,5 \pm 0,5 \mu\text{g/dL}$ (figura 8). Tal valor é similar àquele encontrado em indivíduos ocupacionalmente expostos (WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. CADMIUM, 1992). Nós também observamos um significativo aumento da concentração de cádmio na aorta, nos pulmões e nos rins do grupo de animais expostos durante 120 minutos (aorta: $0,18 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$; pulmão: $0,18 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$; rim: $0,6 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$) (figura 8).

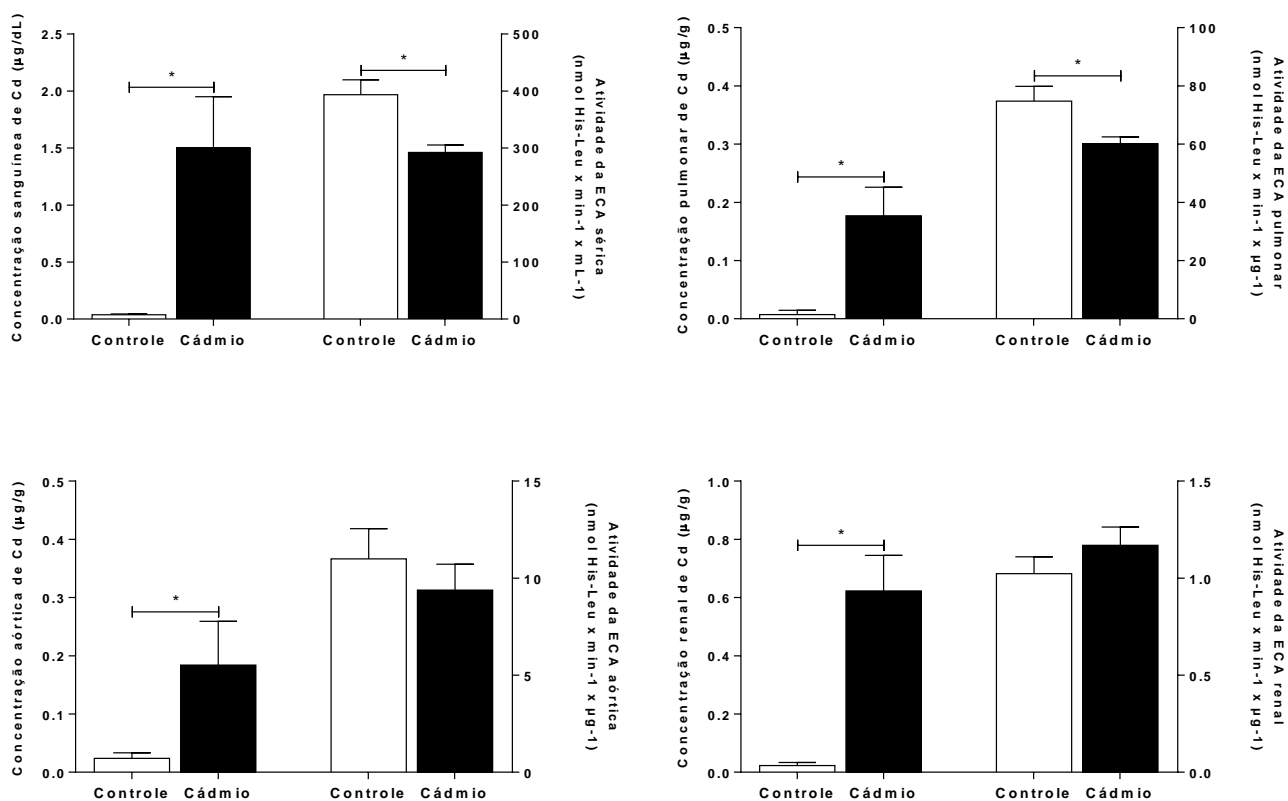


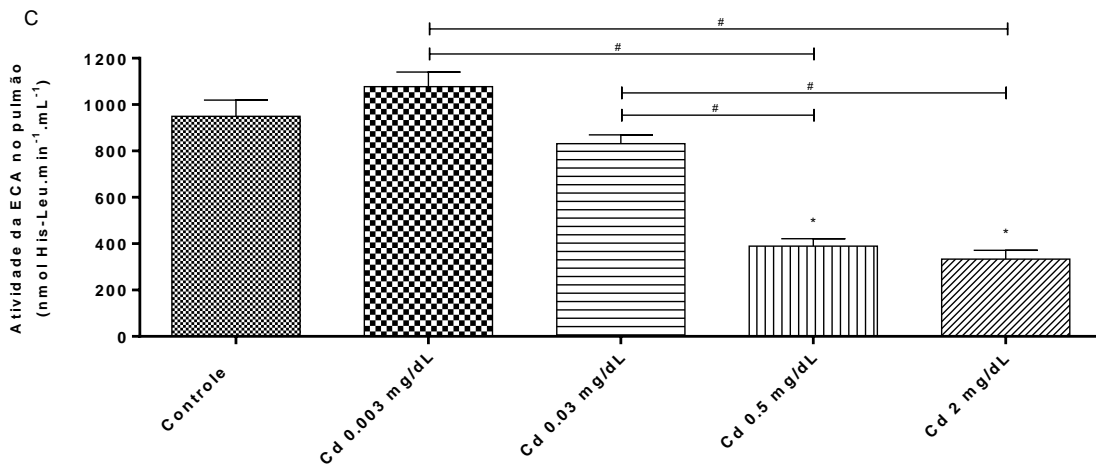
