

Exposição por 7 dias ao Cádmio promove aumento da pressão arterial e alteração da reatividade da aorta de ratos

**Karoline Alves Rossi**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas  
Fisiologia Cardiovascular

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

Vitória

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado**

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado da candidata **KAROLINE ALVES ROSSI**, intitulada "**EXPOSIÇÃO POR 7 DIAS AO CÁDMIO PROMOVE AUMENTO DE PRESSÃO ARTERIAL E ALTERAÇÃO DA REATIVIDADE DA AORTA DE RATOS**", decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, a candidata cumpriu todos os requisitos descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que a aluna faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 3 de junho de 2022.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alessandra Simão Padilha  
Universidade Federal do Espírito Santo (PPGCF/UFES) – Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvana dos Santos Meyrelles  
Universidade Federal do Espírito Santo (PPGCF/UFES) – Titular interno

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiana Dayse Magalhães Siman Meira  
(UFES/Alegre) – Titular externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
SILVANA DOS SANTOS MEYRELLES - SIAPE 2299966  
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS  
Em 06/06/2022 às 10:21

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/489559?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
FABIANA DAYSE MAGALHAES SIMAN MEIRA - SIAPE 2649037  
Departamento de Farmácia e Nutrição - DFN/CCENS  
Em 10/06/2022 às 13:44

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/493376?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
ALESSANDRA SIMAO PADILHA - SIAPE 2482917  
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS  
Em 10/06/2022 às 14:26

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/493431?tipoArquivo=O>

**Rossi, Karoline Alves 1993**

**Exposição por 7 dias ao Cádmio promove aumento da pressão arterial e alteração da reatividade da aorta de ratos [Vitória] 2022**

21, 94p., 29,7cm (UFES, M.SC., Ciências Fisiológicas, 2022)

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Simão Padilha

1. Cádmio 2. Estresse oxidativo 3. Pressão arterial 4. Disfunção vascular 5. Canais para potássio

*“A diferença entre quem sonha e quem realiza se chama autoenfrentamento. Não é aos outros que temos que superar, mas nossas próprias insignificâncias e mediocridades.”*

*(Autor desconhecido)*

À Deus e aos meus grandes motivadores: meus pais, irmãos e esposo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao dono de toda ciência, sabedoria e poder, Deus. Que se faz presente em cada passo e cada decisão tomada ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, que apesar da pouca escolaridade, me ensinam diariamente valores que dinheiro nenhum no mundo é capaz de comprar. Me encorajam a ser uma mulher forte e perseverante, e nunca deixaram de acreditar em mim.

Ao meu esposo, pelo carinho, dedicação, compreensão. E por todas as vezes que seu colo se fez abrigo nos meus momentos de angústia.

Aos meus irmãos que me motivam a ser o melhor exemplo para eles.

À professora Alessandra, por ter me acolhido como filha científica e por toda sabedoria e dedicação no desenvolvimento desse trabalho.

À Camila Almenara, pela paciência, disponibilidade e principalmente, pelo acolhimento.

Às minhas amigas de experimento, Rakel, Lorraine e Camila Loren, que tornam os dias intensos, e por vezes frustrantes, em algo divertido.

À grande amiga que a UFES me apresentou, companheira de risadas, conselhos e gordices, Suellen Cíntia.

A todos os colegas e professores do LEMC pelos ensinamentos compartilhados, que de alguma forma, contribuíram na construção desse trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) - CCS/UFES e ao Departamento de Química da UFES.

