

Avaliação da Deposição de Placa Aterosclerótica e
Disfunção Vascular em Aorta de Camundongos
ApoE^{-/-} Após Exposição Crônica ao Cádmio

Thiago Fernandes de Oliveira

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

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

Vitória
2018

THIAGO FERNANDES DE OLIVEIRA

**Avaliação da Deposição da Placa Aterosclerótica e Disfunção
Vascular em Aorta de Camundongos ApoE-/- Após Exposição
Crônica ao Cádmi**

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

Aprovada: ___/___/2018, por:

Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha – Orientadora, UFES

Prof^a. Dr^a. Priscila Rossi de Batista – Co-orientadora, Emescam

Dr. Jones Bernardes Graceli – Membro Interno - UFES

Dr^a. Camila Almenara Cruz Pereira – Membro externo - UFES

Prof^a Dr^a. Camille de Moura Balarini – Membro externo - UFPB

Coordenadora do PPGCF: Dr^a. Sônia Alves Gouvêa

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 2018

“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” (Marthin Luther King)

*Ao meus pais, Angelica e Carlos,
por estarem sempre ao meu lado.*

Agradecimentos

A Deus pelas oportunidades, pela saúde e pela sabedoria dada durante o período.

Aos meus pais, por todo incentivo e força, ensinamentos, exemplos e por terem aceitado as minhas escolhas. Por terem aberto mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus e por toda educação e amor que me deram.

A minha irmã, pelo incentivo, por me ajudar nas correções dos textos e pela companhia.

A minha tia/madrinha, Cláudia, pelo incentivo, por torcer sempre por mim e por estar sempre disposta a me ajudar. Aos demais familiares por estarem sempre do meu lado.

A Prof^a. Dr^a. Juliana Hott, por ter aberto as portas do laboratório para que pudesse começar minha trajetória na pesquisa e pelos ensinamentos e confiança depositada em mim.

A Prof^a. Dr^a. Alessandra Padilha, por ter me dado a oportunidade de fazer o mestrado no laboratório e acreditar no meu potencial, por estar sempre à disposição para me ajudar e me orientar e pela companhia durante as corridas.

A Prof^a. Dr^a. Priscila Rossi, por ter me ajudado nos experimentos, me aconselhado, ensinado e por ter aceitado ser minha co-orientadora.

A Prof^a. Dr^a. Silvana Meyrelles e ao Marquinhos, por terem me ensinado técnicas, orientado, cedido os animais para que eu pudesse realizar os experimentos.

Aos professores responsáveis pelo laboratório, Prof. Dr. Dalton, Prof^a. Dr^a. Ivanita e Prof. Dr. Leonardo pelos ensinamentos e pelas ajudas.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação, pelo conhecimentos que foram passados e pelos momentos que vivemos durante o período.

Ao Gilson, Renata, Camila, Emilly, João Vitor, Karol Zuqui, Maylla, Bianca Torres, Marito, Dieli pela amizade, conselhos, ajudas, momentos de descontração que tivemos e que fizeram valer mais a pena o mestrado e a iniciação científica.

A todos os membros do laboratório pela companhia e por tornarem o ambiente mais tranquilo e divertido para trabalhar.

Ao Felipe Strela, Gérsica, Filipe Filetti, Gérsica, Antônio e demais alunos do programa de pós graduação.

A Rosi Ervati, Carol, Mayara M., Mayara S., Rafaela, Giovana e Paulo Vitor pela amizade desde a graduação até hoje e pelas ajudas e conversas

Ao grande amigo/irmão que a vida me deu, Patrick, mesmo estando longe sempre torceu por mim.

A Bárbara e Larissa, pela companhia e ajudas nos experimentos e por serem tão prestativas.

A Bruna Marchezini, por ter me ajudado tanto no eu início no laboratório, me aconselhado, por uma grande amiga que o laboratório e a graduação me deu.

Aos demais colegas e amigos que estiveram comigo durante a graduação.

Ao Osni, Gustavo, Maxssuel, Natália, Adrieli, Renata Faé, Hagesandro, Ana Raquel, Thátira e Thainan pela amizade e pelas ajudas durante o período.

Aos fisioterapeutas Flávio Meirelles, Jorge Santos e Adriana Bassini pelas oportunidades que me foram dadas e pelos conhecimentos ensinados.

A todos os professores, desde do ensino fundamental até a graduação, pela dedicação e ensinamentos.

Meu muito obrigado a todos! Nada seria possível sem vocês!

Às agências de fomento, CAPES e FAPES.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE O CÁDMIO	17
1.2	EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO	18
1.3	EFEITOS DA INTOXICAÇÃO NO ORGANISMO	19
1.4	EFEITOS DA INTOXICAÇÃO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR	20
1.5	ATEROSCLEROSE	25
1.6	MODELO EXPERIMENTAL CAMUNDONGO APOE KNOCKOUT (APOE ^{-/-})	28
1.7	ESTRESSE OXIDATIVO	29
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	37
4.2	MODELO EXPERIMENTAL	37
4.3	PESO DOS ANIMAIS	38
4.4	DOSAGEM DO COLESTEROL	38
4.5	OBTENÇÃO DOS ANÉIS DE AORTA TORÁCICA	38
4.6	REATIVIDADE VASCULAR	39
4.6.1	Avaliação da integridade do músculo liso vascular	38
4.6.2	Avaliação da integridade do endotélio	39
4.6.3	Protocolos experimentais	39
4.6.3.1	Efeito da exposição ao cloreto de cádmio por 28 dias sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio	40
4.6.3.2	Efeito da exposição ao cloreto de cádmio por 28 dias sobre a resposta vasoconstritora à FE	40

4.6.3.3 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio por 28 dias sobre a resposta vasodilatadora independente do endotélio	41
4.6.3.4 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio por 28 dias sobre os fatores endoteliais.....	41
4.7 ANÁLISE DA ATEROSCLEROSE	41
4.7.2 Análise morfométrica	42
4.8 COLETA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA	43
4.8.1 Quantificação e viabilidade das células hematopoiéticas	44
4.8.2 Determinação dos níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio e de NO por citometria de fluxo	44
4.9 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS.....	49
5.1 PESO DOS ANIMAIS	49
5.2 CONSUMO DE RAÇÃO	49
5.3 DOSAGEM DE COLESTEROL	50
5.4 REATIVIDADE VASCULAR	51
5.5 MEDIDA DA PLACA DE ATEROSCLEROSE	56
5.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA	57
6 DISCUSSÃO	62
6.1 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NO GANHO PONDERAL E NO CONSUMO DE RAÇÃO.....	62
6.2 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NO COLESTEROL TOTAL.....	63
6.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA E AO POTÁSSIO	65
6.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA E AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO	66
6.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NA SOBRE A VIA DO NO.....	67

6.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NO DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE.....	69
6.7 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd POR 28 DIAS SOBRE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS.....	70
7 CONCLUSÃO	74
8 REFERÊNCIAS.....	77

Lista de Tabelas

Tabela 1: peso dos animais no início e no final da exposição ao Cd por 28 dias

Tabela 2: variação do ganho ponderal durante a exposição ao Cd por 28 dias

Tabela 3: média do consumo de ração diário pelos animais durante a exposição ao Cd por 28 dias.

Tabela 4: média da contração a solução rica em potássio (120 mM).

Tabela 5: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD2) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina em segmentos isolados de aorta dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd e C57 Ct.

Tabela 6: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD2) das curvas de concentração-resposta à acetilcolina em segmentos isolados de aorta dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd e C57 Ct.

Tabela 7: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD2) das curvas de concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em segmentos isolados de aorta dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd e C57 Ct.

Tabela 8: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD2) a curva de concentração-resposta a fenilefrina em segmentos isolados de aorta encubação com L-NAME ou não dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd.

Lista de Figuras

- Figura 1: O cádmio induzindo processo de necrose em células endoteliais
- Figura 2: Cádmio induzindo mudanças pro-aterogênicas na parede vascular. Um esquema hipotético de como o Cd pode induzir e promover aterosclerose na parede vascular.
- Figura 3: Esquema representativo do miógrafo de arame para análise da reatividade vascular, gaseificado com mistura carbogênica, ligado a um sistema de aquisição de dados biológicos e a um computador, para registro.
- Figura 4: Dosagem do colesterol sérico dos animais C57 Ct, ApoE^{-/-} Ct e os ApoE^{-/-} Cd.
- Figura 5: Curvas-concentração resposta à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos C57 Ct, ApoE^{-/-} Ct e ApoE^{-/-} Cd.
- Figura 6: Curvas-concentração-resposta à ACh em anéis de aorta de camundongos ApoE^{-/-} Cd, C57 Ct e ApoE^{-/-} Ct.
- Figura 7: Curvas concentração-resposta ao Nitroprussiato de sódio para estudo do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de camundongos dos grupos: ApoE^{-/-} Ct, C57 Ct e ApoE^{-/-} Cd.
- Figura 8: Curvas concentração-resposta à acetilcolina na presença ou não do L-NAME em segmentos de aorta de camundongos expostos ApoE^{-/-} ou não ao Cd
- Figura 9: Fotos típicas das secções transversais do arcos aórticos. A seta indica lesão aterosclerótica corada com Oil-Red-O. Barra de escala: 200 µm com (A e B) a objetiva de 4x. (C) O gráfico de barras indica a área do arco aórtico corado pelo Oil-Red-O. ApoE^{-/-} Ct (n=3) e ApoE^{-/-} Cd (n=4).
- Figura 10: Análise da produção de NO em células hematopoiéticas.
- Figura 11: Análise da produção de ânion superóxido em células hematopoiéticas.
- Figura 12: Análise da produção de peroxinitrito em células hematopoiéticas
- Figura 13: Análise da produção do peróxido de hidrogênio em células hematopoiéticas.
- Figura 14: Esquema sintetizando o efeito que o Cd provoca na reatividade vascular e na células hematopoiéticas. Figuras retiradas (Tese de Camila Almenara, 2017 e todamateria.com.br) e adaptadas.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

% - por cento

°C – grau Celsius

ACh - acetilcolina

ANOVA – análise de variância

ApoE^{-/-} - *knockout* para a lipoproteína E

ATP- adenosina trifosfato

A.U. – unidade arbitrária

Ca²⁺ - cálcio

Cd – cádmio

CdCl₂ – cloreto de cádmio

CPTP - complexo de poros de transição de permeabilidade

Ct - controle

CH - células hematopoiéticas

DAG - diacilglicerol

DAF - 4,5-diaminofluoresceína- 2/diacetato

DCFH-DA - 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína

DCV – doenças cardiovasculares

DHE - dihidroetídeo

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma

dL- decilitro

EPM – erro padrão da média

ERO – espécie reativas de oxigênio

FE – fenilefrina

HAS – hipertensão arterial sistêmica

HDL - lipoproteína de alta densidade

HPF – hidroxifenilfluoresceína

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IP3 - inositol 1,4,5-trifosfato

Kg – quilograma

L – litro

L-NAME - NG-nitro-L-arginina metil éster

LDL - lipoproteína de baixa densidade

MFI – mediana de intensidade de fluorescência

mL -mililitro

mm - milímetros

ng/m³ - nano grama por metro cúbico

NPS – nitroprussiato de sódio

NO - óxido nítrico

OCT - phosphazene base P4-t-Oct

FBS-iFBS - PBS inativado

PBS - Tampão fosfato-salino

Ppb – partícula por bilhão

Ppm – partícula por milhão

PVC - policloreto de vinila

rpm – rotações por minuto

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

WH - World Health Organization

µg – micrograma

RESUMO

Introdução: A exposição ao cádmio está relacionada com doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão e aterosclerose, provavelmente vinculadas ao aumento do estresse oxidativo induzido por esse metal. **Objetivo:** o presente estudo investigou se a exposição ao cádmio poderia acelerar a formação de placa de aterosclerose e concomitantemente promover disfunção endotelial em aorta, além de aumentar o estresse oxidativo em camundongos knockout para a lipoproteína E (ApoE^{-/-}). **Métodos:** os experimentos foram realizados com camundongos ApoE^{-/-} e com C57BL/6 machos com 14 semana de idade, que receberam cloreto de cádmio (CdCl₂ 100 mg / L em água potável durante 28 dias) ou veículo (água destilada). Após a exposição ao metal foi realizada a dosagem do colesterol, análise da reatividade vascular à fenilefrina, à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em aorta isolada. As células da medula óssea foram isoladas para avaliar a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e no arco aórtico foi mensurada a placa aterosclerótica. **Resultado:** Camundongos ApoE^{-/-} expostos ao cádmio apresentaram níveis mais elevados de colesterol do que os não expostos. A exposição ao cádmio diminuiu a resposta vasodilatadora à acetilcolina do anel aórtico em camundongos ApoE^{-/-}, embora não tenham sido observadas alterações nas respostas à fenilefrina ou ao nitroprussiato de sódio. O L-NAME reduziu a resposta vasodilatadora à acetilcolina, mas este efeito foi menor em camundongos ApoE^{-/-} tratados com cádmio, sugerindo uma redução na biodisponibilidade do óxido nítrico neste grupo experimental. Além disso, nas células hematopoiéticas, o cádmio diminuiu os níveis citoplasmáticos de óxido nítrico e aumentou ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito em camundongos ApoE^{-/-} expostos ao cádmio. A análise morfológica mostrou que a exposição ao cádmio aumentou a deposição de placa na aorta em aproximadamente 3 vezes comparados aos animais ApoE^{-/-} não expostos ao metal. **Conclusão:** nossos resultados sugerem que a exposição ao cádmio induz disfunção endotelial em camundongos ApoE^{-/-}. Além disso, o cádmio aumentou os níveis de colesterol total, o que pode justificar o desenvolvimento de aterosclerose na aorta de camundongos ApoE^{-/-}. Nossos achados sustentam a hipótese de que a exposição ao cádmio pode aumentar o risco de aterosclerose.

Palavras chaves: cádmio, aterosclerose, disfunção endotelial estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Cadmium exposure is related to cardiovascular diseases, including hypertension and atherosclerosis, which are linked to oxidative stress induced by this metal. **Objective:** the present study investigated whether the exposure to cadmium promotes the formation of atherosclerotic plaque and promotes endothelial dysfunction in the aorta, in addition to oxidative stress in knockout mice for lipoprotein E (ApoE^{-/-}). **Methods:** Experiments were performed on 14 week-old male C57BL / 6 and ApoE^{-/-} mice treated with cadmium chloride (100 mg / L CdCl₂ in drinking water for 28 days) or vehicle (distilled water). After exposure to the metal a cholesterol dosage was made and vascular reactivity in response to phenylephrine, acetylcholine or sodium nitroprusside were analysed in the isolated aorta. Bone marrow cells were isolated to evaluate the production of nitric oxide and reactive species of oxygen and nitrogen and the atherosclerotic plaque in the aortic arch was measured. **Result:** ApoE^{-/-} mice exposed to cadmium showed higher levels of cholesterol than the animals that were not exposed. Cadmium exposure reduced acetylcholine induced relaxation in ApoE^{-/-}, although it did not alter the responses elicited by phenylephrine or sodium nitroprusside. L-NAME incubation reduced the vasodilator response to acetylcholine, but this effect was smaller in cadmium treated ApoE^{-/-} mice, suggesting a reduction in nitric oxide bioavailability. In addition, in cells hematopoietic, cadmium decreased cytoplasmic levels of nitric oxide and increased superoxide anion, hydrogen peroxide and peroxynitrite in ApoE^{-/-} mice exposed to cadmium. Morphological analysis showed that cadmium-treated ApoE^{-/-} mice exhibited increased plaque deposition in the aorta by approximately 3-fold comparing to the non-treated ApoE^{-/-} mice. **Conclusion:** our results suggest that a cadmium exposure induces endothelial dysfunction in ApoE^{-/-} mice. In addition, cadmium increased cholesterol plasmatic levels, which may promote the development of atherosclerosis in the aorta of ApoE^{-/-} mice. Our findings support a hypothesis that the exposure to cadmium may increase the risk of atherosclerosis development.

Keywords: cadmium, atherosclerosis, endothelial dysfunction, oxidative stress

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O CÁDMIO

O Cádmio é um metal simbolizado pela sigla Cd, com peso molecular de 112.411 e seu número atômico é 48. É encontrado na tabela periódica no grupo IIB. Possui como características maleabilidade, ductilidade, resistência química e mecânica, além disso, possui coloração branco prateado (DUFFUS, 2002).

É um dos metais tóxicos mais importantes dispersos no meio ambiente, sendo liberado na natureza através de atividades vulcânicas, das profundidades oceânicas, remobilização de fontes antigas, como a poluição das águas subterrâneas causadas por drenagem de minas, e também por meio atividades humanas como o derretimento das calotas polares e a queima de combustíveis fósseis (WHO, 2000).

O cádmio está em sétimo lugar na lista de prioridades dos 275 materiais perigosos (ATSDR, 2008), sendo um dos produtos químicos que se encontra entre as dez principais preocupações em saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). No ambiente se torna perigoso devido ao consumo de plantas e de animais que acumulam.

Começou a ser utilizado em pinturas de Claude Monet, mas com o passar do tempo foi adquirindo novas funções. Hoje em dia é empregado em materiais de policloreto de vinila (PVC), pigmentos de tinta e em baterias recarregáveis de níquel-cádmio. Também pode ser usado em anticorrosivo e está presente como poluente em fertilizantes fosfatados. Outrossim, é usado pela mineração no refino de metais não ferrosos, e pode ser liberado para o ar durante a combustão de combustíveis fósseis e incineração e eliminação de resíduos (ATSDR, 2012). Através dessas fontes o metal pode acumular-se no meio aquático e no cultivo agrícola.

O cádmio não é considerado um dos metais essenciais e os efeitos tóxicos aumentam o risco de complicações adversas, principalmente nos rins, nos ossos e no sistema cardiovascular, podendo causar doenças malignas, como câncer de pulmão e rim, e mortes prematuras (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

De 1999 a 2004 a National Health and Nutrition Examination Surveys (NHNES) associou maiores concentrações de Cd no sangue e na urina com uso de tabaco, e

maior associação do metal no sangue com a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (TELLEZ-PLAZA et al., 2008).