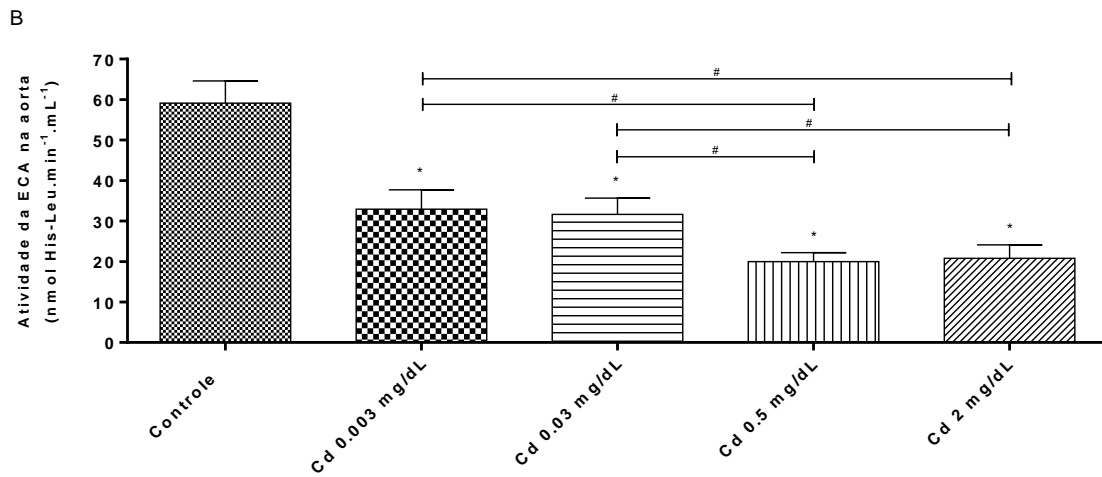
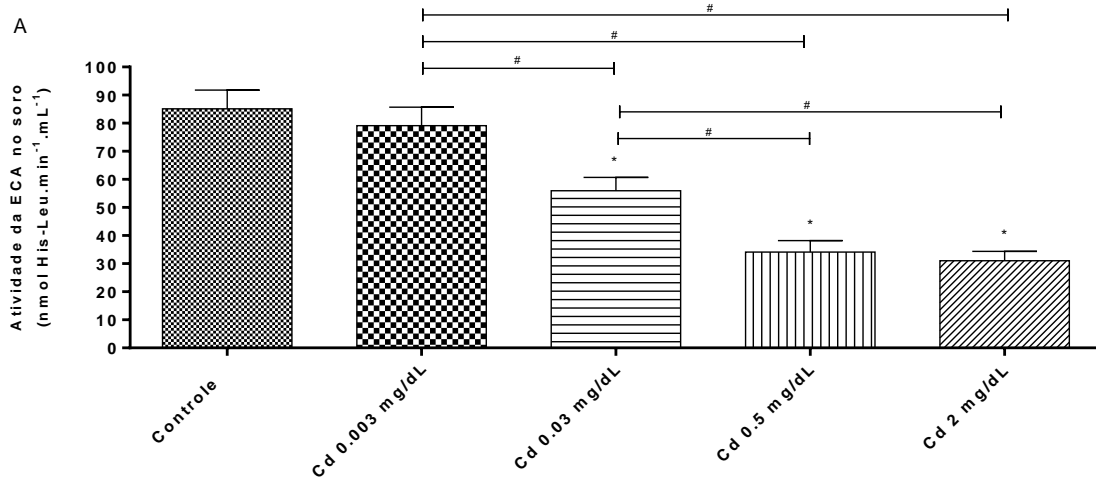
Figura 8. Atividade da ECA e concentração de cádmio após 120 minutos de exposição. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. A atividade da Eca sérica foi expressa em $\text{nmol His-Leu} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$. A atividade da ECA tecidual foi expressa como $\text{nmol His-Leu} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$. As Concentrações sanguínea e tecidual de cádmio foram expressos, respectivamente, em $\mu\text{g/dL}$ e $\mu\text{g/g}$. * $p < 0.05$ vs grupo controle determinado pelo test t-student. $n = 8$.