Às agências de fomento que financiaram este estudo: Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

E por último, mas não menos importante, agradeço a banca pela disponibilidade de avaliar este trabalho.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 CÁDMIO.....	21
1.2 ROTAS DE EXPOSIÇÃO.....	21
1.3 MECANISMOS DE ABSORÇÃO E TRANSPORTE DE CÁDMIO .....	24
1.4 AÇÕES DO CÁDMIO SOBRE OS DIFERENTES SISTEMAS .....	25
1.5 AÇÕES DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	26
1.6 TÔNUS VASCULAR .....	28
1.6.1 Características da artéria aorta.....	28
1.6.2 Tônus vascular e sua regulação .....	30
1.6.3 Vasoconstrição .....	30
1.6.4 Vasodilatação .....	32
1.6.5 Biodisponibilidade do óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio .....	35
1.7 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	37
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	39
2.1 OBJETIVO GERAL .....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	40
3.2 VERIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	41
3.3 DOSAGEM SANGUÍNEA DE CÁDMIO .....	41
3.4 OBTENÇÃO DA AORTA.....	41
3.4.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular.....	43
3.4.2 Avaliação do endotélio vascular .....	43
3.4.3 Protocolos experimentais.....	44
3.5 PROTOCOLOS DE FLUORESCÊNCIA .....	46

3.5.1	Quantificação “ <i>in situ</i> ” de óxido nítrico .....	46
3.5.2	Quantificação “ <i>in situ</i> ” de peróxido de hidrogênio .....	46
3.7	EXPRESSÃO PROTEICA.....	47
3.8	RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
4.1	PESO DOS ANIMAIS E GANHO PONDERAL.....	50
4.2	CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO NO SORO SANGUÍNEO .....	51
4.3	PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	51
4.4	REATIVIDADE VASCULAR .....	52
4.4.1	Contração do músculo liso vascular ao Cloreto de Potássio (KCl) .....	52
4.4.2	Reatividade à Fenilefrina de segmentos isolados de aorta.....	53
4.4.3	Relaxamento dependente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica .....	69
4.4.4	Relaxamento independente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica .....	70
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>74</b>
5.1	EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CURTO PRAZO AO CÁDMIO SOBRE O PESO DOS ANIMAIS E O GANHO PONDERAL.....	74
5.2	CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO NO SORO SANGUÍNEO .....	75
5.3	EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	75
5.4	EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR .....	76
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>83</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Peso corporal antes e após a exposição por 7 dias ao CdCl <sub>2</sub> .....	50
<b>Tabela 2:</b> Variação de ganho ponderal após a exposição por 7 dias ao CdCl <sub>2</sub> . ....	50
<b>Tabela 3:</b> Valores médios da Pressão Arterial Sistólica (PAS) dos animais dos grupos Controle e Cádmio antes e após 7 dias de exposição. ....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais rotas de exposição ao Cádmio e seus efeitos tóxicos nas diferentes partes do corpo.....	23
<b>Figura 2:</b> Representação das camadas que compõe a parede da artéria aorta.....	29
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de contração da célula muscular lisa vascular (CMLV) induzida pelo Cloreto de Potássio (KCl). .....	31
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de contração da célula muscular lisa vascular (CMLV) induzida induzido pela Fenilefrina. ....	32
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de relaxamento induzido pelo óxido nítrico no músculo liso vascular (MLV).. .....	34
<b>Figura 6:</b> Ilustração do principal sistema antioxidante responsável pela degradação de $O^{2-}$ e $H_2O_2$ em $H_2O + O_2$ .....	36
<b>Figura 7:</b> Representação do cronograma de experimentos realizados nos animais utilizados neste estudo.....	40
<b>Figura 8:</b> (A) Ilustração da artéria aorta. (B) Aorta torácica após a dissecação para remoção do tecido conectivo e adiposo perivascular. (C) Corte dos anéis em segmentos cilíndricos de 3-4 mm.....	42
<b>Figura 9:</b> Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems.....	43
<b>Figura 10:</b> Representação dos registros de reatividade vascular: A) Contração máxima do músculo liso vascular ao KCl (75 mM) e teste de integridade do endotélio. B) Curvas concentração-resposta à Fe, Ach e NPS. ....	45
<b>Figura 11:</b> Média da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de pletismografia de cauda em ratos dos grupos Controle e Cádmio, antes e após 7 dias de exposição. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA (duas vias). * $p < 0,05$ vs Controle, dia correspondente, † $p < 0,005$ vs Cádmio dia 0. ....	52
<b>Figura 12:</b> Avaliação da função muscular lisa dos segmentos de aorta ( $\Delta$ Contração ao KCL). Valores expressos em média e EPM; $p > 0,05$ , Teste t de Student não pareado.....	53
<b>Figura 13:</b> Curvas concentração-resposta a Fe em segmentos aórticos dos grupos Controle e Cádmio após 7 dias de exposição ao $ClCd_2$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias,	

pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs contração do Controle à mesma dose de Fenilefrina.....53