1.2 EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO

Na população em geral as principais fontes de exposição ao Cd são a fumaça do cigarro, alimentos (especialmente frutos do mar, carnes, vegetais e grãos), água potável e ar atmosférico, especialmente nas áreas urbanas e industriais (ATSDR, 2012; SATARUG; MOORE, 2004)

De acordo com a *Internacional Cadmium Association*, a quantidade esperada de partículas suspensa de Cd no ar é de 0,1 a 5 ng/m³ em áreas rurais, 2 a 15 ng/m³ em áreas urbanas e em áreas industriais 15 a 150 ng/m³. Já em ambientes de trabalho a quantidade aceitável é de 2-50 ng/m³ (ELINDER et al., 1985; OECD, 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Indivíduos que fazem uso do tabaco, tem sua fumaça como a principal fonte de exposição ao cádmio uma vez que cada cigarro contém 0,5 a 2 ng/m³ de Cd, e aproximadamente 10% desse metal é inalado pelos fumantes. Além disso, pessoas que convivem com tabagistas, os fumantes passivos, podem inalar quantidades significantes do metal (ELINDER et al., 1985). Já o estudo de Viana et al. (2011) em 20 marcas de cigarros comercializados no Brasil encontrou uma média de 0,65 microgramas de Cd por grama de tabaco (DE SOUSA VIANA; GARCIA; MENEZES-FILHO, 2011).

Estima-se que o nível de Cd em fumantes da cidade de Nova York é de 1,58 µg/L, sendo que em não-fumantes esses níveis se limitam a 0,38 ug/L. Portanto, fumantes podem apresentar níveis quatro vezes maiores que a população não fumante. A quantidade do metal absorvida por dia é de 1 a 3 µg a cada maço fumado (ATSDR, 2012).

A utilização de fertilizantes fosfatados na agricultura faz com que as plantas absorvam o metal que está presente nesse adubo. O estudo de Bizarro et al. (2008) encontrou em amostras de fertilizantes fosfatados 42,93mg kg⁻¹ de teor de Cd. Adubações recorrentes fazem com o que a concentração do metal aumente no solo e conseqüentemente nas plantas (BIZARRO; MEURER; TATSCH, 2008).

Quando o solo é adubado com esses fertilizantes, animais e vegetais desse habitat acumulam partículas do metal. Calcula-se que os alimentos possuam em média; alface, espinafre, batata, amendoim, feijão, soja, semente de girassol (média 30-150 ppb), peixes e carnes (média de 5-40 ppb), rins e fígados (que são os órgãos de maior deposição do metal e podem alcançar 1000 ppb) (ATSDR, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Uma vez consumidos esses produtos, são absorvidos aproximadamente 1-5% de metal ingerido e 25-50% do montante de cádmio inalado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

De acordo com o relatório de 2010 da World Health Organization (WHO) e por consenso da Organização Internacional de Alimentos e Medicamentos e do Comitê Conjunto de Peritos para os Aditivos Alimentares, o nível aceitável de ingestão do Cd é de 25 µg/Kg de peso corporal por mês (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Uma vez absorvido, o cádmio pode permanecer no organismo por décadas, com meia vida estimada entre 15 e 30 anos. A longa meia vida do metal no organismo altera a associação entre o teor de cádmio aórtico e a relação maços/ano consumidos, acúmulo deste metal na aorta seja progressivo (NORDBERG; KJELLSTROM, 1979). Abu-Hayyeh *et al.*, (2001) demonstraram que o quantidade do metal em aortas de humanos eleva em proporção com os maços/ano de cigarros fumados, com o acúmulo seletivo na camada média (ABU-HAYYEH *et al.*, 2001).

1.3 EFEITOS DA INTOXICAÇÃO NO ORGANISMO

A deposição do metal no organismo ocorre principalmente nos tecidos renais e hepático, que correspondem a 60% do Cd acumulado (BABA *et al.*, 2013; MATOVIĆ *et al.*, 2011). Estudos demonstram que o acúmulo pode causar dano hepatocelular, atrofia testicular, hipertensão arterial sistêmica (HAS), disfunção renal, anemia e lesão no sistema nervoso central (JEYAPRAKASH; CHINNASWAMY, 2005; VICENTE-SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

Com a deposição do Cd no sistema esquelético, ocorre redução da resistência do tecido ósseo, por isso relacionam a exposição ao metal com fraturas e redução da densidade mineral óssea (osteoporose) (STAESSEN *et al.*, 1999). Além disso, no Japão, foi determinada a relação entre intoxicação pelo metal com a doença dói-dói, que é uma combinação de osteoporose com osteomalácia. Essa enfermidade foi descoberta em 1950, sendo associada à irrigação de plantações de arroz com água

contaminada com o metal e estudos realizados em outros países obtiveram desfechos semelhantes (FRIBERG, 1974).

Esse agente tóxico também tem sido associado à perda auditiva e à degeneração macular relacionada à idade (CHANTARAWONG et al., 2014; ERIE et al., 2007; SATARUG et al., 2010).

1.4 EFEITOS DA INTOXICAÇÃO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

Em estudos epidemiológicos transversais foi observado que baixos e moderados níveis de exposição ao Cd são associados com o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes, doenças renais crônicas, aterosclerose em carótida, doença arterial periférica, doenças do miocárdio, acidente vascular encefálico (AVE) e insuficiência cardíaca (TELLEZ-PLAZA et al., 2008). Menke et al. (2009) associaram a exposição ao Cd com aumento das mortes na população americana decorrente de doenças cardiovasculares (DCV) (MENKE et al., 2009).

As DCV causadas por esse metal podem resultar de distúrbios metabólicos como diabetes e dislipidemia. As anormalidades no perfil lipídico tem suma importância, pois essas alterações aumentam o risco das DCV, sendo que em pacientes diabéticos aumenta a taxa de mortalidade e morbidade (OZTURK et al., 2009).

Muitos estudos relatam que a exposição a esse agente é tóxica ao endotélio e ao músculo liso vascular, podendo ser um dos fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; FUJIWARA; WATANABE; KAJI, 1998; KAJI et al., 1996; KISHIMOTO et al., 1996)

A exposição do vaso sanguíneo ao metal causa disfunção endotelial, que é definida como desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de fatores relaxantes derivados do endotélio e fatores contráteis derivados do endotélio, e está relacionada com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN) e diminuição da capacidade antioxidante, que é denominado como estresse oxidativo (SILVA; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012).

A avaliação da função endotelial e vascular acontece com o uso de drogas como a fenilefrina (FE), acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (NPS) e uma solução rica em potássio. A FE causa contração do músculo liso vascular (MLV)

quando se liga ao receptor α 1-adrenérgico deste, desencadeando a ativação da proteína Gs, que ativará a fosfolipase C, promovendo a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 gera liberação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático e o DAG aciona a proteína quinase C (PKC), causando aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, fosforilação da cadeia leve da miosina e aumento da mobilização do cálcio por meio de canais da membrana. Todos os eventos citados participam da contração do músculo liso vascular (HOROWITZ et al., 1996).

A contração causada pelo potássio ocorre pela modificação no potencial de membrana celular. A despolarização da membrana, induzida pelo aumento da concentração de K^+ extracelular, propicia o influxo de Ca^{2+} através da abertura de canais para cálcio operados por voltagem, resultando na contração (BULBRING; TOMITA, 1987; GANITKEVICH V; ISEBERG, 1991). Outros trabalhos demonstram que o cloreto de potássio (KCl), atua como um estímulo sensibilizador de cálcio na contração do músculo liso (RATZ et al., 2005).

Quando analisada a resposta vasodilatadora, à ACh se liga nos receptores muscarínicos no endotélio vascular levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio, induzindo a produção de prostaciclina, NO e fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Essas substâncias irão causar hiperpolarização do músculo liso vascular e, conseqüentemente, o relaxamento do vaso sanguíneo (RATTMANN, 2009). Desse modo, a integridade do endotélio vascular é de suma importância para apropriada resposta à ACh. O NPS é um doador de NO para as células musculares lisas, levando à estimulação da guanilato ciclase solúvel nas células do músculo liso vascular. Esses são alguns dos mecanismos pelo qual o NO age sobre o vaso sanguíneo e causa o relaxamento (RATTMANN, 2009).

Com isso, estudos experimentais que encontram disfunção endotelial sugerem que o Cd pode contribuir para o início e progressão da placa de aterosclerose, por causar estresse oxidativo em segmentos isolados de aorta (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013), aumento da permeabilidade endotelial, inibição da proliferação celular e promoção da morte celular (apoptose) (MESSNER et al., 2009; MESSNER; BERNHARD, 2010).

O estudo Abu-Hayyeh et al. (2001) foi o primeiro a demonstrar que além dos rins, fígado e testículo, as artérias também são alvo da deposição do Cd (ABU-

HAYYEH et al., 2001). Apesar das vias de absorção do metal pelas células da parede vascular não serem claras até o momento, já foram descritos vários canais iônicos e transportadores que são capazes de carrear esse íon através da membrana plasmática (GARLANDA; DEJANA, 1997).

Abu-Hayyeh et al. (2001) demonstraram que a maior deposição de Cd nas artérias ocorre na túnica média arterial e que a concentração depositada nessa região da aorta de humanos foi de 7 $\mu\text{mol/L}$. O acúmulo do íon pode prejudicar o metabolismo das células musculares lisas, além de causar a degradação do tecido conjuntivo elástico, aumentando a probabilidade de disfunção e doenças do tecido (ABU-HAYYEH et al., 2001).

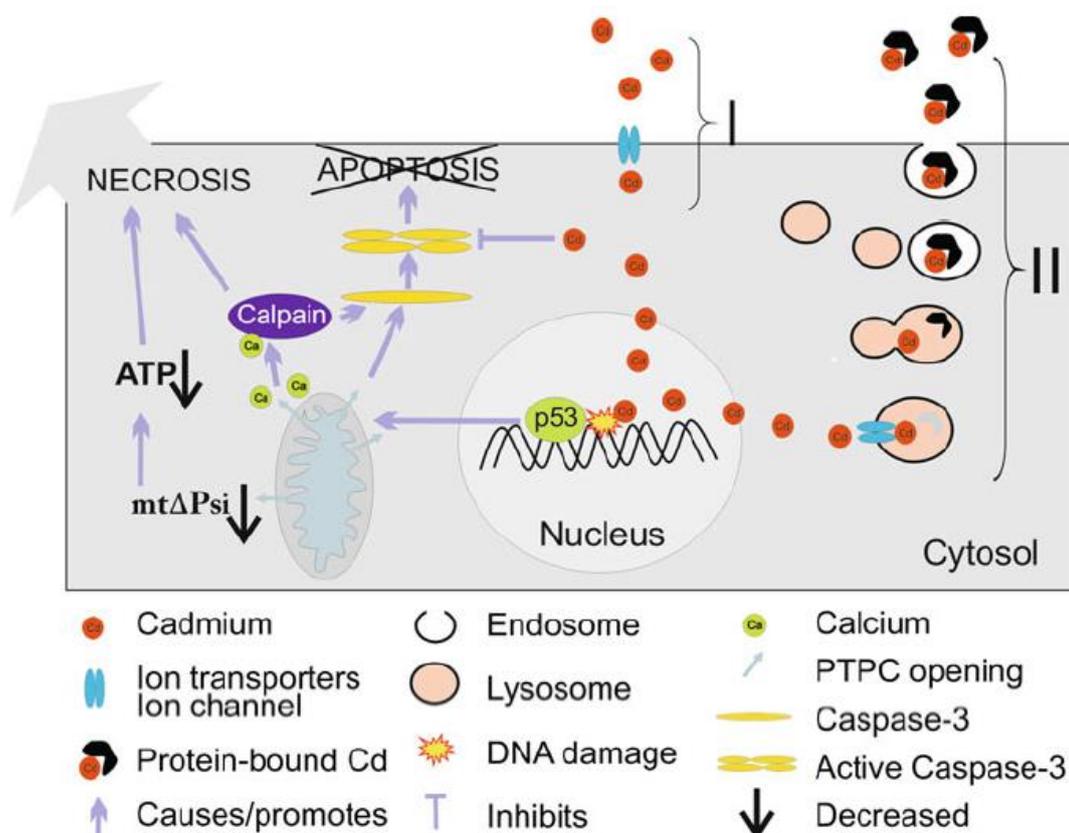
Além da captação direta do Cd pela parede arterial, que ocorre quando o íon se liga a proteínas, o metal também pode ser absorvido pelas células do sistema imune (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos T, linfócitos B, células NK, macrófagos, mastócitos e monócitos) atravessando a parede vascular por meio de infiltração. Os monócitos são exemplos de células do sistema imune que se ligam ao Cd e se depositam nos vasos sanguíneos (Figura 1) (STEFFENSEN et al., 1994).

No decurso da aterosclerose, macrófagos/monócitos se diferenciam em células espumosas, que com sobrecarga de colesterol sofrem processo de necrose, fazendo com que o Cd captado por essa célula seja liberado na parede do vaso sanguíneo. . (MESSNER; BERNHARD, 2010).

Com base nesses conhecimentos, a hipótese que melhor explica como aterosclerose é causada é denominada de “hipótese de resposta à lesão” desenvolvida por Ross et al (ROSS, 1999). Nessa teoria, primeiramente ocorre dano endotelial primário e/ou um prejuízo funcional, para que então se inicie a aterosclerose. (MESSNER et al., 2009; PROZIALECK; EDWARDS; WOODS, 2006; SACERDOTE; CAVICCHIA, 1983).

A exposição ao Cd é um fator capaz de reduzir a funcionalidade da barreira endotelial, pela interrupção das junções celulares no endotélio vascular, e com isso ocasiona a morte das células endoteliais (MESSNER et al., 2009; PROZIALECK; EDWARDS; WOODS, 2006; SACERDOTE; CAVICCHIA, 1983).

Figura 1: Células endoteliais em processo de necrose induzido pelo Cd.



Um modelo hipotético para a indução da morte de células endoteliais necróticas pelo metal. O Cd é absorvido pelas células endoteliais através de transportadores de cátions e canais iônicos, à exemplo do transportador de metal divalente 1 (DMT-1) (I), ou ligado a proteínas e transportado para o citoplasma celular por endocitose (II). Os íons do metal se difundem para o núcleo e podem causar danos ao DNA de forma direta (causando modificação oxidativa de bases) ou indireta (inibindo a maquinaria de reparo de DNA), o que ativa uma resposta de danos ao DNA. Como resultado desta resposta mediada pela p53, sinalização da morte celular é enviada para as mitocôndrias (candidatos potenciais são membros da família bcl2 pró-apoptóticos). Devido à abertura do complexo de apoptosoma, a caspase-9 é ativada, o que, por sua vez, ativa a caspase-3. Por processos ainda desconhecidos o Cd inibe a atividade da caspase e como resultado da diminuição do potencial mitocondrial, devido à abertura da CPTP, a geração de adenosina trifosfato (ATP) é reduzida, resultando em perda de função das bombas de íons. O conseqüente influxo de água leva à ruptura das organelas e da membrana plasmática. A execução da morte celular também pode ser induzida pela calpaína que é ativada pelos íons Ca^{2+} liberados pelas mitocôndrias na abertura do CPTP. O resultado é um fenótipo necrótico de morte celular induzido pelo Cd. (Figura retirada de Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance, 2010 Autor: Messner e Bernhard)

O Cd inibe a reparação da lesão endotelial, o que faz com que a morte dessas células não ocorra de forma fisiológica, com isso o endotélio fica com as células mais espaçadas e permeáveis a componentes presente no sangue (MESSNER et al., 2009; WOODS; J.M., LEONE; M., KLOSOWSKA; K., LAMAR; P.C., SHAKNOVSKY; T.J., 2009).

Com base na “hipótese de resposta à lesão”, a injúria é acompanhada por aumento, por um menor controle, da permeabilidade e da infiltração no endotélio pelas células do sistema imune, facilitando o transporte e acúmulo de lipídeos na parede vascular. Estudos experimentais demonstraram acúmulo de lipídeos em coração e em vaso sanguíneos de animais expostos ao Cd (MESSNER et al., 2009; SUBRAMANYAM; BHASKAR; GOVINDAPPA, 1992)

Outra consequência do dano endotelial induzido metal, é que a matriz extracelular e as células abaixo da camada endotelial, isto é, células musculares lisas e fibroblastos, ficam expostas a fatores da corrente sanguínea. Isso pode estimular a atividade pró trombótica da matriz extracelular contribuindo para a formação de trombos. Além disso, a morte necrótica das células endoteliais e de outros tipos de células da parede vascular, leva ao desprendimento das células remanescentes da parede vascular. Esse processo causa estresse celular, que resulta na secreção de citocinas formando um ciclo vicioso de dano, estresse e inflamação (MESSNER; BERNHARD, 2010).

Outros fenômenos que foram observados em resposta a exposição ao Cd que podem iniciar e promover aterosclerose foram: a HAS (ALMENARA et al., 2013; EUM; LEE; PAEK, 2008; NAKAGAWA; NISHIJO, 1996; TELLEZ-PLAZA et al., 2013; TOMERA et al., 1994) e as modificações no perfil lipídico (SARKAR et al., 1995). Esses fatores são alguns dos pré-requisitos para a formação das células espumosas e a promoção da morte celular, fazendo com que aumente a deposição de lipídeos em muitos órgãos do organismo (SUBRAMANYAM; BHASKAR; GOVINDAPPA, 1992) incluindo a parede arterial (MESSNER et al., 2009).

As alterações celulares causadas pelo metal fazem com que ocorra liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 6 e fator de necrose tumoral α , pelas células endoteliais vasculares, facilitando o processo aterosclerótico (DONG et al., 2014; SZUSTER-CIESIELSKA; LOKAJ; KANDEFER-SZERSZEŃ, 2000).

Além da relação do cádmio com a liberação de citocinas inflamatórias, esse metal, como já mencionado, induz estresse oxidativo. Yoo et al. mostraram que a exposição crônica ao cloreto de cádmio (CdCl_2) (10 e 50 ppm) reduziu a resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh) e não alterou a resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS), sugerindo que o prejuízo da função endotelial causado pelo metal está associado ao estresse oxidativo. Nesse estudo também analisaram que o Cd foi capaz

de aumentar a pressão arterial sistólica de 20-30% após 3 meses de exposição ao metal (YOOPAN et al., 2008).