4.3. Efeitos da exposição durante 120 minutos ao cádmio sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina sérica e tecidual

Após 120 minutos de exposição ao cádmio, a atividade da ECA sérica e pulmonar foram reduzidas (figura 8), assim evidenciada pela redução do nível de HIS-LEU gerado no grupo cádmio quando comparado ao grupo controle. No entanto, a exposição aguda ao cádmio não alterou a atividade da ECA aórtica e nem a renal (figura 8).

4.4. Efeitos da exposição *in vitro* ao cádmio sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina sérica e tecidual

O efeito inibitório promovido pelo cádmio sobre a ECA sérica e pulmonar após 120 minutos de exposição foi corroborado pelos ensaios *in vitro*. Como exposto na figura 9, a atividade da ECA sérica, pulmonar e aórtica foi reduzida pela adição *in vitro* de cádmio em uma relação concentração dependente (figura 9). Assim, como após a exposição *in vivo* ao cádmio, a exposição *in vitro* não alterou a atividade da ECA renal.



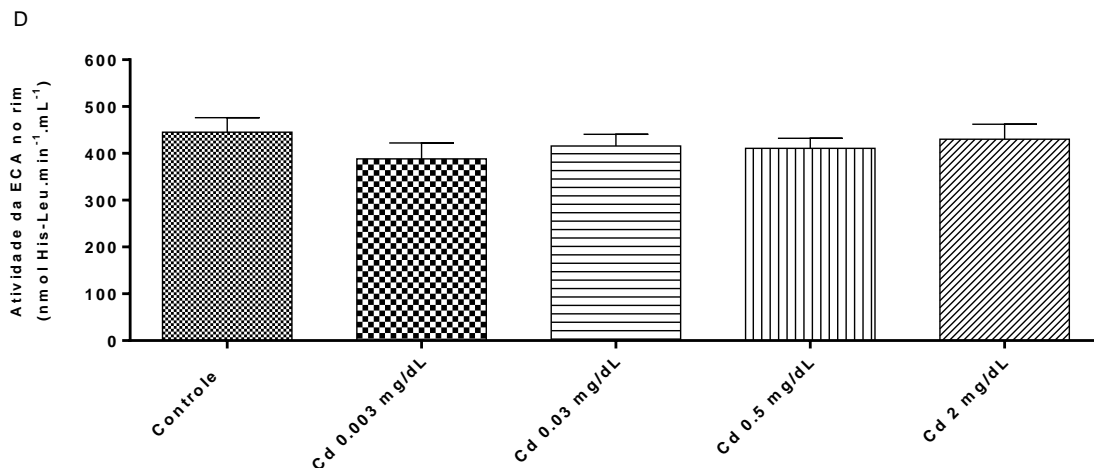


Figura 9. Atividade da ECA após a exposição *in vitro* ao cádmio. Atividade da ECA (A) sérica, (B) aórtica, (C) pulmonar e (D) renal após 5 minutos de exposição *in vitro* ao cádmio. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. A atividade da Eca foi expressa em $\text{nmol His-Leu} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$. * $p < 0.05$ vs Controle grupo; # $p < 0.05$; determinados pela ANOVA uma via com pós-teste de Tukey. $n = 8$.

4.5. Efeitos da suplementação *in vitro* com zinco sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina

A ação inibitória sobre a ECA exercida pela adição *in vitro* de cádmio foi parcialmente revertida pela suplementação *in vitro* com 1.2 mg/dL de zinco, a mesma concentração sérica de zinco em humanos (lab Sergio franco) (figura 10).