**Figura 14:** Curvas concentração-resposta à Fe de segmentos aórticos dos grupos: (A) Controle e após remoção do endotélio (E-); (B) Cádmio e após remoção do endotélio (E-); \*p < 0,05 vs Controle ou Cádmio por ANOVA duas vias com pós-teste de Bonferroni. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, p > 0,05. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.....54

**Figura 15:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não do L-NAME em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle vs L-NAME e (B) Cádmio vs L-NAME. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, p > 0,05. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.....56

**Figura 16:** Resultados da expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada (p-eNOS-ser1177) por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica em ratos dos grupos Controle e Cádmio. Valores expressos em média e EPM como relação entre a densidade das bandas da p-eNOS e das proteínas totais. Teste t não pareado: \*p < 0,05 vs Controle.....57

**Figura 17:** Detecção de NO “in situ” em secções de aorta. (A) Imagens representam os segmentos de aorta marcados com a sonda fluorescente DAF-2 no grupo Controle e Cádmio na presença e ausência de L-NAME. (B) Gráfico demonstrando a análise semi-quantitativa dos níveis de fluorescência. Dados expressos em média ± EPM da densidade de fluorescência. Análise comparativa realizada através de ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs Ct, Ct+L-NAME e Cd+L-NAME. ....58

**Figura 18:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não da SOD em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, p > 0,05. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ....59

**Figura 19:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de SOD+L-NAME em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. ANOVA duas vias pós-

teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs Controle ou Cádmiu. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, p > 0,05. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ....60

**Figura 20:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Catalase em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmiu. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs Cádmiu. ....61

**Figura 21:** Resultados da expressão proteica da Catalase, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica em ratos dos grupos Controle (n = 7) e Cádmiu (n = 6). Valores expressos em média e EPM como relação entre a densidade das bandas da Catalase e das proteínas totais. Teste t não pareado: \*p < 0,05 vs Controle. ....62

**Figura 22:** Detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> "in situ" em seções de aorta. (A) Imagens de fluorescência representam os segmentos na presença da sonda fluorescente DCF-DA no grupo Controle e Cádmiu na presença e ausência de Catalase. (B) Gráfico demonstrando a análise semi- quantitativa dos níveis de fluorescência. Dados expressos em média ± EPM da densidade de fluorescência. Análise comparativa realizada através de ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs Ct, Ct+Catalase e Cd+Catalase.....63

**Figura 23:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Alopurinol em segmentos aórticos dos grupos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmiu. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni. p > 0,05.....64

**Figura 24:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Apocinina em segmentos aórticos dos grupos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmiu. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni. p > 0,05.....65

**Figura 25:** Resultados da expressão proteica da subunidade gp91phox (NOX2) por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica em ratos dos grupos Controle (n = 7) e Cádmiu (n = 7). Valores expressos em média e EPM como relação entre a densidade das bandas da gp91<sup>phox</sup> e das proteínas totais. Teste t não pareado: \*p<0,05 vs Controle.....66

- Figura 26:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Losartan em segmentos aórticos dos grupos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni.  $p > 0,05$ . .....67
- Figura 27:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Indometacina em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs Controle. ....68
- Figura 28:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Verapamil em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ....69
- Figura 29:** Curvas concentração-resposta a Ach de segmentos aórticos dos grupos Controle e Cádmio após 7 dias de exposição ao CICd<sub>2</sub>. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs contração do Controle à mesma dose de Acetilcolina. ....70
- Figura 30:** Curvas concentração-resposta ao NPS de segmentos aórticos dos grupos Controle e Cádmio após 7 dias de exposição ao CICd<sub>2</sub>. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs contração do Controle à mesma dose de NPS. ....71
- Figura 31:** Curvas concentração-resposta ao NPS na presença ou não de Azul de Metileno em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.....72
- Figura 33:** Curvas concentração-resposta ao NPS em segmentos aórticos dos grupos Controle e Cádmio (A) Anéis pré-contraídos com Fe 1  $\mu$ M (B) Anéis pré-contraídos com KCl 60 mM. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está

representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs Controle a mesma dose de NPS. ....73