O mecanismo específico responsável pela hipertensão causada pelo metal não é explicado, porém muitas propostas têm sido expostas como aumento da retenção de Na^+ (PERRY HM JR, 1981), interação com os canais de Ca^{2+} (BALARAMAN R, GULATI OD, BHATT JD, RATHOD SP, 1989), ativação do sistema nervoso simpático (FADLOUN, Z; LEACH, 1979) e redução da concentração de substâncias vasodilatadoras (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; SKOCZYNSKA, A; MARTYNOWICZ, 2005).

O Cd também possui efeitos diretos no músculo liso vascular. Por ser considerado um antagonista dos canais de Ca^{2+} , reduzindo a contração muscular lisa e prejudicando o relaxamento vascular (LAWSON; CHATELAIN, 1992; NIWA; SUZUKI, 1982). Além disso, pode causar lesão endotelial pela disfunção nos receptores colinérgicos do tipo M1, envolvidos na liberação de prostanóides e NO (BILGEN et al., 2003).

1.5 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que atinge principalmente a camada íntima de grandes e médias artérias e possui origem multifatorial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001). As lesões pela aterosclerose podem causar isquemia cardíaca, cerebral, ou em extremidades, resultando em infartos. Segundo o DATASUS, em 2011 ocorreram 335.213 mortes no Brasil por doenças cardiovasculares e a Sociedade Brasileira de Cardiologia estima que em 2016 349.938 brasileiros tenham ido a óbito devido DCV (DATASUS e SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011).

Por muitos anos acreditou-se que a aterosclerose era apenas uma doença onde ocorria a deposição de lipídeos na parede vascular. Através de novos estudos foi visto que não se resumia apenas deposição do colesterol, e que em paralelo ocorre inflamação crônica arterial (WICK et al., 2014).

Inicialmente as placas de aterosclerose se formam em regiões com bifurcações e nos arcos arteriais. Nesses locais o fluxo sanguíneo é turbulento, aumentando o

cisalhamento entre o sangue e o endotélio vascular. Essas condições podem influenciar a sinalização celular e a expressão gênica nas células endoteliais, criando um estado próinflamatório, recrutando monócitos, linfócitos e causando o acúmulo de células dendríticas na parede vascular (WICK et al., 2014).

A aterosclerose é iniciada em animais e humanos pela infiltração de células T na camada íntima das ramificações, curvaturas e bifurcações das artérias (KLEINDIENST et al., 1993; MILLONIG; MALCOM; WICK, 2002). A infiltração precede a deposição de lipídeos, a migração de macrófagos e das células musculares lisas vasculares, e ocorre quando as células endoteliais são estimuladas por fatores de risco clássicos da aterosclerose (como HAS, diabetes mellitus, tabagismo, elevados níveis de lipídeos e infecção crônica) (WICK et al., 2014).

A lesão também provoca disfunção endotelial, causando respostas compensatórias e alterando as propriedades homeostáticas do endotélio. Além disso, também induz a liberação de substâncias pro-coagulantes pelo endotélio, ao invés de anticoagulantes. Se a resposta inflamatória não for neutralizada, os agentes inflamatórios continuam a agir (GRUNDTMAN; WICK, 2011).

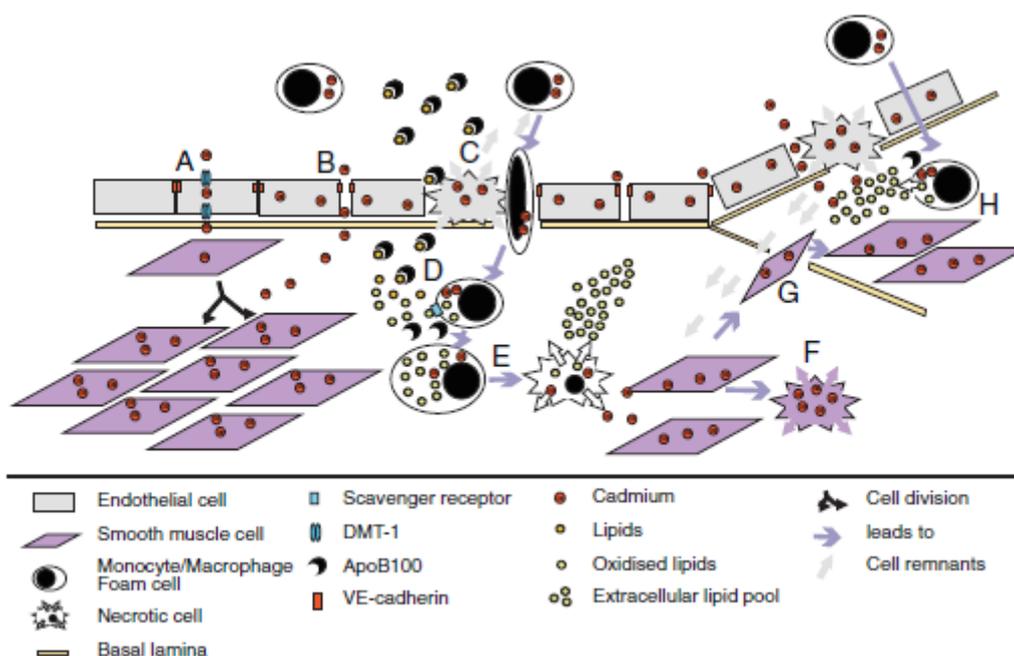
A continuação da inflamação resulta em aumento do número de macrófagos e linfócitos, que migram do sangue e se multiplicam na área lesionada. A ativação dessas células libera enzimas hidrolíticas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (KREUTMAYER et al., 2011; XU et al., 2000), que podem conduzir as possíveis lesões, podendo causar necrose (MESSNER; BERNHARD, 2010).

O LDL, que pode ser oxidado, a glicação (em diabetes), a agregação plaquetária, a associação com proteoglicanos, ou incorporação de células autoimunes, são as maiores causas de lesões no endotélio e no músculo liso vascular (JONGSTRA-BILEN et al., 2006; LIU et al., 2008; MILLONIG et al., 2001).

Quando as partículas de LDL se fixam na parede arterial, elas podem sofrer oxidação progressiva e ser internalizadas por macrófagos, por meio de receptores de eliminação nas superfícies celulares (CYBULSKY; JONGSTRA-BILEN, 2010; JONGSTRA-BILEN et al., 2006; LIU et al., 2008; MILLONIG et al., 2001; MULLICK et al., 2008). A internalização conduz à formação de lipídeos peroxidados que facilitam o acúmulo de ésteres de colesterol, resultando na formação de células espumosas (CHOI et al., 2009; JONGSTRA-BILEN et al., 2006; LIU et al., 2008).

Outro fator de risco é a HAS, que também possui atividade inflamatória, aumentando a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de radicais livres, como ânion superóxido e radicais hidroxila no plasma (GRIENGLING; ALEXANDER, 1997; LACY; O'CONNOR; SCHMID-SCHÖNBEIN, 1998; SWEI et al., 1997). Essas substâncias reduzem a biodisponibilidade de NO nos vasos sanguíneos, (VANHOUTTE; BOULANGER, 1995) aumentando a adesão de leucócitos (SWEI et al., 1997), e a resistência periférica.

Figura 2: Cádmio induzindo mudanças pró-aterogênicas na parede vascular.



Um esquema hipotético de como o metal pode induzir e promover aterosclerose na parede arterial. (A) Absorção do Cd pelas células endoteliais, com o transporte para o espaço subendotelial. O metal é absorvido pelas células musculares lisas, iniciando a proliferação e causando espessamento da camada média do vaso sanguíneo. (B) O íon interrompe as ligações entre as caderinas no endotélio vascular, facilitando a difusão do metal, de lipídios e células do sistema imunológico com acesso à camada média do vaso sanguíneo. (C) De forma similar, a morte celular causada pelo Cd permite o acesso de lipídios e das células do sistema imune (por exemplo, monócitos). Além disso, as células endoteliais em estado necrótico liberam constituintes intracelulares, que atraem células do sistema imunológico para a parede do vaso, causando inflamação e, assim, contribuem para (D) o estresse oxidativo e oxidação lipídica na parede arterial. Os lipídios oxidados são absorvidos pelos macrófagos de forma desordenada. A absorção contínua de lipídios pelo macrófagos, que se diferenciam em células espumosas, e como resposta ao estresse começam a secretar citocinas quimiotáticas que promovem a proliferação celular. (E) O acúmulo de lipídios nas células espumosas levam à morte por necrose, causando a liberação dos lipídios intracelulares e gerando acumulação de lipídios no meio extracelular. O conjunto de lipídios extracelulares e as células espumosas necróticas aumentam o estado pró-inflamatório na artéria. (F) O Cd causa a morte de células musculares lisas, fazendo com que elas possam também absorver os lipídios e se diferenciam em células espumosas, contribuindo para concentração de lipídios livres e inflamação. (G) Ativadas pelas citocinas e pelas células remanescentes, as células musculares lisas começam a migrar para o espaço subendotelial, causando a fusão da camada média e íntima. (H) A fusão das camadas média e íntima dos vasos causa

acúmulo de células musculares lisas, invasão de macrófagos, morte celular das células endoteliais, células musculares lisas e células espumosas, promovendo a inflamação, e iniciando o processo de remodelamento do tecido, incluindo deposição de matriz extracelular e concentração de lipídios. Então o processo de formação da placa aterosclerótica e progressão da doença é iniciado. (Figura retirada de Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance, 2010. Autor: Messner e Bernhard.)

1.6 MODELO EXPERIMENTAL CAMUNDONGO APOE KNOCKOUT (APOE^{-/-})

Aterosclerose é a maior causa de morte na sociedade ocidental, resultado de uma interação complexa do estilo de vida dessa sociedade e de fatores genéticos (CHANNON; GUZIK, 2002; IGNARRO, 2002; WALSKI et al., 2002).

Ratos não são modelos adequados para o estudo da aterosclerose, visto que não desenvolvem lesões ateroscleróticas de forma espontânea, requerendo modificações importantes em sua dieta para provocar lesões vasculares (DROBNIK et al., 2000).

Camundongos são altamente resistentes a aterosclerose, a única exceção é a espécie C57BL/6. Os camundongos C57BL/6 quando alimentados com uma dieta rica em colesterol e contendo ácido cólico, podem desenvolver aterosclerose, porém essas lesões vasculares diferem das lesões em humanos, e são atribuídas ao estado inflamatório crônico ao invés da predisposição genética (JAWIEN; NASTALEK; KORBUT, 2004).

Em 1960 no laboratório de Wissler foi desenvolvido o primeiro modelo de aterosclerose induzido por dieta. A alimentação dos animais era composta por 30% gordura, 5% colesterol, e 2% ácido cólico causando aterosclerose em camundongos C57BL/6, mas não foi um modelo de sucesso visto que muitos faleceram por ser uma dieta tóxica e apresentarem doenças respiratórias (PAIGEN et al., 1985). Paigen *et al.* aprimoraram essa dieta, produzindo a “Dieta de Paigen” que consiste em 15% de gordura, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico. Embora fosse utilizada para o estudo de aterosclerose em modelo experimental apresentava algumas desvantagens e não se assemelha ao processo de aterosclerótico que ocorre em humanos (PAIGEN et al., 1985).

Com o objetivo de criar melhores modelos animais para distúrbios de lipoproteínas, aterosclerose e identificar genes que possam modificar a aterogênese e a progressão da lesão, em 1992 foram desenvolvidos os camundongos knockout

ApoE (ApoE^{-/-}). Foram gerados pela inativação do gene ApoE por segmentação (PIEDRAHITA et al., 1992). Realizou-se a inativação do gene ApoE em células tronco embrionárias de camundongos pela inserção de dois plasmídeos contendo o gene resistente à neomicina que substitui parte do gene ApoE. Esses plasmídeos foram inseridos em blastômeros de camundongos C57BL/6, gerando filhotes homocigoto e heterocigoto, que através do cruzamentos entre os animais homocigotos foi originado o camundongo ApoE^{-/-} que apresenta níveis de VLDL aumentados no plasma (HOFKER; VAN VLIJMEN; HAVEKES, 1998; PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992).

Análise cronológica da aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-}, mostrou que os eventos sequenciais envolvidos na formação de lesões neste modelo, são semelhantes aos de modelos animais bem estabelecidos de aterosclerose, como os modelos de hipercolesterolemia e deficiência da lipoproteína A (NAKASHIMA et al., 1994).

O desenvolvimento da aterosclerose além de envolver a ativação da sinalização pró-inflamatória, que abrange a expressão de citocinas e quimiocina, promove aumento do estresse oxidativo. As EROs desempenham papel importante nas respostas inflamatórias, na apoptose, no crescimento celular e na alteração do tônus vascular, bem como na oxidação do LDL, o que é considerado mais importante que o LDL não oxidado na aterogênese (PELUSO et al., 2012).

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo ocorre com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e/ou redução ou inatividade do sistema anti-oxidante (PELUSO et al., 2012).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são uma variedade de moléculas reativas derivadas do oxigênio que podem ser radicais livres como ânion superóxido (O₂⁻), ou radical hidroxila (HO) ou não radicais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Por outro lado, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são classificadas como íons (peroxinitrito (ONOO⁻)) ou não-íons (óxido nítrico (NO)). (BOLISSETTY; JAIMES, 2013).

Essas moléculas são formadas em baixos níveis durante a realização de funções fisiológicas. Dentre as espécies reativas, o radical hidroxila é a espécie mais

conhecida, sendo responsável pela maioria dos efeitos citotóxicos das EROs. Já o H_2O_2 é uma espécie menos reativa, possuindo papel importante em várias atividades celulares (BOLISETTY; JAIMES, 2013). Entretanto agentes exógenos, como poluição e o tabagismo, ou por fontes endógenas, como as respostas inflamatórias de leucócitos que envolvem NADPH-oxidase, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ativação de mieloperoxidase podem causar desequilíbrio nesse sistema aumentando a produção das EROs. Esse aumento pode causar danos oxidativos a macromoléculas tais como, DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas (DEL RIO; SERAFINI; PELLEGRINI, 2002; SERAFINI; DEL RIO, 2004).

McCord (1974), demonstrou que a formação do radical $O_2^{2\cdot-}$ ocorre pela enzima xantina oxidase. Após esses primeiros achados, este autor demonstrou que as EROs são responsáveis por causar danos oxidativos e que algumas enzimas anti-oxidantes podem proteger o organismo desses agentes lesivos (McCORD, 1974). Outros sistemas enzimáticos responsáveis pela geração das EROs são; cicloxigenases, lipoxigenases, citocromo P450 e aminoácidos oxidados (CLINE; LEHRER, 1969; JI, 2007; KIM; KIM; KIM, 2008; NISHINO, 1994; NISHINO et al., 2008; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005; ZANGAR; DAVYDOV; VERMA, 2004).

Uma fonte importante de produção de ânion superóxido e de H_2O_2 é quando ocorre o desacoplamento da eNOS pela depleção do BH_4 ou da L-arginina. Nessa condição a eNOS passa a gerar ânion superóxido ao invés de NO. Os mecanismos pelos quais ocorrem o desacoplamento da eNOS ainda não foram totalmente elucidados, mas acredita-se que o peroxinitrito pode oxidar o BH_4 causando o desacoplamento da eNOS (CAI; HARRISON, 2000). Em 2000 Heitzer et al. (2000), demonstraram que a infusão intra-arterial de BH_4 melhorou a vasodilatação dependente do endotélio em tabagistas crônicos, sugerindo que o esgotamento do BH_4 pode ter impacto na produção de NO pela eNOS (HEITZER et al., 2000).

A exposição ao Cd está associada ao aumento do estresse oxidativo. O estudo realizado por Angeli et al. (2013) demonstrou aumento da produção de EROs produzidas pela NADPHoxidase em segmentos de aorta com expostos a $10 \mu M$ de $CdCl_2$ *in vitro* (ANGELI et al., 2013).

Já os estudos de Almenara et al (2013), Sompamit et al. (2010) e Donpunha et al. (2011) evidenciaram que a exposição crônica ao $CdCl_2$ aumentou a produção das

EROs em artérias de roedores (ALMENARA et al., 2013; DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A exposição ao cádmio, é associado ao desenvolvimento de doenças cardíacas como o aumento do estresse oxidativo, disfunção endotelial (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013), hipertensão arterial sistólica (DA CUNHA MARTINS et al., 2018) e aumento da placa de aterosclerose (KNOFLACH et al., 2011; TINKOV et al., 2018). Apesar de haver muitos estudos sobre os efeitos da exposição ao cádmio no sistema cardiovascular, nenhum estudo abordou se o metal pode acelerar a deposição na placa aterosclerótica. Com isso, estudos utilizando modelos animais ateroscleróticos, são importantes para elucidar como a exposição ao cádmio pode acelerar a deposição de placa aterosclerótica. Embora a literatura demonstre o aumento da placa aterosclerótica em camundongos ApoE^{-/-} (KNOFLACH et al., 2011) nenhum estudo expôs esses animais ao cádmio antes do início da deposição da placa. Além disso, esses trabalhos (KNOFLACH et al., 2011; MESSNER et al., 2009) utilizaram dietas hiperlipídicas para induzir precocemente a deposição da placa em camundongos ApoE^{-/-} expostos ao cádmio.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito da exposição ao cádmio por 30 dias sobre a função vascular e o desenvolvimento e progressão da placa aterosclerótica em animais ApoE^{-/-}.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir, em camundongos ApoE^{-/-} expostos ou não cádmio (100 mg/l) via água de beber durante 28 dias:

- o ganho ponderal e consumo de ração;
- os níveis de colesterol séricos;
- a reatividade vascular à fenilefrina em segmentos de aorta isolados de camundongos;
- o relaxamento dependente e independente do endotélio em segmentos de aorta isolados;
- a participação do óxido nítrico na resposta vasodilatadora em segmentos de aorta isolados;
- lesões ateromatosas no arco aórtico, por meio de histologia;
- a produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico em células hematopoiéticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Nesse estudo foram utilizados camundongos ApoE Knockout (ApoE^{-/-}) e C57BL/6, machos, com 14 semanas de idade, pesando aproximadamente 31 g, cedidos pelo biotério do laboratório de Fisiologia Translacional do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Durante o tratamento, os animais tiveram acesso livre a ração para roedores e água, e permaneceram em gaiolas com 2 a 4 animais, sob condições controladas de ciclo claro-escuro de 12-12h e temperatura de 23°C.

A utilização e os cuidados com os animais 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 pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES- CEUA 71/2016).