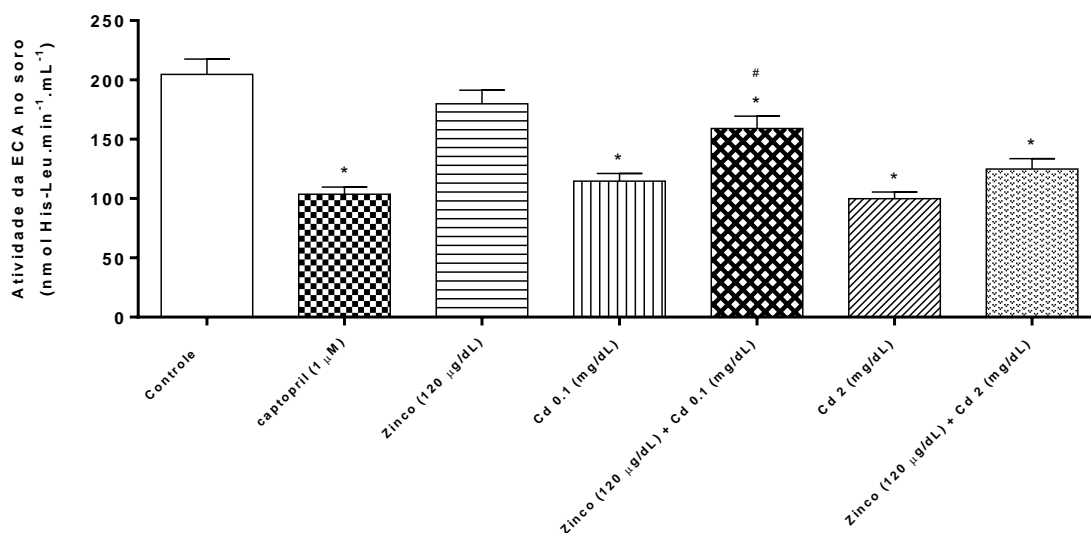


Figura 10. Atividade da ECA após 120 minutos de exposição *in vitro* ao cádmio e ao zinco. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM. As concentrações de cádmio foram expressas em $\mu\text{g/dL}$. A concentração de zinco utilizada foi expressa em $120 \mu\text{g/dL}$ e a concentração de captopril utilizada foi expressa em μM . * $p < 0.05$ vs Controle; # $p < 0.05$ vs Cd $1.5 \mu\text{g/dL}$, determinado pela ANOVA uma via com pós-teste de Tukey. $n = 8$.

4.6. Efeito inibitório promovido pelo captopril sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina sérica e tecidual.

O captopril foi utilizado como um controle de inibição da ECA durante os ensaios de exposição *in vitro* ao cádmio. O fármaco inibiu a atividade da ECA em amostras de soro, de pulmão e de aorta, mas não o fez em amostras de rim (tabela 1).

Tabela 1. Atividade da ECA frente a doses crescentes de captopril

	Control	Captopril 0.1 nM	Captopril 1 nM	Captopril 10 nM	Captopril 100 nM	Captopril 1 µM	Captopril 5 µM	Captopril 10 µM
Soro	105±09	89±10	80±07*	65±05*	48±04*	42±03*	40±03*	32±04*
Aorta	86±15	57±09	47±07*	49±07*	42±07*	46±09*	50±09*	52±10*
Pulmão	1110±50	1214±56	986±54	723±48*	490±40*	481±31*	439±42*	436±37*
Rim	270±18	262±18	274±18	276±18	281 ±17	287±18	293±21	295±17

A atividade da ECA foi expressa como as nmol His-Leu x min⁻¹ x mL⁻¹. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *p<0.05 vs CT grupo. n=8.

Uma vez que o captopril não inibiu a enzima em amostras de rim, utilizamos o mercúrio inorgânico (0,1 – 10 mM) para demonstrar a funcionalidade do protocolo de determinação da atividade da ECA (figura 5), já que estudos prévios indicam o mercúrio como um inibidor da ECA quando em altas concentrações (VASSALLO et al., 2011). Nós observamos que o mercúrio de fato promoveu inibição da ECA, reforçando a confiabilidade no método de análise de atividade da enzima.

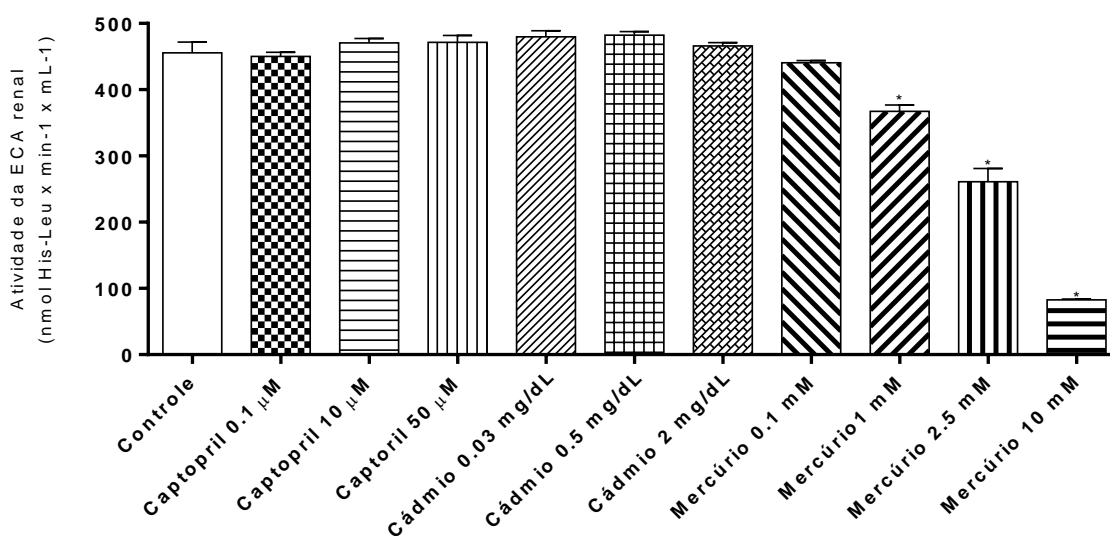


Figura 11. Atividade da ECA após a exposição *in vitro* ao mercúrio. Os resultados foram expressos como médias ± EPM. As concentrações de cádmio foram expressas em µg/dL. As concentrações de mercúrio utilizadas foram expressas em mM e as

concentrações de captopril utilizadas foram expressas em μM . * $p < 0.05$ vs grupo controle, determinado pela ANOVA uma via com pós-teste de Tukey. $n = 5$.