**Figura 34:** Resumo gráfico dos achados do presente estudo com sugestão de mecanismo através do qual a exposição aguda ao Cádmio leva à disfunção vascular. O Cádmio promove aumento da reatividade vascular de ratos Wistar machos expostos ao Cádmio durante 7 dias. A interação do Cádmio com a Catalase promove um aumento do estresse oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode agir de forma compensatória estimulando a eNOS a produzir óxido nítrico (NO), que por sua vez pode atuar reduzindo a atividade do NOX2 através da S-nitrosilação. Apesar do aumento da produção basal de NO, um possível comprometimento dos canais de K<sup>+</sup> na musculatura lisa vascular impede que o relaxamento ocorra plenamente. ....82

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

1,4,5 – inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>)

2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA)

4,5-diaminofluoresceína (DAF-2)

Acetilcolina (ACh)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPc)

Adenosina difosfato (ADP)

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)

Água (H<sub>2</sub>O)

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)

American Physiological Society (APS)

Angiotensina II (Ang II)

Ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

Ativador 1 da NADPH oxidase (NOXA1)

Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)

Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA)

Bomba sódio potássio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase)

Cadeia leve da miosina (MLC<sub>20</sub>)

Cádmio (Cd)

Canais de Ca<sup>2+</sup> ativados pelo estiramento (SAC)

Canais de Ca<sup>2+</sup> operados por estoque (SOC)

Canais de Ca<sup>2+</sup> operados por receptores (ROCs)

Canais de Ca<sup>2+</sup> operados por voltagem (VOCs)

Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem tipo L (VOCC)

Canais de Cálcio dependentes de voltagem (VDCC)

Canais de potássio dependentes de cálcio ( $\text{KCa}^{+2}$ )

Canais de potássio dependentes de cálcio de condutância intermediária ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ )

Canais de potássio dependentes de cálcio de pequena condutância ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ )

Canais de potássio retificantes ( $\text{Kir}$ )

Catalase (CAT)

Célula muscular lisa vascular (CMLV)

Ciclo-oxigenase (COX)

Ciclo-oxigenase 1 (COX1)

Ciclo-oxigenase 2 (COX2)

Cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ )

Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ )

Cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

Cloreto de polivinil (PVC)

Cloreto de potássio (KCl)

Cloreto de sódio (NaCl)

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA)

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)

Complexo Cádmio + Metalotioneína ( $\text{MT-Cd}^{2+}$ )

Complexo Cálcio + Calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}$  - CaM)

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)

Diacilglicerol (DAG)

Diferença das áreas abaixo da curva (dAUC)

Dinucleótido de flavina e adenina (FAD)

Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)

Doença Obstrutiva Pulmonar Crônica (DPOC)

Endotelina-1 (ET-1)

Erro padrão da média (EPM)

Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

Esclerose Múltipla (EM)

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)

Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Fenilefrina (Fe)

Fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP)

Fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Fosfolipase A2 (PLA2)

Fosfolipase C (PLC)

Glutathione peroxidase (GPx)

Guanilato ciclase solúvel (GCs)

Guanosina monofosfato cíclica (GMPc)

Guanosina trifosfato (GTP)

Íon Cádmio (Cd<sup>2+</sup>)

Íon potássio (K<sup>+</sup>)

Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada (p-eNOS<sup>ser1177</sup>)

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

Metalotioneína (MT)

Micromolar ( $\mu\text{M}$ )

Milimolar (mM)

Músculo liso vascular (MLV)

NADPH Oxidase (NOX)

NADPH Oxidase 1 (NOX1)

NADPH Oxidase 2 (NOX2)

NADPH Oxidase 3 (NOX3)

NADPH Oxidase 4 (NOX4)