4.2 MODELO EXPERIMENTAL

Os camundongos ApoE^{-/-} foram divididos em dois grupos de tratamento, ApoE^{-/-} controle (ApoE^{-/-} Ct) e ApoE^{-/-} Cádmio (ApoE^{-/-} Cd). Aos animais ApoE^{-/-} Ct foi disponibilizada água destilada e aos animais do grupo ApoE^{-/-} Cd foi disponibilizada solução de 100 mg/L cloreto de cádmio em água destilada como único líquido durante 28 dias. Os camundongos C57BL/6 foram tratados apenas com água destilada. O uso de água destilada é necessária, para minimizar que outros íons possam interferir nos resultados (ALMENARA et al., 2013). Cada grupo permanecia em gaiolas independentes.

Estudos prévios demonstraram que camundongos ApoE^{-/-} KO, desde que não receba dieta hipercolesterolêmica, não apresentam disfunção vascular em aorta, serão utilizados camundongos C57BL/6 apenas para confirmação destes achados (MEYRELLES et al., 2011).

4.3 PESO DOS ANIMAIS

Todos os animais expostos ou não ao cádmio, foram pesados antes de iniciar o tratamento e ao final dos 28 dias de exposição. Após 28 dias, os animais foram anestesiados para realização da dissecação da aorta, coleta do sangue e das células hematopoiéticas.

4.4 DOSAGEM DO COLESTEROL

Após os animais serem anestesiados com ketamina e xilazina (91 e 9,1 mg/kg, intraperitoneal), e testados os reflexos para confirmação da sedação, foi feita anti-sepsia com álcool 70% seguida de uma incisão abdominal e retirado aproximadamente 400 microlitros de sangue da veia cava abdominal. Esse sangue foi posto em um eppendorf e centrifugado por 10 minutos a 6000 rpm e 4° C. O soro foi então coletado em um segundo eppendorf, que foi armazenado a -20°C para dosagem do colesterol posteriormente. O colesterol plasmático foi determinado usando um kit colorimétrico comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil).

4.5 OBTENÇÃO DOS ANÉIS DE AORTA TORÁCICA

Após a coleta do sangue a aorta torácica descendente foi cuidadosamente extraída e imersa rapidamente em um Becker de vidro contendo solução gelada de Krebs-Henseleit, composta por (em mM): NaCl 115, NaHCO₃ 25, KCl 4,7, MgSO₄.7H₂O 1,2, CaCl₂.2H₂O 2,5, KH₂PO₄ 1,2, glicose 11,1 e Na₂EDTA 0,01).

Ao microscópio óptico foi realizada a remoção dos tecidos conectivo e adiposo, o arco aórtico foi cortado, e a aorta torácica descendente foi dividida em quatro segmentos com aproximadamente 2 mm de comprimento. Após o preenchimento da cuba do miógrafo (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) com solução de Krebs-Henseleit, os anéis foram colocados na cuba e passados dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) pelo lúmen vascular. Um dos dois fios foi conectado ao micromanipulador que permitia o estiramento do vaso e o outro fio é conectado ao transdutor de força isométrica. O miógrafo é conectado a um

sistema para aquisição de dados (Figura 3) (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e ao computador.

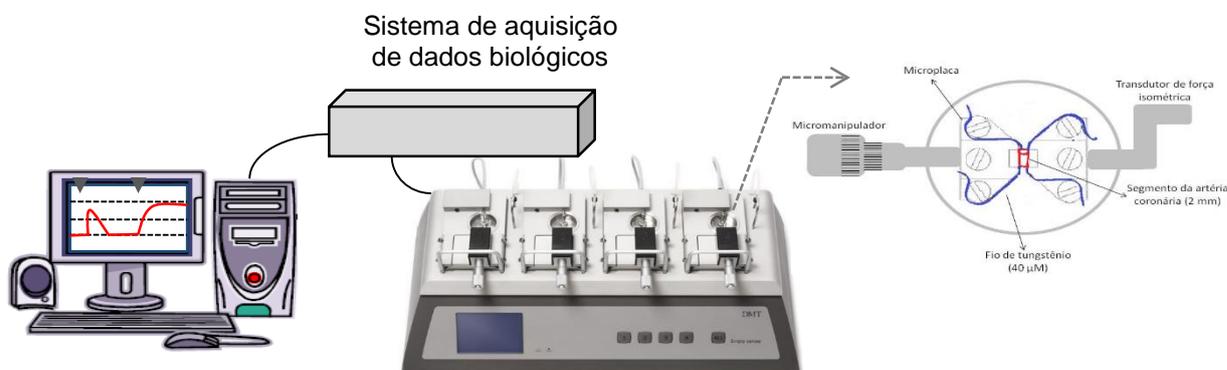


Figura 3: Esquema representativo do miógrafo de arame para análise da reatividade vascular, gaseificado com mistura carbogênica, ligado a um sistema de aquisição de dados biológicos e a um computador, para registro.

Após 10 minutos de estabilização com solução de Krebs Henseleit gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂, pH 7,4, 37° C), as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão:diâmetro interno foi calculada e então foi determinada a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L100). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L1, calculada como $L1 = 0,90 \times L100$, circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo (MULVANY; HALPERN, 1977).

4.6 REATIVIDADE VASCULAR

4.6.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular

Após o período de 15 minutos de estabilização em solução de Krebs-Henseleit, a solução foi trocada por uma solução rica em potássio, com concentração de 120 mM, para avaliar a atividade contrátil máxima do músculo liso através da despolarização. Os anéis ficaram banhados pela solução de potássio por 30 minutos, tempo essencial para que a resposta contrátil do vaso se estabilize e alcance o platô.

Após esse período os anéis foram lavados três vezes com solução Krebs-Henseleit para que atingissem a tensão basal.

4.6.2 Avaliação da integridade do endotélio

A avaliação da função endotelial ocorreu após 15 minutos da retirada da solução rica em potássio. A função endotelial foi avaliada através da adição de fenilefrina (FE) 10^{-7} M, para contração do segmento vascular e após atingir o platô foi adicionada na cuba 10^{-5} M de acetilcolina, uma droga agonista dos receptores muscarínicos, que estimula o endotélio a produzir NO e promove o relaxamento do vaso. Ao final do teste a solução da cuba foi trocada três vezes. Os segmentos de aorta que não relaxaram 70% ou mais à ACh foram descartados dos demais protocolos.

4.6.3 Protocolos experimentais

4.6.3.1 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio por 28 dias sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Após o teste do endotélio e a troca da solução por três vezes, para que a tensão voltasse para o basal, foi esperado mais 30 minutos de incubação com fármacos descritos mais adiante.

Em seguida foi realizada a curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos três grupos estudados (ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd e C57 Ct) após contração estável induzida por FE 10^{-7} M. A curva de ACh foi realizada obedecendo uma média de 2 minutos entre cada dose.

4.6.3.2 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio por 28 dias sobre a resposta vasoconstritora à FE

Ao final da curva de ACh as cubas foram lavadas três vezes para que os segmentos de aorta voltassem à tensão basal, e esperado 10 minutos para que o segmento estabilizasse e então mais 30 minutos de incubação com fármacos.

A realização da curva concentração-resposta à FE foi iniciada após o período de incubação com fármaco, iniciando com a dose de 10^{-10} M de FE até 3×10^{-4} M, com diferença de um minuto e trinta segundos entre cada dose cumulativa.

4.6.3.3 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio por 28 dias sobre a resposta vasodilatadora independente do endotélio

Ao final da curva concentração-resposta à FE foram esperados 15 minutos para que os segmentos de aorta alcançassem o platô de contração e a seguir foi iniciada a curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) de 10^{-10} à $3 \cdot 10^{-5}$ M, Com intervalo de 2 minutos entre cada dose.

4.6.3.4 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio por 28 dias sobre os fatores endoteliais

Após o teste do endotélio alguns segmentos foram incubados com o inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase, *N^o-nitro-L-arginina metil ester* (L-NAME, 100 μ M). A incubação ocorreu duas vezes em momentos distintos nos segmentos de aorta. No primeiro momento foi incubado para realização da curva concentração-resposta à ACh e posteriormente na curva concentração-resposta à FE.

4.7 ANÁLISE DA ATEROSCLEROSE

4.7.1 Preparação da amostra e da lâmina

Após a remoção dos tecidos do tecido adiposo e conectivo, o arco aórtico foi armazenado em Phosphazene base P4-t-Oct (OCT) e levado ao freezer -80°C . No dia da análise, foram descongelados e com um bisturi foram realizadas secções transversas no arco inferiormente ao tronco braquiocefálico direito e superior a carótida comum esquerda, de forma que a análise ocorresse nas regiões entre as ramificações da aorta. Os arcos aórticos foram então emblocados em gelatina incolor (Dr. Oetker, Brasil) a 24% e posteriormente congelados.

O bloco de gelatina contendo o arco aórtico foi posicionado para que se obtivessem cortes transversos com 8 µm de espessura em um criostato Jung CM 1800 – Leica) a -30° C, iniciando-se os cortes pelo tronco braquiocefálico direito. Os cortes foram posicionados em uma lâmina de vidro gelatinizada, onde cada possuía em média 10 cortes do mesmo segmento de aorta.

Antes da utilização, as lâminas de vidro foram lavadas em água corrente e detergente. Foram incubadas com solução sulfocrômica por 12 horas, quando foram novamente lavadas por três vezes e deixadas em estufa para secagem. Após a secagem das lâminas, estas foram encobertas por 5 minutos com uma solução de gelatinização (500 mL de água destilada, 5 g de gelatina incolor e 0,5 g de sulfato de cromo potássio/ $KCr(SO_4)_2$), incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para que a gelatina secasse e ocorrer a fixação dos cortes na lâmina.

Foram analisadas quatro lâminas de cada animal. Após a fixação das secções, foi feita a coloração com *Oil Red-O* (Sigma-Aldrich) para detecção de lipídios neutros. A solução de estoque foi preparada contendo 300 mg de *Oil Red-O* em 100 mL de isopropanol (Reagentes Analíticos, Dinâmica), e a solução para corar contendo 24 mL de *Oil Red-O* do estoque e 16 mL de água destilada misturados por 10 minutos, centrifugados e filtrados. As lâminas contendo os cortes foram posicionadas a uma altura de cerca de 2 mm da superfície de um recipiente onde foi adicionado o corante e fechado para evitar a evaporação do solvente, de forma a se criar então uma interface líquida (solução de *Oil Red-O*) entre o vidro da lâmina e do recipiente. Este posicionamento permite que precipitados cristalinos formados se depositem no fundo do recipiente, e não na lâmina. Os cortes ficaram em contato com o corante por 10 minutos, sendo então lavados com água corrente por mais cerca de 5 minutos. Por fim, foi colocada uma gota de água destilada em cima de cada corte e uma lamínula de vidro recobriu a lâmina. Com objetivo de impedir a secagem da lâmina, a borda entre a mesma e a lamínula foi selada com esmalte incolor.

4.7.2 Análise morfológica

Com uso de um microscópio trinocular (Olympus AX70) acoplado a uma câmera digital (VK-C150, Hitachi, Japão) fez-se a captura de imagens das lâminas, e estas foram analisadas em programas de imagem específicos (Leica EWS 2100 e

Image J). Esses procedimentos foram efetuados no Departamento de Morfologia do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, no Laboratório de Ultraestrutura Celular. As imagens foram capturadas com lente objetiva com aumento de 4X. A quantificação da área corada pelo *Oil Red-O* foi analisada através do software Image J. Foi considerada a deposição de lipídios tanto na parede vascular, como também na camada média e íntima, e os resultados foram expressos em μm^2 . A análise das lâminas foi realizada de forma “cega”, uma vez que o pesquisador que analisou as imagens numeradas desconhecia a que grupo experimental pertencia cada uma.

4.8 COLETA DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

Após a coleta do fêmur e armazenamento em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma), o tecido ósseo foi levado para capela de fluxo laminar para ser realizado o isolamento das células da medula óssea. Previamente, foi realizada a assepsia, os fêmures e as tíbias dos animais foram coletados e dissecado o músculo e tecido conjuntivo. As epífises foram cortadas para exposição do canal medular. Uma agulha de 26-gauge acoplada a uma seringa plástica de 1 mL foi inserida na cavidade medular para retirada da medula óssea através de “flush” de meio de cultura DMEM. A suspensão de medula óssea foi homogeneizada e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos (Eppendorf: Centrifuge 5702). O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas com 2 ml de solução de lise de hemácias (BD Pharm Lyse, # 555899). Em seguida, os tubos foram vortexados e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos para rompimento de hemácias. As amostras voltaram a ser centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. Em seguida, o pellet foi ressuspensado em 2 mL de PBS acrescido de 1% de FBS inativado (PBS-iFBS) para lavar o excesso de solução de lise. As amostras foram novamente centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Esse processo foi repetido uma vez para assegurar a lise das hemácias da amostra.

Por fim, o sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS-iFBS e mantidas a 4°C até a marcação para análise por citometria de fluxo. Uma alíquota foi separada para contagem em câmara de Neubauer.

4.8.1 Quantificação e viabilidade das células hematopoiéticas

Para determinar o número de células obtidas foi realizada uma diluição de 1:10 (v/v) de medula óssea em PBS. Então uma alíquota desta solução foi diluída 1:2 (v/v) em solução de Turck (ácido acético 2% com azul de metileno) para eliminar resíduos da amostra, e uma alíquota desta última solução foi novamente diluída 1:2 (v/v) em solução de azul de Tripano 0,4% para quantificação das células viáveis. Estas soluções foram homogeneizadas e injetadas em câmara de Neubauer para contagem com auxílio do microscópio óptico (Nikon Tsi) com aumento de 40X. As células são contadas nos quatro quadrantes externos da câmara seguindo sempre a mesma direção, e em formato de “L”, prevenindo que a mesma célula seja contada duas vezes. A equação utilizada para determinar o número de células por milímetro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times 1 \text{ ml} \times \text{número de células}/4, \text{ sendo:}$$

FD: fator de diluição (40);

10^4 : fator de correção da câmara de Neubauer;

1mL: volume da amostra;

Número de células/4: média do número de células contadas.

Este protocolo foi realizado com objetivo de utilizar sempre 10^7 células nas marcações analisadas na citometria de fluxo.

4.8.2 Determinação dos níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio e de NO por citometria de fluxo

A análise do NO e das EROs tiveram como objetivo analisar se células do sistema imune e células progenitoras endoteliais podem estar sofrendo ação do estresse oxidativo causado pelo Cd. Como são necessários realizar vários bloqueios para a análise das células progenitoras endoteliais, então utilizamos as hematopoiéticas e sugerimos que células do sistema imune e progenitoras endoteliais estão sofrendo ações como a senescência e apoptose pelo estresse oxidativo.

Os níveis citoplasmáticos das EROs (ânions superóxido, H_2O_2 , peroxinitrito/hidroxila) e de NO foram analisados nas células hematopoiéticas (CH)

utilizando o citômetro de fluxo, através da mediada de intensidade de fluorescência emitida pelos marcadores dihidroetídeo (DHE), 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), hidroxifenilfluoresceína (HPF) e 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato (DAF), respectivamente.

O citômetro de fluxo é um sistema capaz de mensurar múltiplas características físicas, tais como tamanho e granulosidade. As células passam de maneira ordenada por um sistema fluído e são interceptadas por um feixe de luz e a emissão da fluorescência é captada pelo aparelho. Suas principais funções, estão relacionadas à farmacologia, microbiologia, biologia molecular e genética (ADAN et al., 2017).

O princípio básico da citometria de fluxo é fazer as células que estão em suspensão passar de forma ordenada por um feixe de luz com comprimento de onda constante, normalmente um laser, que, ao capturar as células, geram sinais que são percebidos e transformados por detectores apropriados. Os sinais produzidos são equivalentes ao tamanho, complexidade interna e intensidade de fluorescência da célula em análise.

Os níveis de ânion superóxido foram medidos através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do DHE ou hidroetidina. O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, penetra livremente na célula e reage rapidamente com o ânion superóxido $\cdot O_2^-$ formando etídeo. Quando o DHE é oxidado à etídeo e se liga ao DNA, causa à amplificação da fluorescência vermelha. Já a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi estimada através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é um produto da oxidação do DCFH-DA um éster, não fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula sofre ação de ésteres, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo H_2O_2 formando um composto fluorescente DCF, que, por ser apolar, fica aprisionado no interior da célula (CAMPAGNARO et al., 2013; TONINI et al., 2013).

As CH foi ressuspendidas em 1 mL de PBS na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas, no escuro, com DHE (160 μM) e DCF-DA (20 mM), por 30 minutos à 37°C. Para controle positivo, as amostras foram incubadas por 5 minutos com 10 μM doxorubicina ou 50 mM peróxido de hidrogênio. As células então foram lavadas e ressuspendidas com PBS, mantidas no gelo e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

O peroxinitrito foi medido utilizando-se o fluoróforo HPF (5 μ M) por 30 minutos a 37°C no escuro. Para controle positivo, as amostras foram incubadas com 10 μ M de NPS e 10 μ M doxorubicina. Após marcação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspendidas em PBS para posterior análise no citômetro de fluxo.

Para detecção e estimativa da biodisponibilidade do NO foi usado o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2D, 2mM), que na presença de NO, emite fluorescência de cor verde, cuja intensidade é proporcional à biodisponibilidade intracelular de NO. Então, o DAF foi adicionado à suspensão de CH e incubado a 37°C por 180 minutos no escuro. O DAF-2D é um fluoróforo que atravessa o citoplasma celular e é convertido em 4,5-diaminofluoresceína (DAF). Na presença do NO é oxidado, levando a formação de triazolofluoresceína (DAF-2T) que emite coloração esverdeada proporcionalmente a concentração de NO intracelular, assim a fluorescência é detectada pelo citômetro (SCHACHNIK et al., 2009).

Para controle positivo, as amostras foram incubadas com 10 μ M de NPS (DIAS et al., 2014) previamente à incubação com DAF. Para quantificação das fluorescências emitidas pelo DHE, DCF, HPF e DAF, as amostras de células foram excitadas a 488nm e os sinais foram obtidos utilizando filtros 585/42 para DHE e 530/30 para DCF, HPF e DAF.

4.9 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados e aplicação das análises estatísticas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel (Redmond, Washington, EUA) e GraphPad Prism Software 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de animais usados em cada experimento (n).