5. Discussão

O presente estudo demonstrou que após duas horas de exposição a baixas concentrações de cádmio o conteúdo do metal aumenta significativamente no sangue e nos órgãos dos animais expostos. A concentração sanguínea atingida após a exposição foi similar àquelas observadas em pessoas ocupacionalmente expostas ao cádmio (AFRIDI et al., 2010). O cádmio foi responsável por promover redução da atividade da ECA no soro, na aorta e nos pulmões. Esse efeito foi resultado da ação inibitória direta que cádmio exerce sobre a ECA e mostrou-se concentração dependente e parcialmente reversível pela suplementação *in vitro* de zinco, sugerindo que o cádmio possa interagir com o zinco presente nos sítios ativos da enzima.

Na população em geral, as maiores fontes de intoxicação com cádmio são pertinentes a ingestão de alimentos contaminados e a inalação da fumaça de cigarros ((ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2008).

Trabalhadores de empresas de produção de tintas, de baterias, de eletroplacas, de circuitos eletrônicos, refinarias de metais, fundições e soldagem configuram um grupo ocupacionalmente expostos ao cádmio e podem apresentar concentrações sanguíneas de cádmio entre 5 to 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. CADMIUM, 1992).

No presente estudo, a concentração sanguínea média de cádmio foi de 1.5 ± 0.5 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, menor do que àquelas observados em indivíduos ocupacionalmente expostos.

Entretanto, mesmo essa baixa concentração sanguínea e o curto período de exposição dos animais ao cádmio foram suficientes para aumentar a PAS. Esse resultado corrobora estudos prévios que demonstram que o cádmio é

capaz de promover aumento de pressão arterial após curtos períodos de exposição (PURI; SAHA, 2003; PURI; SUR, 1986; PURI, 1992; VARONI et al., 2010).

A pressão arterial é uma variável física, condicionada momento a momento por fatores que regularam a entrada e saída de sangue dos leitos arteriais e venosos e regida por sistemas de controle a curto e médio prazo — locais (mecanismo miogênico, fatores endoteliais, temperatura, metabolismo, etc.), neurais (mecano, quimio e termorreceptores) e hormonais (catecolaminas, sistema renina angiotensina-aldosterona, vasopressina, peptídeo atrial natriurético) — e a longo prazo (feedback rim-fluidos, neoformação e/ou rarefação de vasos) (GUYTON; HALL, 2006). A hipertensão é resultado de alterações patológicas nesses sistemas de controle que normalmente regulam a pressão arterial (MIN A. E. LEE, MARTIN PAUL, 1992). O sistema renina-angiotensina é um dos principais sistemas hormonais de controle da pressão (SPARKS et al., 2014), portanto, alterações nesse sistema podem resultar em hipertensão.

Metais traço, como o chumbo, promovem aumento de pressão arterial por estimularem a atividade da ECA sérica (SHARIFI et al., 2004; SIMÕES et al., 2011; VASSALLO et al., 2011). Entretanto, estudos prévios demonstraram que a hipertensão induzida pela exposição aguda ao cádmio não resulta da elevação da atividade da ECA sérica (PURI; SAHA, 2003; PURI, 1992). Nossos resultados também indicaram isso, pois observamos que após 120 minutos de exposição ao cádmio a atividade da ECA sérica diminui.

Nesse momento é importante ressaltar que existe um sistema renina-angiotensina local presente em diversos órgãos, incluindo os rins e a vasculatura (SAMANI et al., 1987; SUZUKI et al., 1988), que pode, independentemente do SRA circulatório, atuar como um sistema de regulação da pressão sanguínea (MIN A. E. LEE, MARTIN PAUL, 1992), (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). Por exemplo, Nakamura et al (1987) demonstraram que os níveis de atividade da ECA na aorta e nas veias braquial e mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) estavam elevados quando comparados a ratos normotensos Wistar-Kyoto, entretanto, o nível de atividade

da ECA plasmática nos ratos SHR estavam diminuídos, indicando que o SRA local pode estar contribuindo com a hipertensão (NAKAMURA; NAKAMURA; MATSUKURA, 1988).