Foram utilizados o teste t de Student não pareado para comparação de duas médias; ou utilizada a análise de variância (ANOVA) uma ou duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizadas quando foram necessários comparar três ou mais médias. Quando o teste ANOVA detectava significância, foi realizado o pós-teste (pos-hoc) de Bonferroni.

Para a determinação da resposta máxima (Rmax) e pD2 (-log EC50, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio produziram 50% da resposta máxima), foi feita análise de regressão não-linear,

obtida por meio da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). O pD2 foi utilizado para a análise da sensibilidade dos segmentos de aorta em resposta à ACh, NPS e FE.

Com o propósito de verificar a significância do efeito dos fármacos sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina nos grupos estudados, um resultado foi expresso como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração resposta à acetilcolina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está demonstrada como diferença da AUC (dAUC) da curva controle correspondente.

As diferenças entre os grupos experimentais e tratamentos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 PESO DOS ANIMAIS

Os animais do grupo ApoE^{-/-} Ct e do ApoE^{-/-} Cd e do grupo C57BL/6 controle (C57 Ct) tinham pesos semelhantes antes da exposição ao metal. Após 28 dias de exposição ao Cd, não foi observada diferença entre os pesos dos animais ($p > 0,05$).

Tabela 1: peso dos animais no início e no final da exposição ao Cd por 28 dias

Grupo	Início	Fim
C57 Ct	27,7±0,4g	31,7±0,4g
ApoE ^{-/-} Ct	27,9±0,5g	30,8±0,4g
ApoE ^{-/-} Cd	28,7±0,3g	30,2±0,9g

C57 Ct n=8, ApoE^{-/-} Ct n=6, ApoE^{-/-} Cd n=7. Valores expressos em média e EPM; * $p < 0,05$. One-way ANOVA.

Entretanto, ao analisar a variação do ganho ponderal durante o período, verificou-se que os animais ApoE^{-/-} Cd apresentam ganho menor de massa corporal que os animais ApoE^{-/-} Ct ($p \leq 0,007$). e C57 Ct >

Tabela 2: variação do ganho ponderal durante a exposição ao Cd por 28 dias

Grupo	Ganho de peso (g)
C57 Ct	3,3±0,6g
ApoE ^{-/-} Ct	2,8±0,4g
ApoE ^{-/-} Cd	1,6±0,2g*

C57 Ct n=6, ApoE^{-/-} Ct n=5, ApoE^{-/-} Cd n=5. Valores expressos em média e EPM; * $p < 0,05$ vs ApoE^{-/-} Ct e One-way ANOVA.

5.2 CONSUMO DE RAÇÃO

Os animais ApoE^{-/-} Cd consumiram menos ração que os animais do grupo ApoE^{-/-} Ct ($p=0,004$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais C57 Ct e ApoE^{-/-} Ct ($p > 0,05$).

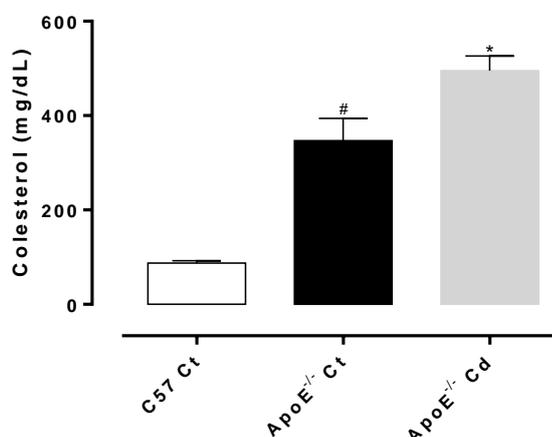
Tabela 3: Média do consumo de ração diária pelos animais durante a exposição ao Cd por 28 dias.

Grupo	Média do consumo de ração diária (g)
C57 Ct	4,52±0,03g
ApoE ^{-/-} Ct	5,43±0,36g
ApoE ^{-/-} Cd	4,28±0,14g*

Os camundongos ApoE^{-/-} que foram expostos ao metal consumiram menos ração que os ApoE^{-/-} Ct, mas não houve diferença entre os camundongos expostos ao metal e os C57 Ct Consumo expresso em gramas. C57 Ct n=6, ApoE^{-/-} Ct n=8, ApoE^{-/-} Cd n=11 Valores expressos em média e EPM; *p <0,05 vs ApoE^{-/-} Ct. One-way ANOVA.

5.3 DOSAGEM DE COLESTEROL

Ao final da exposição ao Cd, foi realizada a coleta do sangue para análise do colesterol. O resultado demonstrou que os animais que foram expostos ao metal (ApoE^{-/-} Cd) apresentam níveis de colesterol total maiores (495,5 mg/dL) que os animais ApoE^{-/-} Ct (346,75 mg/dL) (p=0,03) e os camundongos C57 Ct possuíam menor nível de colesterol (87,5 mg/dL) que os animais ApoE^{-/-} Ct (p=0,001).

Figura 4: Dosagem do colesterol sérico dos animais C57 Ct, ApoE^{-/-} Ct e os ApoE^{-/-} Cd

Valores expressos em média e EPM; #p < 0.05 vs. C57 Ct (n=4) e *p < 0.05 vs. ApoE^{-/-} Ct (n=4). One-way ANOVA.

5.4 REATIVIDADE VASCULAR

5.4.1 Resposta vascular ao potássio em artéria aorta

Quando avaliada a resposta contrátil ao potássio dos anéis de aorta, não foi observada diferença estatística entre os grupos C57 Ct, ApoE^{-/-} Ct e ApoE^{-/-} Cd (p>0,05).

Tabela 4: média da contração (mN) a solução rica em potássio (120 mM).

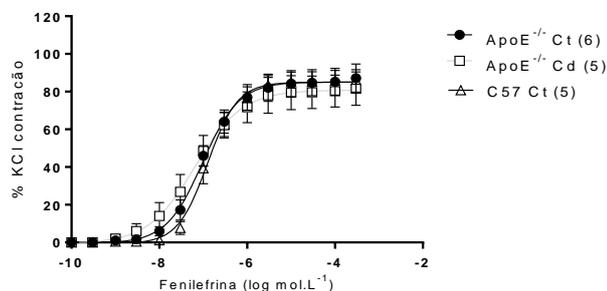
Grupos	Contração ao Potássio (mN)
C57 Ct	8,47±0,67
ApoE ^{-/-} Ct	9,04±0,53
ApoE ^{-/-} Cd	9,12±0,48

Valores expressos em média e EPM. C57 Ct: n=15; ApoE^{-/-} Ct: n=14 e ApoE^{-/-} Cd: n=26. One-way ANOVA. (p<0,05)

5.4.2 Efeito da exposição ao cloreto de Cd por 28 dias sobre a reatividade à fenilefrina em anéis isolados de aorta de camundongos

Quando realizada a curva de FE em anéis isolados de aorta foi observado que todos os grupos apresentaram respostas semelhantes às concentrações crescentes do agonista α 1-adrenérgico (p>0,05).

Figura 5: Curvas-concentração resposta à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos C57 Ct, ApoE^{-/-} Ct e ApoE^{-/-} Cd.



Os símbolos representam média +- EPM. Não há diferença estatística entre as curvas (p>0,05). O número de animais está representado entre parênteses. ANOVA TWO-WAY

Tabela 5: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD₂) a curva de concentração-resposta à fenilefrina em segmentos isolados de aorta dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd e C57 Ct.

	C57 Ct		ApoE ^{-/-} Ct		ApoE ^{-/-} Cd	
	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)
Fenilefrina	6,90±0,09	84,80 ± 5,16	7,04 ± 0,10	85,55 ± 7,26	7,22 ± 0,22	81,93 ± 9,38

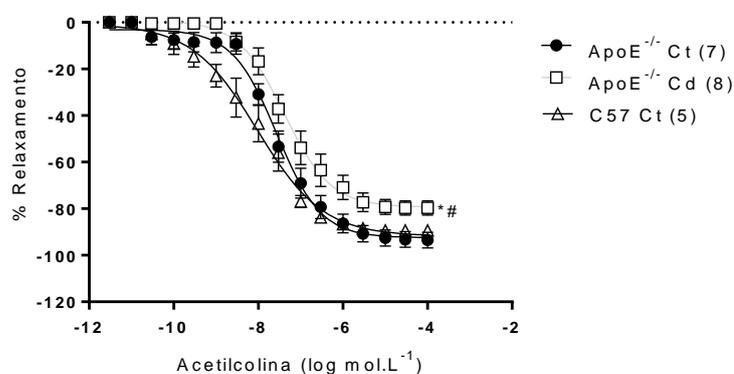
Os resultados são expressos em média +- EPM. Foram utilizados 7 camundongos ApoE^{-/-} Ct e 5 ApoE^{-/-} Cd e 5 C57 Ct. Teste T-Student não pareado para comparação de Rmax e pD₂: p>0,05 para todas as comparações.

5.4.3 Efeito da exposição ao cloreto de Cd por 28 dias sobre o relaxamento dependente do endotélio em anéis isolados de aorta de camundongos

O relaxamento dependente do endotélio foi estudado através da curva concentração-resposta à ACh. O grupo ApoE^{-/-} Cd demonstrou resposta máxima à esse agonista muscarínico menor que o grupo ApoE^{-/-} Ct e o C57 Ct (p=0,02). Não houve diferença entre os grupo C57 Ct e ApoE^{-/-} Ct (p>0,05).

Não há diferença na sensibilidade entre os grupos (p>0,05).

Figura 6: Curvas de concentração-resposta à ACh em anéis de aorta de camundongos ApoE^{-/-} Cd, C57 Ct e ApoE^{-/-} Ct.



Os símbolos representam media +- EPM expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. O número de animais está representado entre parênteses. C57 Ct e ApoE^{-/-} Ct (p>0,05), *p<0,05 vs ApoE^{-/-} Ct e #p<0,05 vs C57 Ct. ANOVA TWO-WAY.

Tabela 6: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD₂) a curva de concentração-resposta à acetilcolina em segmentos isolados de aorta dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd e C57 Ct.

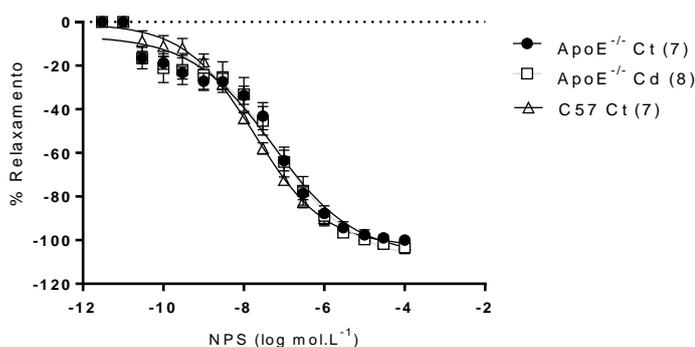
	C57 Ct		ApoE ^{-/-} Ct		ApoE ^{-/-} Cd	
	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)
Acetilcolina	8,11 ± 0,30	90,53 ± 2,53	7,61 ± 0,08	95,55 ± 1,37	7,26 ± 0,22 [#]	79,35 ± 3,09 [*]

Os resultados são expressos em média +- EPM. Foram utilizados 6 camundongos ApoE^{-/-} Ct e 6 ApoE^{-/-} Cd e 5 C57 Ct. Teste T-Student não pareado para comparação de Rmax e pD₂:^{*}p<0,05 vs ApoE^{-/-} Ct ANOVA TWO-WAY.

5.4.4 Efeito da exposição por 28 dias com cloreto de cádmio sobre o relaxamento independente do endotélio em anéis isolados de aorta

Esse estudo foi realizado através de curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de oxido nítrico, em anéis previamente contraídos com fenilefrina. Não foi encontrada diferença estatística no relaxamento vascular independente do endotélio entre os grupos ApoE^{-/-} Ct, C57 Ct e ApoE^{-/-} Cd (p>0,05).

Figura 7: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio para estudo do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de camundongos dos grupos: ApoE^{-/-} Ct, C57 Ct e ApoE^{-/-} Cd



Os símbolos representam os valores, expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina (p<0.05). O número de animais está representado entre parênteses. ANOVA TWO-WAY

Tabela 7: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em segmentos isolados de aorta dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd e C57 Ct.

	C57 Ct		ApoE ^{-/-} Ct		ApoE ^{-/-} Cd	
	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)
Nitroprussiato de sódio	7,71 ± 0,11	101,99 ± 3,32	7,44 ± 0,24	105,82 ± 2,02	7,39 ± 0,35	115,05 ± 11,08

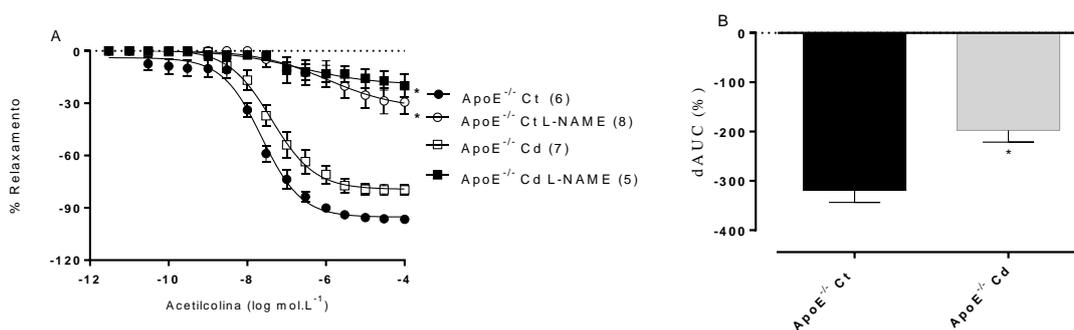
Os resultados são expressos em média +- EPM. Foram utilizados 7 camundongos ApoE^{-/-} Ct e 7 ApoE^{-/-} Cd e 7 C57 Ct. Teste T-Student não pareado para comparação de Rmax e pD₂: p>0.05 para todas as comparações.

Como os camundongos C57 Ct se comportaram de forma similar ao grupo ApoE^{-/-} Ct, no consumo de ração, no peso ao final da exposição aos 28 dias de Cd e a reatividade vascular não apresentou diferença, utilizamos os grupos ApoE^{-/-} para as demais análises.

5.4.5 Participação da via do óxido nítrico na exposição por 28 dias com cloreto de cádmio sobre a resposta vasodilatadora em aorta torácica

Para avaliar a participação do NO, utilizamos o inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase, L-NAME (100 µM). A adição desse inibidor reduziu o relaxamento induzido pela ACh em ambos grupos. No entanto, esse efeito foi menor em anéis isolados de animais ApoE^{-/-} Cd, sugerindo redução da biodisponibilidade de NO, como evidenciado na análise da área abaixo da curva (dAUC). Esse resultado sugere que a exposição ao cádmio reduz a participação do NO no relaxamento dependente do endotélio em aorta de camundongos ApoE^{-/-}.

Figura 8: Curvas concentração-resposta à acetilcolina na presença ou não do L-NAME em segmentos de aorta de camundongos expostos ApoE^{-/-} ou não ao Cd



(A) Curvas concentração-resposta à ACh na presença ou não de L-NAME em segmentos de aorta de ratos dos grupos ApoE^{-/-} Ct e ApoE^{-/-} Cd. Curvas concentração-resposta à ACh (B) Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de L-NAME. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam media \pm EPM. * $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-} Ct. Na análise da dAUC foi realizado Teste T-Student não pareado e na análise da reatividade vascular ANOVA TWO-WAY.

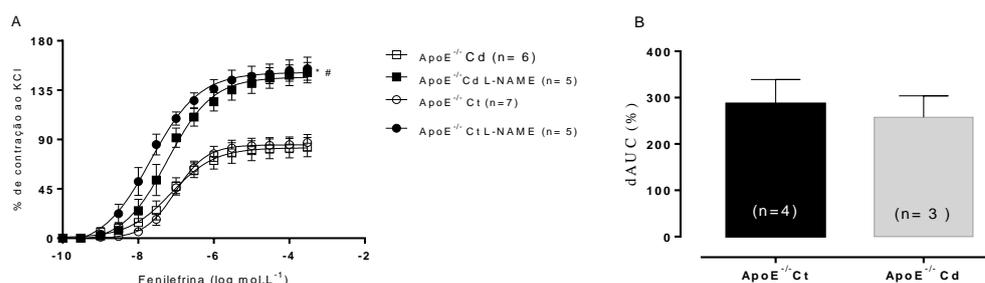
Tabela 8: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD₂) a curva de concentração-resposta à acetilcolina em segmentos isolados de aorta encubação com L-NAME ou não dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd.

	Rmax (%)	pD ₂
ApoE ^{-/-} Ct	95,55 \pm 1,37 [§]	7,61 \pm 0,08
ApoE ^{-/-} Cd	79,35 \pm 3,09 ^{#*}	7,26 \pm 0,22
ApoE ^{-/-} Ct LNAME	20,50 \pm 5,02	5,38 \pm 0,10
ApoE ^{-/-} Cd LNAME	20,26 \pm 7,17	6,20 \pm 0,48

Os resultados são expressos em média \pm EPM. Foram utilizados 6 camundongos ApoE^{-/-} Ct e 6 ApoE^{-/-} Cd e 6 ApoE^{-/-} Ct e 4 ApoE^{-/-} Cd LNAME. Teste T-Student não pareado para comparar Rmax vs pD₂. * $p < 0.05$ ApoE^{-/-} Cd vs ApoE^{-/-} Cd LNAME; # $p < 0.05$ ApoE^{-/-} Cd vs ApoE^{-/-} Ct, § $p < 0.05$ para ApoE^{-/-} Ct vs ApoE^{-/-} Ct LNAME.

5.4.5 Participação da via do óxido nítrico na exposição por 28 dias com cloreto de cádmio sobre a resposta vasoconstritora em aorta torácica

Foi avaliada também a participação da via do NO na resposta vasoconstritora a FE, também foi utilizado o inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase, L-NAME (100 μ M). A presença desse inibidor aumento a resposta contrátil induzida pela FE em ambos grupos, sem que ocorre-se diferença significativa entre os grupos estudados, quando analisada a área abaixo da curva.



(A) Curvas concentração-resposta FE na presença ou não de L-NAME em segmentos de aorta de ratos dos grupos ApoE^{-/-} Ct e ApoE^{-/-} Cd. Curvas concentração-resposta a FE (B) Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de L-NAME. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média +- EPM. *p<0.05 vs ApoE^{-/-} Ct. Na análise da dAUC foi realizado Teste T-Student não pareado e na análise da reatividade vascular ANOVA TWO-WAY.

Tabela 9: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD₂) a curva de concentração-resposta a fenilefrina em segmentos isolados de aorta encubação com L-NAME ou não dos grupos ApoE^{-/-} Ct, ApoE^{-/-} Cd.

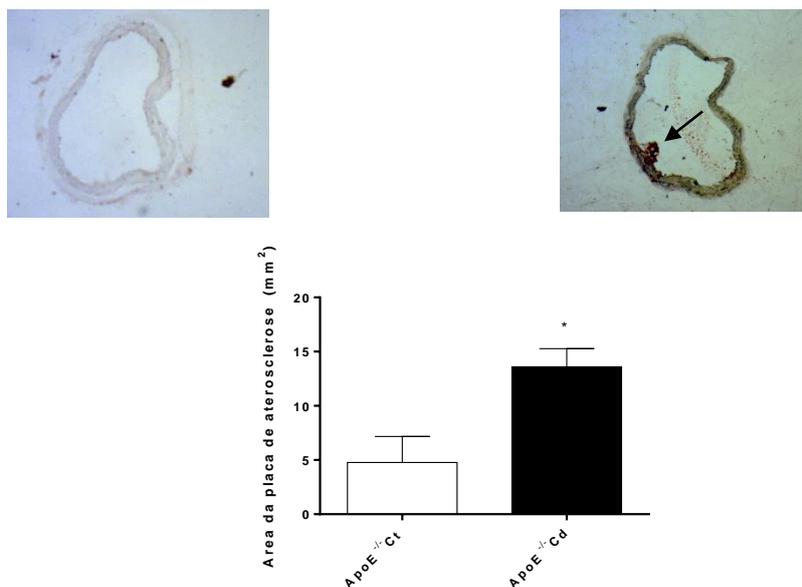
	Rmax (%)	pD ₂
ApoE ^{-/-} Ct	85,55 ± 7,26	7,04 ± 0,10
ApoE ^{-/-} Cd	81,93 ± 9,38	7,22 ± 0,22
ApoE ^{-/-} Ct LNAME	149,94 ± 9,58*	7,73 ± 0,17*
ApoE ^{-/-} Cd LNAME	145,74 ± 9,45#	7,26 ± 0,15

Os resultados são expressos em média +- EPM. Foram utilizados 7 camundongos ApoE^{-/-} Ct e 5 ApoE^{-/-} Cd e 5 ApoE^{-/-} Ct LNAME e 5 ApoE^{-/-} Cd LNAME. Teste T-Student não pareado para comparar Rmax vs pD₂. ApoE^{-/-} Ct vs ApoE^{-/-} Ct LNAME; ApoE^{-/-} Cd vs ApoE^{-/-} Cd+ LNAME, *p<0.05 para ApoE^{-/-} Ct vs ApoE^{-/-} Ct LNAME, #p<0.05 para ApoE^{-/-} Cd vs ApoE^{-/-} Cd LNAME.

5.5 MEDIDA DA PLACA DE ATEROSCLEROSE

A análise da área da placa de aterosclerose no arco aórtico dos camundongos ApoE^{-/-} demonstrou que os animais expostos ao Cd por 28 dias apresentavam áreas coradas pelo *Oil-Red-O* três vezes maiores do que os camundongos ApoE^{-/-} Ct (p<0,005).

Figura 9: Fotos típicas das secções transversais do arcos aórticos.



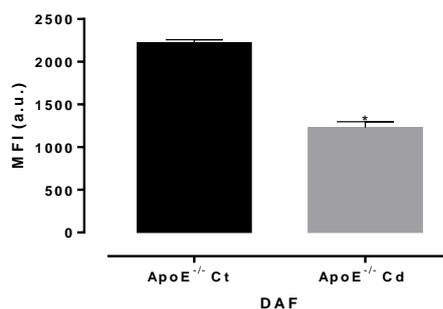
A seta indica lesão aterosclerótica corada com Oil-Red-O. Barra de escala: 200 μ m com (A e B) a objetiva de 4x. (C) O gráfico de barras indica a área do arco aórtico corado pelo Oil-Red-O. ApoE^{-/-} Ct (n=3) e ApoE^{-/-} Cd (n=4). *P < 0.05, Student's t-test.

5.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

5.6.1 Avaliação da biodisponibilidade de NO com fluoróforo DAF em CH de camundongos ApoE^{-/-} tratados com cloreto de cádmio por 28 dias

Quando analisada a biodisponibilidade de NO com o DAF em células da medula óssea foi possível observar que o animais do grupo ApoE^{-/-} Ct apresentam maior biodisponibilidade de NO que os animais que foram expostos ao Cd (p=0,0008).

Figura 10: Análise da produção de NO em células da medula óssea.

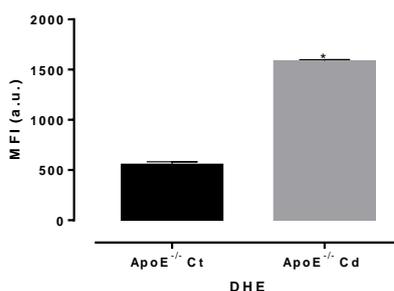


Os animais expostos ao Cd apresentam menor biodisponibilidade de NO que os animais controle ($p < 0,05$). Os valores indicam $MFI \pm EPM$ de experimentos realizados em triplicata. A.u., unidades arbitrárias. * $P < 0.05$, Student's t-test.

5.6.2 Avaliação da produção do ânion superóxido com fluoróforo DHE em CH de camundongos ApoE^{-/-} tratados com cloreto de cádmio por 28 dias

Para avaliar a produção de ânion superóxido pelas CH do fêmur foi utilizado o fluoróforo DHE e as células foram passadas no citômetro de fluxo. Assim é possível observar que a produção de ânion superóxido está aumentada nos animais ApoE^{-/-} Cd quando comparados aos animais ApoE^{-/-} Ct ($p < 0,0001$). Deixando claro que o metal também é capaz de causar estresse oxidativo na medula óssea e afetar células hematopoiéticas.

Figura 11: Análise da produção de ânion superóxido em células da medula óssea.

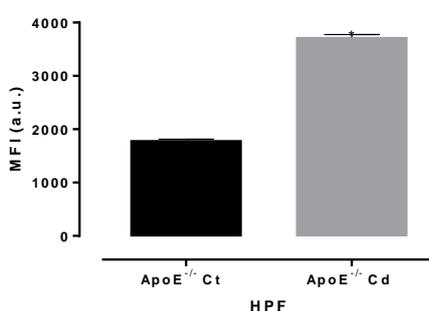


Os ApoE^{-/-} Cd apresentam maior estresse oxidativo que os animais controle ($p < 0,05$). Os valores indicam $MFI \pm EPM$ de experimentos realizados em triplicata. A.u., unidades arbitrárias. * $P < 0.05$, Student's t-test.

5.6.3 Avaliação da produção do peroxinitrito com fluoróforo HPF em CH de camundongos ApoE^{-/-} tratados com cloreto de cádmio por 28 dias

Quando analisada a produção de peroxinitrito, com o fluoróforo HPF, foi observado maior produção dessa ERN no grupo ApoE^{-/-} Cd do que no grupo ApoE^{-/-} Ct ($p < 0,001$).

Figura 12: Análise da produção de peroxinitrito em células da medula óssea

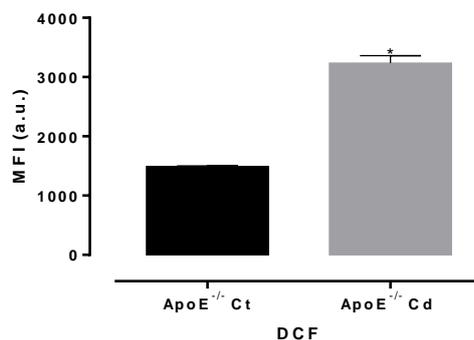


Os animais ApoE^{-/-} Cd apresentam maior estresse oxidativo que os animais ApoE^{-/-} Ct ($p < 0,05$). Os valores indicam $MFI \pm EPM$ de experimentos realizados em triplicata. A.u., unidades arbitrárias. * $P < 0.05$, Student's t-test.

5.6.4 Avaliação da produção do peróxido de hidrogênio com fluoróforo DCF em CH de camundongos ApoE^{-/-} tratados com cloreto de cádmio por 28 dias

Foi realizada análise da produção de H₂O₂ nas CH com o fluoróforo DCF. Os animais ApoE^{-/-} Cd apresentam níveis maiores desse radical que os camundongos do ApoE^{-/-} Ct ($p = 0,0007$).

Figura 13: Análise da produção do peróxido de hidrogênio em células da medula óssea



Os animais ApoE^{-/-} Cd apresentam maior estresse oxidativo que os animais controle ($p < 0,05$). Os valores indicam $MFI \pm EPM$ de experimentos realizados em triplicata. A.u., unidades arbitrárias. * $P < 0.05$, Student's t-test.

Estes resultados com aumento de ânion superóxido, H₂O₂ e peroxinitrito sugerem aumento do estresse oxidativo observado nas CH de camundongos ApoE^{-/-} Cd.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nossos principais resultados evidenciam que a exposição ao cádmio em camundongos ApoE^{-/-} induziu aumento do colesterol total, aumento de três vezes da placa de aterosclerose, disfunção vascular em aorta isolada, e aumento do estresse oxidativo em CH da medula óssea. O aumento da deposição da placa de aterosclerose pode ser devido ao aumento do colesterol e em decorrência da redução do NO. Além disso, o estresse oxidativo e a redução da biodisponibilidade do NO nas CH está relacionado com doenças cardiovasculares e a produção de células do sistema imune podem interferir no processo da aterosclerose.

Ressaltando que os animais não consumiram ração hiperlipídica em nenhum momento e que esse resultado é devido a exposição ao metal, visto que a formação da placa aterosclerótica em camundongos ApoE^{-/-} ocorre entre a 15^o à 20^o semana de idade.

6.1 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NO GANHO PONDERAL E NO CONSUMO DE RAÇÃO

Não foi observada diferença significativa no peso dos animais entre os grupos no início e no final dos 28 dias de exposição. Entretanto, o ganho de massa corporal dos camundongos expostos ao Cd foi significativamente menor que o dos animais não expostos, corroborando a literatura encontrada (ALMENARA et al., 2013; SOMPAMIT et al., 2010; WANG et al., 2017). Uma das explicações para o menor ganho de peso do grupo ApoE^{-/-} Cd é que estes consumiram, em média diária, menos ração que os animais do grupo ApoE^{-/-} Ct e C57 Ct.

Sompamit e colaboradores (2010), relataram que camundongos machos ICR expostos ao Cd por 8 semanas apresentaram redução no ganho de peso quando comparados ao grupo controle. Porém não houve diferença entre a ingestão de água e alimentos entre os grupos (SOMPAMIT et al., 2010). Almenara e colaboradores (2013) também relataram redução de ganho de peso corporal de ratos Wistar exposição ao Cd. Esses dois estudos citados utilizaram a mesma concentração de Cd na água que foi utilizado neste trabalho, porém o primeiro expôs os camundongos

durante oito semanas, enquanto o segundo utilizou uma exposição de quatro semanas (ALMENARA et al., 2013; SOMPAMIT et al., 2010).

Wang et al. (2017) também observaram que os ratos Wistar machos expostos ao Cd via intraperitoneal cinco vezes na semana durante cinco semanas apresentaram redução no ganho de peso (WANG et al., 2017).

Turkcan et al (2015), expôs camundongos fêmeas ApoE^{-/-} e C57BL/6J 100 mg/l CdCl₂ na água de beber por 12 semanas e ao realizarem a relação do peso do coração pelo peso do corpo não encontraram diferença entre os grupos que utilizaram dieta normolipídica (TÜRKCAN et al., 2015). Nossos resultados demonstraram que os camundongos ApoE^{-/-} Cd tiveram dificuldades para ganhar peso, mas que o peso final foi semelhantes o dos animais ApoE Ct^{-/-}, resultado semelhante ao encontrado por Turkcan et al (2015).

Muitos estudos abordam que a exposição ao Cd pode dificultar o ganho de peso, entretanto nenhum estudo demonstrou quais processos podem estar envolvidos na dificuldade para tal, mas não associa-se essa dificuldade com o consumo de alimento pelo animal, contudo nosso estudo demonstrou que a redução do consumo de ração pode ser uma das possíveis causas da redução do ganho de peso

6.2 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NO COLESTEROL TOTAL

O aumento do colesterol total é um dos possíveis mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de DCV (RUSSELL, 1999). Em nosso estudo os camundongos ApoE^{-/-} Cd apresentaram aumento dos níveis de colesterol sérico quando comparados com os ApoE Ct^{-/-}. No estudo realizado por Samarghandian, et al. (2015), ratos Sprague–Dawley foram expostos a água contendo CdCl₂ na concentração de 20 µM (2.0 mg Cd/L), por três meses. Os animais expostos ao metal tiveram aumento nos níveis de colesterol total, triglicerídeos e do LDL e redução do HDL (SAMARGHANDIAN et al., 2015). Resultado semelhante ao que encontramos em nosso trabalho, apesar de o modelo experimental ser diferente.

Oyinloye, et al. (2016) encontraram que ratos Wistar expostos ao íon por 21 dias na concentração de 200 mg/L de CdCl₂, tiveram quase o dobro de colesterol que os animais do grupo controle (não expostos ao metal). Nesse estudo também

observaram aumento dos níveis sérios de triglicerídeos nos animais que ingeriram Cd (OYINLOYE et al., 2016).

Zhou et al. (2016) realizaram o primeiro estudo associando a exposição ao metal de forma ocupacional a dislipidemia em uma grande população e concluíram que quanto maior foi a concentração de Cd no sangue, maiores as alterações no perfil lipídico, e finalizaram sugerindo que a exposição ocupacional ao Cd é dose dependente (ZHOU et al., 2016).

O estudo desenvolvido por Prabu et al (2010), observou níveis aumentados de colesterol total, triglicerídeos, ácidos graxos livres e fosfolipídios no soro sanguíneo de ratos expostos ao Cd. As mudanças induzidas pelo metal nas concentrações séricas dos compostos lipídicos observados nesse estudo estão de acordo com os achados de outros pesquisadores (MURUGAVEL; PARI, 2007; PRABU; SHAGIRTHA; RENUGADEVI, 2010; RAMIREZ; GIMENEZ, 2002).

Alguns mecanismos são propostos para o aumento do colesterol em indivíduos e animais expostos ao metal. O Cd é um íon caracterizado pela sua alta afinidade pelos grupos sulfidrílica (-SH), carboxila e fosfato, inibindo enzimas e podendo alterar o metabolismo lipídico. As DCV induzidas por ele estão associadas ao aumento dos lipídeos no soro (DIAS et al., 2014). As alterações nas frações do colesterol e de outros compostos lipídicos observados em ratos expostos ao Cd podem ser explicadas pela capacidade do metal para aumentar a atividade de HMG-CoA através da liberação de citocinas inflamatórias e interleucinas (KAYAMA et al., 1995). O aumento da concentração sérica de colesterol também pode resultar da capacidade do íon em diminuir a absorção de colesterol por macrófagos, que desempenham funções importantes no processamento desses ésteres (RAMIREZ; GIMENEZ, 2002). Além disso, o metal pode contribuir para o desenvolvimento de hipercolesterolemia pelo aumento da produção de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina1 β (IN-1 β) no fígado (SOUZA et al., 2004). As alterações na atividade da HMG-CoA redutase podem reduzir a expressão do gene do receptor de LDL, interferindo na absorção do colesterol da corrente sanguínea, o que aumenta a colesterolemia e o LDL sérico, além de estimular a síntese de colesterol no fígado (PRABU; SHAGIRTHA; RENUGADEVI, 2010).

Muitos estudos relacionam a exposição ao metal com o aumento do colesterol sanguíneo, não só em modelos animais como também em humanos. O fígado é um

dos órgãos de maior deposição do íon no organismo, sendo também o local do metabolismo do colesterol. Com isso, o Cd depositado nos hepatócitos pode alterar atividades de enzimas, lipoproteínas e expressões gênicas causando aumento do colesterol total e de frações, como o VLDL, LDL, triglicerídeos e redução do HDL (PRABU; SHAGIRTHA; RENUGADEVI, 2010) .

O aumento do colesterol e a aterosclerose estão associados com um estado pro-inflamatório crônico, que podem causar disfunção vascular pelo aumento das espécies reativas de oxigênio e redução da biodisponibilidade de NO (HUANG et al., 2011).

6.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA E AO POTÁSSIO

Estudos de Almenara et al (2013), Sompamit et al. (2010) e Donpunha et al. (2011), encontraram alterações na função em segmentos de aorta de ratos e camundongos expostos ao $CdCl_2$ (ALMENARA et al., 2013; DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010).

No presente estudo, ao se avaliar a resposta vascular à FE, não foi observada diferença entre os camundongos os grupos experimentais. Também não foi observada diferença na resposta ao potássio entre os grupos. Almenara et al. (2013), encontraram aumento da reatividade vascular à fenilefrina em ratos Wistar machos expostos a 100 ppm de $CdCl_2$ por 30 dias via água de beber (ALMENARA et al., 2013). Tzotzes et al. (2007), demonstram que ratos Wistar expostos ao Cd por 0,5 mg/kg/dia durante 120 dias, foi capaz de aumentar a reatividade ao KCl, entretanto não alterou a resposta à fenilefrina (TZOTZES et al., 2007). Angeli et al. (2013), realizou exposição de 10 mM $CdCl_2$ *in vitro* em segmentos de aorta de ratos Wistar e encontraram aumento da resposta máxima à fenilefrina (ANGELI et al., 2013).

Já quando analisada a exposição ao Cd em camundongos, Sompamit et al. (2010) e Donpunha et al. (2011), encontraram redução da resposta contrátil à FE nos camundongos IRC expostos ao metal. Sompamit et al. (2010) e Donpunha et al. (2011), expuseram os animais ao Cd através da água de beber, por oito semanas (DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010).

A diferença dos resultados obtidos por esses pesquisadores nos sugere que o modelo experimental e o modo de exposição ao cádmio parecem interferir nas respostas vasculares elicitadas pela FE.