Somado a isso e porque nossos resultados demonstraram que após duas horas de exposição ao cádmio o conteúdo do metal aumenta significativamente no pulmão, na aorta e no rim dos animais do grupo exposto quando comparado ao grupo controle, nós investigamos o nível de atividade da ECA nesses tecidos. Nossos resultados demonstraram que duas horas de exposição ao cádmio promoveu efeitos distintos sobre a atividade da ECA desses órgãos. Surpreendentemente, o cádmio reduziu a atividade da ECA pulmonar, mas não exerceu efeito significativo algum sobre a atividade da ECA aórtica e renal após duas horas de exposição. Diferentemente, Angeli et al (2013) demonstrou que a incubação de cádmio (10 μ M) ativou a ECA em anéis isolados de aorta de ratos, contribuindo com a disfunção endotelial induzida por esse metal (ANGELI et al., 2013). E ainda, Varoni et al (2010), também demonstraram que a infusão intracerebroventricular de cádmio aumentou a pressão sanguínea e promoveu ativação do SRA cerebral em ratos com níveis reduzidos de calcitreína (VARONI et al., 2010). Nós sugerimos que a discrepância entre os resultados observados por esses autores e os nossos resultados possa ser devido a concentração de cádmio utilizado, a linhagem dos animais, ao tempo e a forma de exposição que os ratos foram submetidos.

O aumento da estimulação simpática, diminuição da tensão vascular na arteríola aferente renal e a redução da carga filtrada de sódio que alcança a mácula densa são alterações observadas durante a diminuição da pressão arterial que estimulam a secreção de renina pelas células justaglomerulares (GUYTON; HALL, 2006). De maneira oposta, quando ocorre elevação da pressão arterial, essas alterações se invertem e com isso ocorre diminuição da secreção de renina e, conseqüentemente, diminuição da atividade de todo o sistema renina angiotensina. Além disso, a atividade da ECA propriamente dita pode ser alterada por fatores tais como a atividade simpática e o aumento da pressão sanguínea por si só (SAXENA, 1992). Portanto, para esclarecer se a redução da atividade da ECA é resultado de uma ação direta do cádmio sobre a enzima ou ocorreu apenas como resposta ao aumento de pressão sanguínea

acarretado pela exposição ao cádmio, nós conduzimos ensaios de avaliação da atividade da ECA após a exposição *in vitro* ao cádmio, eliminando assim outros fatores fisiológicos que poderiam estar influenciado com a atividade da enzima. Fazendo isso, nós demonstramos pela primeira que 5 minutos de exposição *in vitro* ao cádmio inibe a enzima conversora de angiotensina do soro, dos pulmões e da aorta. Porém, esse efeito não foi observado sobre a ECA renal. Captopril foi utilizado como um controle de inibição da ECA e foi eficaz ao reduzir a atividade da enzima no soro, no pulmão e na aorta, mas não inibiu a atividade da enzima no rim nesse modelo de estudo.

Para confirmar a eficiência do teste empregado na análise de atividade da ECA, nós conduzimos estudos *in vitro*, nos quais efetuamos a incubação de concentrações crescentes de mercúrio em amostras de rim; o mercúrio interage com os resíduos sulfidrilas presentes na ECA, inibindo sua ação (VASSALLO et al., 2011). De fato, após a incubação do mercúrio, a ECA foi parcialmente inibida nessas amostras. Nós especulamos que o captopril pode não ter exercido seu efeito inibitório sobre a ECA renal porque o tempo de exposição não foi suficiente; a ação inibitória do captopril tem sido demonstrada em modelos experimentais de exposição crônica ao fármaco (MIN A. E. LEE, MARTIN PAUL, 1992; UNGER; GANTEN; LANG, 1987). Além disso, Segundo Unger et al (1987) inibidores da ECA (iECA) exercem efeitos diferentes sobre o SRA de diferentes órgãos. Os autores demonstraram que o tratamento com ramipridil diminuiu os níveis de angiotensina II na aorta, no átrio e na glândula adrenal, mas não alterou os níveis de angiotensina II nos ventrículos e, na verdade, aumentou os níveis de angiotensina II no hipotálamo de coelhos(UNGER; GANTEN; LANG, 1987).

Como previamente mencionado, a ECA é uma zinco metalo-enzima (STURROCK et al., 2004). De fato, a depleção de zinco no organismo causa uma redução proporcional da atividade a ECA sérica e tecidual (RIPA; RIPA, 1994). Além disso, os dois átomos de zinco na molécula da ECA podem ser trocados por outros metais por meio do processo de transmetalção (COROT et al., 1998; VASSALLO et al., 2011), o qual, por sua vez, pode afetar a atividade da enzima. Portanto, nós conduzimos ensaios *in vitro* no qual amostras de soro foram incubadas com cádmio, frente à suplementação ou não

de zinco, para avaliar se o efeito inibitório exercido pelo cádmio sobre a ECA ocorre como resultado de uma competição do metal com o zinco. Embora a suplementação com zinco não tenha restaurado completamente a atividade da ECA a níveis comparáveis ao grupo controle, ela promoveu um aumento na atividade da enzima no grupo exposto a 1.5 µg.dL⁻¹ de cádmio. Entretanto, resultado similar não foi observado no grupo exposto ao cádmio na concentração de 30 µg.dL⁻¹, indicando uma possível competição entre o cádmio e o zinco presente nos sítios ativos da ECA (CARVALHO et al., 1995).