6.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd SOBRE REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA E AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO

Para avaliação do relaxamento dependente do endotélio, realizamos curvas concentração-resposta à ACh em anéis pré-contraídos com FE.

Notamos em nosso estudo que a exposição ao Cd por quatro semanas reduziu a resposta máxima à ACh em segmentos isolados de aorta, porém não alterou a resposta ao NPS. Importante lembrar que animais ApoE^{-/-} na idade que foram utilizados nesse trabalho (18 semanas) não desenvolveram disfunção endotelial quando comparados a animais C57/BL6J (MEYRELLES et al., 2011) e que o resultado encontrado, não poderia ser associado ao modelo animal e sim à exposição ao metal (BONTHU et al., 1997; FRANSEN et al., 2008; WANG et al., 2000).

Tzotzes et al. (2007) não encontraram diferença na resposta vasodilatadora causada pela ACh em ratos Wistar tratados com injeções de Cd (0.5 mg/kg/i.m.) por 120 dias (TZOTZES et al., 2007). Sompamit et al. (2010) e Donpunha et al. (2011), encontraram redução da resposta vasodilatadora nos camundongos IRC expostos ao metal, tanto na via dependente do endotélio como na independente do endotélio (DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010). Angeli et al. (2013), realizaram exposição à 10 mM CdCl₂ *in vitro* em segmentos de aorta de ratos Wistar e não encontraram diferença entre os grupos nas curvas concentração-resposta ao NPS ou à ACh (ANGELI et al., 2013). Almenara et al. (2013), observam que a exposição ao Cd reduziu a resposta vascular à ACh, pela redução da resposta máxima, porém a resposta vasodilatadora independente do endotélio não foi alterada (ALMENARA et al., 2013).

O tônus muscular liso é controlado pelo endotélio, pela liberação e produção de substâncias vasoativas, como o NO, prostaciclina, fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio e endotelina. A desarmonia dessas substâncias pode afetar o tônus muscular, levando a doenças como a HAS (VANHOUTTE et al., 2009). Além do

tônus vascular o endotélio também é parte influente na hemostase; na participação em processos inflamatórios e imunológicos e na regulação do crescimento vascular (HELENA et al., 2001).

Os resultados apresentados até aqui demonstram que o Cd pode interferir na função endotelial, possivelmente por reduzir a liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio, principalmente o NO. Como foi encontrada redução da resposta vasodilatadora induzida pela ACh após a exposição ao cádmio, investigamos a participação do NO no relaxamento dependente do endotélio de camundongos ApoE^{-/-} expostos ou não ao cádmio.

6.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd SOBRE A VIA DO NO

O NO é a substância vasoativa mais importante produzida pelo endotélio vascular em vasos de condutância. O NO é liberado na forma gasosa, o que facilita sua difusão através das membranas celulares. Possui funções que incluem a regulação do crescimento vascular, inibição da adesão e agregação plaquetária e manutenção do tônus vascular (MONCADA; PALMER; HIGGES, 1991).

O NO é produzido pelas células endoteliais com base na oxidação da L-arginina a NO e L-citrulina, por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na presença de cofatores, como a nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida (NADPH), a tetrahidrobiopterina (BH₄), a flavina adenina dinucleotídeo e flavina mononucleotídeo. Sua produção é estimulada por diversas formas químicas e físicas (MONCADA; PALMER; HIGGES, 1991; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987).

Existem três isoformas descobertas da NOS. A NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS) são constitutivas e dependentes do cálcio para ativação. Já a isoforma induzível (iNOS), é expressa em grandes quantidades em processos inflamatórios, sua ativação não depende do aumento da concentração de cálcio intracelular. Nos vasos sanguíneos a eNOS é a mais importante fonte de NO (XIE; NATHAN, 1994).

O NO produzido principalmente pela eNOS dissemina-se para as células musculares lisas, onde é responsável por ativar a guanilato ciclase solúvel, provocando aumento da concentração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc),

o que ativa a proteína G (PKG). A PKG ativará canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , estimulando a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e fosforila a cadeia leve da miosina tornando-a menos sensível ao Ca^{2+} , causando a saída de cálcio da célula pelo trocador Na^+/Ca^{2+} (LINCOLN; DEY; SELLAK, 2001). Além disso, nos anos 2000 foi demonstrado que o NO pode causar a ativação de forma direta nos canais para K^+ (CHAYTOR; EVANS; GRIFFITH, 1998).

Foi observada em nosso trabalho redução da resposta à ACh após exposição ao Cd em camundongos ApoE^{-/-}. Sugere-se que tal redução seja decorrente da redução da liberação ou biodisponibilidade de NO. Em vista disso, para avaliar a participação deste fator na resposta dilatadora à ACh, foi incubado o inibidor não-seletivo da NOS, L-NAME (100 μ M), em segmentos de aorta dos grupos ApoE^{-/-} Ct e ApoE^{-/-} Cd. O fármaco reduziu a resposta vasodilatadora em ambos os grupos. Quando analisada a diferença da área abaixo da curva, sugere-se que a exposição ao Cd, durante vinte oito dias reduz a biodisponibilidade de NO e sua ação sobre o musculo liso vascular.

O tabagismo está associado com a redução do cofator BH₄ em BH₃ ou BH₂. Com a redução desse cofator a eNOS ao invés de produzir NO passa a produzir ânion superóxido, reduzindo a biodisponibilidade e produção de NO nos vasos sanguíneos (HEITZER et al., 2000). Estudos indicam a redução da biodisponibilidade de NO como um fator importante para o desenvolvimento de DCV (FÖRSTERMANN; MÜNDEL, 2006; STROES et al., 1998). O Cd presente no cigarro, como citado anteriormente aumenta o estresse oxidativo, que por sua vez é um dos fatores responsáveis por reduzir o BH₄, aumentando a produção de EROs (LAURSEN et al., 2001).

Sompamit et al. (2010) relataram que camundongos expostos ao cloreto de cádmio por oito semanas na água de beber apresentaram aumento de ânion superóxido na aorta torácica e redução da biodisponibilidade de NO, com aumento da concentração de nitrito/nitrato na urina de camundongos IRC (SOMPAMIT et al., 2010). Almenara et al. (2013) demonstrou que aorta de ratos Wistar expostos por 30 dias ao CdCl₂ também apresentaram redução da biodisponibilidade de NO quando comparadas aos animais do grupo controle. Além disso, demonstrou aumento da subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase e da eNOS através do Western Blot. Ainda, a incubação de segmentos de aorta com DAF induziu maior intensidade de fluorescência no grupo cádmio. Os autores relacionaram que NO produzido estaria

atuando com um agente antioxidante, se ligando ao ânion superóxido formando peroxinitrito, o que justifica a diminuição da biodisponibilidade do NO para o músculo liso vascular (ALMENARA et al., 2013).

Em suma, os estudos demonstraram que a exposição ao Cd está relacionada com a redução da biodisponibilidade de NO. Uma das possíveis causas é o aumento das EROs e a redução de cofatores para a produção e liberação pelo eNOS.

6.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd NO DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE

A exposição ao Cd está relacionada a várias doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, hipercolesterolemia, disfunção endotelial e aumento do estresse oxidativo (ALMENARA et al., 2013; MESSNER et al., 2009; OYINLOYE et al., 2016). Esses fatores em conjunto podem colaborar para o surgimento e progressão da placa de ateroma.

Nosso estudo demonstrou que a exposição ao Cd por 28 dias em camundongos ApoE^{-/-} aumentou em três vezes a área do vaso corada pelo *Oil-Red* (marcador de lipídeos neutros), corroborando com o estudo de Knoflach et al. (2011). Esses autores demonstraram que camundongos ApoE^{-/-} expostos ao Cd tiveram aumento da placa de aterosclerose quando comparados a camundongos ApoE^{-/-} não expostos ao metal (KNOFLACH et al., 2011). Contudo, o estudo realizado por Knoflach et al. utilizou camundongos fêmeas ApoE^{-/-} com idade de oito semanas e expuseram por doze semanas ao Cd e os animais se alimentavam dieta hiperlipídica (gordura 21.2%; Sniff, Soest, Alemanha) (KNOFLACH et al., 2011). Em nosso estudo utilizamos camundongos machos com 14 semanas sendo expostos ao Cd por vinte oito dias, sem dieta hiperlipídica, sendo analisados com 18 semanas de idade.

Meyrelles et al (2011). relataram que o surgimento de placas fibrosas em camundongos ApoE^{-/-} ocorre entre 15-20 semanas de idade. O gênero do camundongo estudado é de extrema importância pois os estudos divergem quanto o desenvolvimento da placa aterosclerótica. Chiba et al. (2011) pesquisaram se há diferença entre camundongos fêmeas e machos ApoE^{-/-} alimentados por dieta aterogênica por 16 semanas a partir da 10ª semana de idade e concluíram que as fêmeas apresentaram lesões ateroscleróticas menores que machos e que o fator

hormonal é responsável por proteger as fêmeas contra o desenvolvimento das lesões (CHIBA et al., 2011; MEYRELLES et al., 2011).

Messner et al. (2009) ao realizarem exposição ao Cd em camundongos fêmeas ApoE^{-/-}, descreveram que o aumento da permeabilidade endotelial é o componente chave para o iniciação de aterosclerose causada pelo Cd (MESSNER et al., 2009).

Já em um estudo realizado com humanos, Borné et al. (2017) mostraram que exposição ao Cd é um fator independente da presença de outros fatores de risco, como diabetes, hipertensão, para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas em mulheres de 64 anos e suportam a hipótese de que o Cd pode promover a vulnerabilidade das placas carotídeas, aumentando o risco de ruptura e de acidentes vasculares cerebrais isquêmico (BORNÉ et al., 2017). Fagerberg et al. (2015) avaliaram placa de aterosclerose na carótida de homens e mulheres de moradores da cidade de Malmö na Suécia, nascidos entre 1923 e 1945, que já haviam participado do Malmö Diet and Cancer Study. Obtiveram como desfecho do estudo a determinação da associação entre o nível de cádmio no sangue e a prevalência da placa aterosclerótica em fumantes (FAGERBERG et al., 2015).

As pesquisas com animais demonstraram que a exposição ao Cd foi capaz de aumentar a placa de aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-}. Já em estudos realizados com humanos que apresentavam altas concentração de Cd no sangue, também foi encontrada correlação entre exposição ao metal e desenvolvimento de aterosclerose, principalmente na carótida. Os camundongos ApoE^{-/-} na idade utilizada nesse estudo (18 semanas), alimentados com dieta normolipídica, não apresentaram evidências de desenvolvimento de placa de aterosclerose. Entretanto, a exposição ao Cd em camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta normolipídica foi capaz de acelerar a formação da placa de aterosclerose.

6.7 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO Cd POR 28 DIAS SOBRE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS

Existem vários estudos que investigaram a relação da exposição ao Cd no coração, vaso sanguíneo, rins, testículos e outros órgãos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Porém, não foram encontrados estudos com análise das CH.

O papel das células tronco hematopoiéticas é sustentar processos de reparação fisiológica, reconstituindo o sistema hematopoiético. São células progenitoras multipotentes, podendo, então, se diferenciar em diversas linhagens de células sanguíneas, como eritrócitos, megacariócitos/plaquetas, macrófagos, células T, NK e dendríticas. (WEISSMAN; SHIZURU, 2008).

A exposição ao Cd está relacionada ao aumento do estresse oxidativo (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013), entretanto, até hoje não foram estudadas se CH poderiam estar sofrendo consequências da exposição ao metal. Ao avaliar as CH observou-se redução da biodisponibilidade de NO, além de aumento do estresse oxidativo, evidenciado pela quantificação de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito no citoplasma dessas células.

Os altos níveis de ERO's encontradas na aterosclerose são importantes mediadores de danos aos componentes celulares (VALKO et al., 2007). Os radicais livres são capazes de causar vários danos ao organismo, inclusive ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (DHAWAN; BAJPAYEE; PARMAR, 2009). Dessa forma, o aumento nos níveis de ERO's pode causar genotoxicidade, participando no desenvolvimento ou progressão da aterosclerose (VASQUEZ et al., 2012).

Como citado anteriormente a medula óssea é o local da produção das células do sistema imune, como macrófagos e monócitos, que participam de forma direta do processo da aterosclerose. O aumento do estresse oxidativo nessa região pode contribuir ainda mais para que a placa de aterosclerose progrida de forma rápida e com maior deposição de Cd, além disso, as células progenitoras derivadas da medula óssea estão envolvidas no desenvolvimento e no reparo de lesões, de variadas fisiopatologias, como doença cardíaca isquêmica e doença arterial periférica (ASAHARA et al., 1997; JIN et al., 2009; RAFII et al., 2003; TEPPER et al., 2002). As EROs tem papel importante sobre as células produzidas pelo medula óssea, visto que em baixas concentrações de H_2O_2 está envolvido na manutenção da quiescência, enquanto níveis mais alto de H_2O_2 contribui para uma maior proliferação, senescência ou apoptose (JANG; SHARKIS, 2007; NAKA et al., 2008).

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que a exposição ao Cd por 28 dias foi capaz de aumentar os níveis de colesterol sanguíneo dos animais ApoE^{-/-}. Além disso, quando analisada a reatividade vascular desses animais foi possível concluir que o metal reduziu a participação do NO no relaxamento induzido pela ACh.

A disfunção endotelial encontrada neste estudo, ocorreu pela redução da biodisponibilidade do NO, sugerindo aumento do estresse oxidativo, em razão de estudos prévios demonstrarem que o Cd é capaz de aumentar a produção de radicais livres. A redução da resposta à acetilcolina está associada a menor modulação do endotélio.

O aumento do colesterol total e a disfunção endotelial nos camundongos expostos ao metal sugerem ser umas das causas para o aumento de aproximadamente três vezes da placa aterosclerótica encontrada nos animais ApoE^{-/-} Cd, visto que ambos são fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose.

O Cd também foi responsável por causar aumento das EROs nas CH. As CH e células endoteliais são derivadas dos hemangioblastos produzidos na medula óssea, além disso, a medula também é o órgão responsável pela produção de células do sistema imune, como macrófagos, que estão relacionado com o desenvolvimento da aterosclerose.

Por fim, os resultados sugerem que a exposição ao Cd por 28 dias promove disfunção endotelial, aumento do colesterol sanguíneo e aumento do estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO em CH, esses fatores em conjunto podem acelerar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principalmente da aterosclerose.

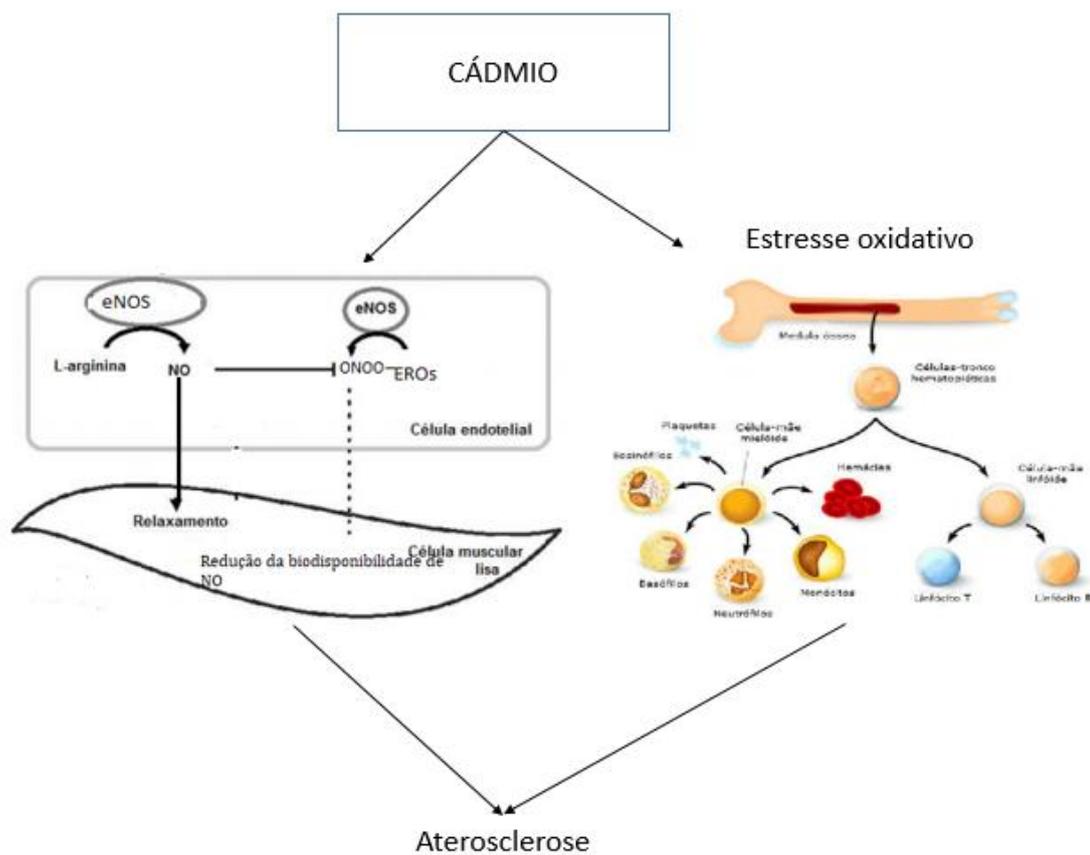


Figura 14: Esquema sintetizando o efeito que o Cd provoca na reatividade vascular e nas células hematopoiéticas. Figuras retiradas (Tese de Camila Almenara, 2017 e todamateria.com.br) e adaptada.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ABU-HAYYEH, S. et al. Cadmium accumulation in aortas of smokers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 5, p. 863–867, 2001.

ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.

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, p. 1–8, 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.

ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964–967, 1997.

ATSDR. Toxicological Profile for Cadmium. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service- U.S. Department of Health and Human Services**, n. September, p. 1–487, 2012.

BABA, H. et al. The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression. **Modern Pathology**, v. 26, n. 9, p. 1228–34, 2013.

BALARAMAN R, GULATI OD, BHATT JD, RATHOD SP, H. K. Cadmium induced hypertension in rats. **Pharmacology**, v. 4, n. 38, p. 226–234, 1989.

BILGEN, I. et al. Involvement of cholinceptors in cadmium-induced endothelial dysfunction. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 14, n. 1, p. 55–76, 2003.

BIZARRO, V. G.; MEURER, E. J.; TATSCH, F. R. P. Teor de cádmio em fertilizantes fosfatados comercializados no Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 0103–8478, p. 247–250, 2008.