Por fim, nossos resultados sugerem que o aumento da pressão arterial induzido pela exposição ao cádmio pode não ser causado, ao menos inicialmente, pelo aumento da atividade da ECA sérica, pulmonar, aórtica e renal. Alguns estudos já demonstraram que o cádmio promove elevação dos níveis de catecolaminas circulantes, aumento da contratilidade do músculo liso vascular e dano vascular por aumentar o estresse oxidativo (BALARAMAN et al., 1989; HOUSTON, 2007; SKOCZYNSKA; STOJEK, 2005), é provável que esses mecanismos possam estar envolvidos com a elevação de pressão constatada após a exposição aguda ao cádmio.

6. Conclusão

Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que o cádmio exerce efeito inibitório direto e concentração dependente sobre a enzima conversora de angiotensina do soro, do pulmão e da aorta. Além disso, o efeito inibitório pode ser parcialmente revertido por meio da suplementação com zinco. Após a exposição aguda in vivo, as ações do cádmio sobre a ECA também foram observados e acompanhadas pelo aumento da pressão sanguínea. Entretanto, o aumento da pressão arterial induzido pela exposição aguda ao cádmio parece não estar associado ao aumento da atividade da ECA. Mais estudos são necessários para explicar, a nível molecular, a relação entre o cádmio e o zinco e tentar elucidar os mecanismos envolvidos com o aumento da pressão arterial após a exposição aguda ao cádmio. Finalmente, é importante enfatizar

que nossos dados reforçam a importância do cádmio como um contaminante ambiental que, quando em contato com o organismo, promove danos à saúde por gerar efeitos prejudiciais ao sistema cardiovascular e alterações enzimáticas.

7. Referências

ACGIH AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS . Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: **American Conference of Governmental Industrial Hygienists**. 2007.

(ATSDR) AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Cadmium. 2008.

AFRIDI, H. I. et al. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. **Journal of human hypertension**, v. 24, p. 34–43, 2010.

ALMENARA, C. C. P. et al. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

ANGELI, J. K. et al. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. **Free radical biology & medicine**, v. 65, p. 838–48, 2013.

BADER, M. et al. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 79, p. 76–102, 2001.

BALARAMAN, R. et al. Cadmium-induced hypertension in rats. **Pharmacology**, v. 38, p. 226–234, 1989.

BASSO, N.; TERRAGNO, N. A. History about the discovery of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 38, p. 1246–1249, 2001.

CARVALHO, E. et al. Effect of inhibitors on the coordination geometries of cadmium at the metal sites in angiotensin-I-converting enzyme. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 234, p. 780–785, 1995.

COPEL, R. et al. Uptake of cadmium from Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in British Columbia oyster growers. **Environmental Research**, v. 107, p. 160–169, 2008.

COROT, C. et al. Structure-activity relationship of macrocyclic and linear gadolinium chelates: Investigation of transmetallation effect on the zinc-dependent metallopeptidase angiotensin-converting enzyme. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 8, p. 695–702, 1998.

COSTEROUSSÉ, O. et al. Angiotensin I-converting enzyme (kininase II) in cardiovascular and renal regulations and diseases. **Biological Research**, v. 31, p. 161–167, 1998.

DANSER, A. H. J. **Local renin-angiotensin systems** **Molecular and Cellular Biochemistry**, 1996.

DZAU, V. J. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. **Journal of hypertension**, v. 7, p. 933–936, 1989.

EL-DORRY, H. A. et al. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 14128–14133, 1982.

EUM, K. D.; LEE, M. S.; PAEK, D. Cadmium in blood and hypertension. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 147–153, 2008.

FUCHS, S. et al. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. **Hypertension**, v. 51, p. 267–274, 2008.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. **Renin-angiotensin system revisited** **Journal of Internal Medicine**, 2008.

GRIENDLING, K. K.; LASSEGUE, B.; ALEXANDER, R. W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 36, p. 281–306, 1996.

GUYTON, A.; HALL, J. **Fisiologia médica**. [s.l: s.n.]. v. 37

HASSLER, E.; LIND, B.; PISCATOR, M. Cadmium in blood and urine related to present and past exposure. A study of workers in an alkaline battery factory. **British journal of industrial medicine**, v. 40, p. 420–425, 1983.

HOUSTON, M. The Role of Mercury and Cadmium Heavy Metals in Vascular Disease, Hypertension, Coronary Heart Disease, and Myocardial Infarction. **Altern Ther Health Med**, p. 128–134, 2007.

MENKE, A. et al. Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 190–196, 2009.