BOLISETTY, S.; JAIMES, E. A. Mitochondria and reactive oxygen species: Physiology and pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6306–6344, 2013.

BONTHU, S. et al. Atherosclerosis, Vascular Remodeling, and Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation in Genetically Altered Hyperlipidemic Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 11, p. 2333–2340, 1997.

BORNÉ, Y. et al. Cadmium, Carotid Atherosclerosis, and Incidence of Ischemic Stroke. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 12, p. e006415, 2017.

BULBRING, E.; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle.

Pharmacological Reviews, v. 39, n. 1, 1987.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. **Circulation Research**, v. 87, p. 840–844, 2000.

CHANNON, K. M.; GUZIK, T. J. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. **J Physiol Pharmacol**, v. 53, n. 4 Pt 1, p. 515–24., 2002.

CHANTARAWONG, W. et al. Microphthalmia-associated transcription factor as the molecular target of cadmium toxicity in human melanocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 454, n. 4, p. 594–599, 2014.

CHAYTOR, A. T.; EVANS, W. H.; GRIFFITH, T. M. Central role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent relaxations of rabbit arteries. **Journal of Physiology**, v. 508, n. 2, p. 561–573, 1998.

CHIBA, T. et al. Estrogen-dependent activation of neutral cholesterol ester hydrolase underlying gender difference of atherogenesis in apoE^{-/-} mice. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 2, p. 545–551, 2011.

CHOI, J. et al. Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 3, p. 497–505, 2009.

CLINE, M. J.; LEHRER, R. I. D-amino acid oxidase in leukocytes: A possible D-amino-acid-linked antimicrobial system. **Microbiology**, v. 62, p. 756–63, 1969.

CYBULSKY, M. I.; JONGSTRA-BILEN, J. Resident intimal dendritic cells and the initiation of atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, p. 397–403, 2010.

DA CUNHA MARTINS, A. et al. Arsenic, cadmium, and mercury-induced hypertension: mechanisms and epidemiological findings. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, v. 0, n. 0, p. 1–22, 2018.

DE SOUSA VIANA, G. F.; GARCIA, K. S.; MENEZES-FILHO, J. A. Assessment of carcinogenic heavy metal levels in Brazilian cigarettes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 181, n. 1–4, p. 255–265, 2011.

DEL RIO, D.; SERAFINI, M.; PELLEGRINI, N. Selected methodologies to assess oxidative/antioxidant status in vivo: a critical review. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 12, n. 6, p. 343–351, dez. 2002.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 5–32, 2009.

DIAS, A. T. et al. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 35, 2014.

DONG, F. et al. Cadmium induces vascular permeability via activation of the p38 MAPK pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 447–452, 2014.

DONPUNHA, W. et al. Protective effect of ascorbic acid on cadmium-induced hypertension and vascular dysfunction in mice. **BioMetals**, v. 24, n. 1, p. 105–115, 2011.

DROBNIK, J. et al. Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vasopressin-induced hypertension or hypercholesterolemia. **J Physiol Pharmacol.**, v. 51, n. 3, p. 521–533, 2000.

DUFFUS, J. H. “ HEAVY METALS ”— A MEANINGLESS TERM ? (IUPAC Technical Report) (IUPAC Technical Report). **Pure Appl.Chem.**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

ELINDER, C. G. et al. Assessment of renal function in workers previously exposed to cadmium. **British journal of industrial medicine**, v. 42, n. 11, p. 754–60, 1985.

ERIE, J. C. et al. Urinary Cadmium and Age-related Macular Degeneration. **American Journal of Ophthalmology**, v. 144, n. 3, p. 0–5, 2007.

EUM, K. D.; LEE, M. S.; PAEK, D. Cadmium in blood and hypertension. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 1, p. 147–153, 2008.

FADLOUN, Z; LEACH, G. D. . The effects of Cd²⁺ on the myogenic activity and the responsiveness of the rat portal. **Pulmonary Circulation**, p. 181–182, 1979.

FAGERBERG, B. et al. Cadmium exposure and atherosclerotic carotid plaques - Results from the Malmö diet and Cancer study. **Environmental Research**, v. 136, p. 67–74, 2015.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708–1714, 2006.

FRANSEN, P. et al. Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 455, n. 5, p. 811–818, 2008.

FRIBERG, L. **Cadmium in the environment**. [s.l.] CRC Press, 1974.

FUJIWARA, Y.; WATANABE, S.; KAJI, T. Promotion of cultured vascular smooth muscle cell proliferation by low levels of cadmium. **Toxicology letters**, v. 94, n. 3, p. 175–80, 1998.

GANITKEVICH V, Y. A.; ISENBERG, G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. **The Journal of Physiology**, v. 435, n. 1, p. 187–205, 1991.

GARLANDA, C.; DEJANA, E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 7, p. 1193–1202, jul.

1997.

GRIENGLING, K. K.; ALEXANDER, R. W. **Oxidative stress and cardiovascular disease.***Circulation* United States, nov. 1997.

GRUNDTMAN, C.; WICK, G. Europe PMC Funders Group The autoimmune concept of atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, v. 22, n. 5, p. 327–334, 2011.

HEITZER, T. et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. **Circ Res**, v. 86, n. 2, p. E36–E41, 2000.

HELENA, M. et al. Hipertensão arterial : o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

HOFKER, M. H.; VAN VLIJMEN, B. J. .; HAVEKES, L. M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 1998.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of Smooth Muscle Contraction. **Physiol Rev.**, v. 76, n. 4, p. 967–1003, 1996.

HUANG, K. et al. The short-term consumption of a moderately high-fat diet alters nitric oxide bioavailability in lean female Zucker rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 89, n. 4, p. 245–257, 2011.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: A historical overview. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4 I, p. 503–514, 2002.

JANG, Y.; SHARKIS, S. J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. **Blood.**, v. 110, n. 8, p. 3056–3063, 2007.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 55, n. 3, p. 503–517, 2004.

JEYAPRAKASH, K.; CHINNASWAMY, P. Effect of spirulina and Liv-52 on cadmium induced toxicity in albino rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, n. 9, p. 773–781, 2005.

JI, L. L. Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review. **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 7, p. 582–593, 2007.

JIN, D. K. et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. **Nat Med**, v. 12, n. 5, p. 557–567, 2009.

JONGSTRA-BILEN, J. et al. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal

mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 9, p. 2073–83, 2006.

KAJI, T. et al. Sensitive response of cultured vascular smooth-muscle cells to cadmium cytotoxicity: Comparison with cultured vascular endothelial cells and kidney epithelial LLC-PK1 cells. **Toxicology Letters**, v. 89, n. 2, p. 131–137, 1996.

KAYAMA, F. et al. **Role of tumor necrosis factor- α in cadmium-induced hepatotoxicity** *Toxicology and applied ...*, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X85710654>>

KIM, C.; KIM, J.-Y.; KIM, J.-H. Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. **BMB reports**, v. 41, n. 8, p. 555–559, 2008.

KISHIMOTO, T. et al. Effect of cadmium injury on growth and migration of cultured human vascular endothelial cells. **Human cell**, v. 9, n. 1, p. 43–48, 1996.

KLEINDIENST, R. et al. Immunology of atherosclerosis. Demonstration of heat shock protein 60 expression and T lymphocytes bearing alpha/beta or gamma/delta receptor in human atherosclerotic lesions. **American Journal of Pathology**, v. 142, n. 6, p. 1927–1937, 1993.

KNOFLACH, M. et al. Non-Toxic Cadmium Concentrations Induce Vascular Inflammation and Promote Atherosclerosis. **Circulation Journal**, v. 75, n. October, p. 2491–2495, 2011.

KREUTMAYER, S. B. et al. Dynamics of heat shock protein 60 in endothelial cells exposed to cigarette smoke extract. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 51, n. 5, p. 777–780, 2011.

LACY, F.; O'CONNOR, D. T.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. **Journal of hypertension**, v. 16, n. 3, p. 291–303, 1998.

LAURSEN, J. B. et al. Implications for Interactions Between Peroxynitrite. **Circulation**, v. 103, p. 1282–1289, 2001.

LAWSON, K.; CHATELAIN, P. Effects of the divalent cations nickel and cadmium on contractions of rat aorta to endothelin-1. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 237–243, 1992.

LINCOLN, T.; DEY, N.; SELLA, H. Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Heart**, p. 1421–1430, 2001.

LIU, P. et al. CX3CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 2, p. 243–250, 2008.

MATOVIĆ, V. et al. Cadmium Toxicity Revisited: Focus on Oxidative Stress Induction

and Interactions with Zinc and Magnesium. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 65–76, 2011.

MCCORD, J. Free Radicals and Inflammation: Protection of Synovial Fluid by Superoxide Dismutase. **Science**, v. 185, p. 529–31, 1974.

MENKE, A. et al. Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 2, p. 190–196, 2009.

MESSNER, B. et al. Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and in vivo relevance. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 9, p. 1392–1398, 2009.

MESSNER, B.; BERNHARD, D. **Cadmium and cardiovascular diseases: Cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance** *BioMetals*, 2010.

MEYRELLES, S. S. et al. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 211, 2011.

MILLONIG, G. et al. The vascular-associated lymphoid tissue: a new site of local immunity. **Current Opinion in Lipidology**, v. 12, n. 5, p. 547–553, 2001.

MILLONIG, G.; MALCOM, G. T.; WICK, G. Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 2, p. 441–448, 2002.

MONCADA, M.; PALMER, R.; HIGGES, E. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews.**, v. 43, p. 109–142, 1991.

MULLICK, A. E. et al. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 2, p. 373–383, 2008.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1977.

MURUGAVEL, P.; PARI, L. Diallyl tetrasulfide protects cadmium-induced alterations in lipids and plasma lipoproteins in rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 6, p. 356–361, 2007.

NAKA, K. et al. Regulation of Reactive Oxygen Species and Genomic Stability in Hematopoietic Stem Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 11, p. 1883–1894, 2008.

NAKAGAWA, H.; NISHIJO, M. Environmental cadmium exposure, hypertension and cardiovascular risk. **J Cardiovasc Risk.**, p. 11–17, 1996.

NAKASHIMA, Y. et al. ApoE - deficient mice develop lesions of all phases of

atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis**, v. 14, p. 133–140, 1994.

NISHINO, T. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. **Journal of biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 1–6, 1994.

NISHINO, T. et al. Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. **FEBS Journal**, v. 275, n. 13, p. 3278–3289, 2008.

NIWA, A.; SUZUKI, A. Direct Antiangiogenic Actions of Cadmium on Human Vascular Endothelial Cells. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 7, p. 51–60, 1982.

NORDBERG, G. F.; KJELLSTROM, T. Metabolic model for cadmium in man. **Environmental Health Perspectives**, 1979. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40572-016-0117-9>>

OECD. Risk Reduction Monograph N° 5: Cadmium. Background and national experience with reducing risk. n. December, p. 1–6, 1995.

OYINLOYE, B. E. et al. Aqueous extract of *Monodora myristica* ameliorates cadmium-induced hepatotoxicity in male rats. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 641, 2016.

OZTURK, I. M. et al. Determination of acute and chronic effects of cadmium on the cardiovascular system of rats. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 19, n. 4, p. 308–17, 2009.

PAIGEN, B. et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. **Atherosclerosis**, v. 57, n. 1, p. 65–73, 1985.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PELUSO, I. et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis Development : The Central Role of LDL and Oxidative Burst. p. 351–360, 2012.

PERRY HM JR, E. M. Sodium retention in rats with cadmium-induced hypertension. **Sci Total Environ**, v. 22, p. 31–38, 1981.

PIEDRAHITA, J. A. et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 10, p. 4471–4475, 1992.

PLUMP, A. S. et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343–353, 1992.

PRABU, S. M.; SHAGIRTHA, K.; RENUGADEVI, J. Amelioration of cadmium-induced oxidative stress, impairment in lipids and plasma lipoproteins by the combined

treatment with quercetin and α -tocopherol in rats. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, 2010.

PROZIALECK, W. C.; EDWARDS, J. R.; WOODS, J. M. **The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity** *Life Sciences*, 2006.

RAFII, S. et al. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 996, p. 49–60, 2003.

RAMIREZ, D. C.; GIMENEZ, M. S. Lipid modification in mouse peritoneal macrophages after chronic cadmium exposure. **Toxicology**, v. 172, n. 1, p. 1–12, 2002.

RATTMANN, Y. D. Mecanismos endoteliais envolvidos nos efeitos vasculares da *dicksonia sellowiana* (presl.) hook. **Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.**, v. 145f, p. 167, 2009.

RATZ, P. H. et al. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity : KCl as a calcium-sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. C769–C783, 2005.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–26, 1999.

RUSSELL, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 1999.

SACERDOTE, F. L.; CAVICCHIA, J. C. Ultrastructural effects of cadmium on the rat epididymis. **Int J Androl**, v. 6, n. 6, p. 533–540, 1983.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Effect of chronic exposure to cadmium on serum lipid, lipoprotein and oxidative stress indices in male rats. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 151–154, 2015.

SARKAR, S. et al. Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 9, n. 3, p. 144–9, 1995.

SATARUG, S. et al. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 2, p. 182–190, 2010.

SATARUG, S.; MOORE, M. R. Environmental Medicine Commentary Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. **Environmental Medicine**, v. 112, n. 10, p. 1099–1103, 2004.

SCHACHNIK, N. C. C. et al. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: Optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. **Journal of Immunological Methods**, v. 343, n. 2, p. 103–

111, 2009.

SERAFINI, M.; DEL RIO, D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? **Redox Report**, v. 9, n. 3, p. 145–152, 2004.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 3 DEC, n. December, p. 1–5, 2012.

SKOCZYNSKA, A; MARTYNOWICZ, H. The impact of subchronic lead poisoning on the vascular effect of nitric oxide in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 99–106, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretriz brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.**, v. 8, n. 3, p. 2–19, 2001.

SOMPAMIT, K. et al. Reversal of cadmium-induced vascular dysfunction and oxidative stress by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in mice. **Toxicology Letters**, v. 198, n. 1, p. 77–82, 2010.

SOUZA, V. et al. Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. **Toxicology**, v. 197, n. 3, p. 213–228, 2004.

STAESSEN, J. A. et al. Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. **The Lancet**, v. 353, n. 9159, p. 1140–1144, 1999.

STEFFENSEN, I. L. et al. Cytotoxicity and accumulation of Hg, Ag, Cd, Cu, Pb and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes In Vitro. **General Pharmacology**, v. 25, n. 8, p. 1621–1633, 1994.

STROES, E. Y. et al. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. **FEBS letters**, v. 438, n. 3, p. 161–164, 1998.

SUBRAMANYAM, G.; BHASKAR, M.; GOVINDAPPA, S. The role of cadmium in induction of atherosclerosis in rabbits. **Indian Heart J.**, v. 44, n. 3, p. 177–80., 1992.

SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 677–686, 2005.

SWEI, A. et al. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 30, n. 6, p. 1628–1633, dez. 1997.

SZUSTER-CIESIELSKA, A; LOKAJ, I.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. The influence of cadmium and zinc ions on the interferon and tumor necrosis factor production in bovine aorta endothelial cells. **Toxicology**, v. 145, n. 2–3, p. 135–145, 2000.

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, n. 1, p. 51–56, 2008.

TELLEZ-PLAZA, M. et al. Cadmium exposure and incident cardiovascular disease. **Epidemiology**, v. 24, n. 3, p. 421–9, 2013.

TEPPER, O. M. et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. **Circulation**, v. 106, n. 22, p. 2781–2786, 2002.

TINKOV, A. A. et al. Cadmium and atherosclerosis: A review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies. **Environmental Research**, v. 162, n. February, p. 240–260, 2018.

TOMERA, J. F. et al. Divalent cations in hypertension with implications to heart disease: calcium, cadmium interactions. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 97–107, mar. 1994.

TÜRKCAN, A. et al. Combination of cadmium and high cholesterol levels as a risk factor for heart fibrosis. **Toxicological Sciences**, v. 145, n. 2, p. 360–371, 2015.

TZOTZES, V. et al. Effects of acute and chronic cadmium administration on the vascular reactivity of rat aorta. **BioMetals**, v. 20, n. 1, p. 83–91, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiologica**, v. 196, n. 2, p. 193–222, 2009.

VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. Endothelium-dependent responses in hypertension. **Hypertension**, v. 18, n. 2, p. 87–98, 1995.

VASQUEZ, E. C. et al. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 22, 2012.

VICENTE-SÁNCHEZ, C. et al. Effect of the flavonoid quercetin on cadmium-induced hepatotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 2279–2287, 2008.

WALSKI, M. et al. Ultrastructural alterations of endothelium covering advanced atherosclerotic plaque in human carotid artery visualised by scanning electron microscope. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4 I, p. 713–723, 2002.

WANG, Y. et al. Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 278, n. 2, p. H428–H434, 2000.

WANG, Y.-J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells repair cadmium-induced rat testis injury by inhibiting mitochondrial apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 271, p. 39–47, 2017.

WEISSMAN, I. L.; SHIZURU, J. A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*, 112(9), 3543–3553. <http://.> **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3543–3553, 2008.

WHO. Air quality guidelines for Europe. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 3, n. 1, p. 23–23, 2000.

WICK, G. et al. The role of heat shock proteins in atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 11, n. 9, p. 516–529, 2014.

WOODS; J.M., LEONE; M., KLOSOWSKA; K., LAMAR; P.C., SHAKNOVSKY; T.J., P. W. C. Direct Antiangiogenic Actions of Cadmium on Human Vascular Endothelial Cells. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 3, p. 643–651, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Exposure to cadmium: a major public health concern. **Preventing Disease Through Healthy Environments**, p. 3–6, 2010.

XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **J Leukoc Biol**, v. 56, n. 5, p. 576–582, 1994.

XU, Q. et al. Clinical Investigation and Reports Serum Soluble Heat Shock Protein 60 Is Elevated in Subjects With Atherosclerosis in a General Population. **Circulation**, p. 14–20, 2000.

YOOPAN, N. et al. Attenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. **Toxicology Letters**, v. 176, p. 157–161, 2008.

ZANGAR, R. C.; DAVYDOV, D. R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 199, n. 3, p. 316–331, 2004.

ZHOU, Z. et al. Cadmium Exposure is Associated with the Prevalence of Dyslipidemia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 633–643, 2016.