MIN A. E. LEE, MARTIN PAUL, M. B. AND D. G. Effects of Angiotensin-Converting Enzymelinhibitors on Tissue Renin-Angiotensin Systems. **The American journal of cardiology**, v. 70, 1992.

NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, K.; MATSUKURA, T. Vascular angiotensin converting enzyme activity in spontaneously hypertensive rats and its inhibition with cilazapril. **Journal of hypertension**, v. 6, p. 105–110, 1988.

NAWROT, T. S. et al. Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the Cadmium body burden of an Environmentally exposed population. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 1620–1628, 2008.

NISHIJO, M. et al. Causes of death and renal tubular dysfunction in residents exposed to cadmium in the environment. **Occupational and environmental medicine**, v. 63, p. 545–550, 2006.

NORDBERG, G. F.; KJELLSTROM, T. **Metabolic model for cadmium in man** **Environmental Health Perspectives**, 1979.

NRIAGU, J. O. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. **Nature**, v. 338, p. 47–49, 1989.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. **Nature**, v. 333, p. 134–139, 1988.

PACYNA, J. M.; PACYNA, E. G. **An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide** **Environmental Reviews**, 2001.

PURI, V. N. Acute effects of cadmium on the renin angiotensin system in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 187–188, 1992.

PURI, V. N.; SAHA, S. Comparison of acute cardiovascular effects of cadmium and captopril in relation to oxidant and angiotensin converting enzyme activity in rats. **Drug and chemical toxicology**, v. 26, p. 213–218, 2003.

PURI, V. N.; SUR, R. N. Effect of cadmium clonidine interaction in rats. **Pharmacological research communications**, v. 18, p. 1119–1122, 1986.

RIPA, S.; RIPA, R. Zinc and arterial pressure. **Minerva medica**, v. 85, p. 455–459, 1994.

ROELS, H. et al. Evolution of cadmium-induced renal dysfunction in workers removed from exposure. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v. 8, p. 191–200, 1982.

SAMANI, N. J. et al. Detection of renin messenger RNA in rat tissues: increased sensitivity using an RNase protection technique. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, v. 5, p. S19–S21, 1987.

SATARUG, S. et al. Cadmium-induced nephropathy in the development of high blood pressure. **Toxicology letters**, v. 157, p. 57–68, 2005.

SATARUG, S.; MOORE, M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 1099–1103, 2004.

SAXENA, P. R. Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 19 Suppl 6, p. S80–S88, 1992.

SHARIFI, A. M. et al. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 233–238, 2004.

SIMÕES, M. R. et al. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of the renin-angiotensin system. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18730, jan. 2011.

SKEGGS, L. T.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **The Journal of experimental medicine**, v. 103, p. 295–299, 1956.

SKOCZYNSKA, A.; STOJEK, E. The impact of subchronic lead poisoning on the vascular effect of nitric oxide in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 99–106, 2005.

SOUBRIER, F. et al. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 9386–9390, 1988.

SPARKS, M. A. et al. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. **Comprehensive Physiology**, v. 4, p. 1201–28, 2014.

STURROCK, E. D. et al. Structure of angiotensin I-converting enzyme. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, p. 2677–2686, 2004.

SUZUKI, F. et al. Renin gene expression in rat tissues: a new quantitative assay method for rat renin mRNA using synthetic cRNA. **Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice**, v. 10, p. 345–359, 1988.

TELLEZ-PLAZA, M. et al. Cadmium exposure and hypertension in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). **Environmental health perspectives**, v. 116, p. 51–56, 2008.

UNGER, T.; GANTEN, D.; LANG, R. E. Effect of converting enzyme inhibitors on tissue converting enzyme and angiotensin II: therapeutic implications. **The American journal of cardiology**, v. 59, p. 18D–22D, 1987.

VARONI, M. V et al. Brain renin-angiotensin system modifies the blood pressure response to intracerebroventricular cadmium in rats. **Drug and chemical toxicology**, v. 33, p. 302–309, 2010.

VASSALLO, D. V. et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 939–946, set. 2011.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. CADMIUM. Environmental Health Criteria 134. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva, Switzerland. 1992.

WHYTE, A. L. H. et al. Human dietary exposure to heavy metals via the consumption of greenshell mussels (*Perna canaliculus* Gmelin 1791) from the Bay of Islands, northern New Zealand. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4348–4355, 2009.

WILLIAMS, T. A. et al. A comparison of the zinc contents and substrate specificities of the endothelial and testicular forms of porcine angiotensin converting enzyme and the preparation of isoenzyme-specific antisera. **The Biochemical journal**, v. 288 (Pt 3, p. 875–881, 1992.

ZAMAN, M. A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, p. 621–636, 2002.

ZHANG, W. et al. Anti-inflammatory effects of formoterol and ipratropium bromide against acute cadmium-induced pulmonary inflammation in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, p. 171–178, 2010.

Anexo I - Artigo