NADPH Oxidase 5 (NOX5)

Nitroprussiato de sódio (NPS)

Óxido Nítrico (NO)

Óxido nítrico sintase (NOS)

Óxido Nítrico-sintase Endotelial (eNOS)

Oxigênio ( $\text{O}^2$ )

Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )

Potencial hidrogeniônico (pH)

Pressão arterial sistólica (PAS)

Prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ )

Prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ )

Prostaglandina F2 alfa ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ )

Prostaglandinas  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ )

Proteína quinase A (PKA)

Proteína quinase B (Akt)

Proteína quinase C (PKC)

Proteína quinase G (PKG)

Quinase de cadeia leve de miosina (MLCK)

Radical hidroxila (OH•)

Receptor de 1,4,5 – inositol trifosfato (IP3R)

Receptor muscarínico (M)

Retículo sarcoplasmático (RS)

Rotações por minuto (rpm)

Sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Superóxido dismutase (SOD)

Tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>)

Transportador de Metais Divalente 1 (DTM1)

Tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>)

World Health Organization (WHO)

Xantina oxidase (XO)

## RESUMO

Estudos demonstram que a exposição ao Cádmio está associada a alterações vasculares importantes, frequentemente relacionadas ao aumento da pressão arterial. Entretanto, não se sabe se os efeitos da exposição a baixa concentração, por curto período poderiam incluir disfunção vascular, e quais seriam os mecanismos envolvidos nesse processo. O objetivo deste estudo foi descrever os efeitos pressóricos e vasculares da exposição por 7 dias ao  $\text{ClCd}_2$  em ratos. Para isso, ratos Wistar receberam água potável (Ct) ou solução de  $\text{ClCd}_2$  100 mg/L (Cd) via água de beber por 7 dias. Foram analisados o peso, concentração plasmática de Cádmio, pressão arterial sistólica (PAS) e respostas de anéis de aorta a agentes vasoativos. Mesmo em baixa concentração plasmática ( $1,66 \pm 0,38 \mu\text{g/L}$ ), os animais expostos ao metal apresentaram aumento da PAS ( $141,5 \pm 3,0 \text{ mmHg}$  vs  $128,7 \pm 1,84 \text{ mmHg}$ ) e da resposta contrátil à Fenilefrina (Fe) em anéis de aorta isolados, quando comparados ao grupo Ct. A remoção do endotélio vascular e a inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS), através do L-NAME ( $100 \mu\text{M}$ ), aumentaram de maneira semelhante a contração dos anéis à Fenilefrina. Apesar disso, houve aumento da expressão proteica da peNOS<sup>Ser1177</sup> e da produção basal de óxido nítrico (NO) nos animais expostos. A remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  através da incubação de Catalase ( $1000 \text{ U/ml}^{-1}$ ) reduziu a resposta contrátil apenas no grupo Cd que, além disso, apresentou menor expressão da Catalase e aumento da produção basal de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em segmentos de aorta. Em anéis pré-contraídos com Fe ( $1 \mu\text{M}$ ), o grupo Cd apresentou redução no relaxamento dependente (ACh) e independente (NPS) do endotélio quando comparado ao grupo Ct. No entanto, em anéis pré-contraídos com KCl ( $60 \text{ mM}$ ) a resposta ao NPS foi similar entre os grupos. Juntos, os resultados indicam que 7 dias de exposição ao Cádmio levaram ao aumento da pressão arterial e da contração da aorta à Fe e redução do relaxamento. Esses efeitos vasculares parecem envolver a redução da defesa antioxidante da catalase contra o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com provável redução da ativação de canais para potássio, equilibrado por um aumento da atividade da eNOS.

**Palavras-chave:** Cádmio · Estresse oxidativo · Pressão arterial · Disfunção vascular · Canais para potássio

## ABSTRACT

Studies have shown that Cadmium exposure is associated with important vascular changes, often related to increased blood pressure. However, it is not known whether the effects of exposure to low concentrations for a short period could promote vascular dysfunction, and what are the mechanisms involved in this process. The aim of this study was to describe the pressoric and vascular effects of 7-day exposure to ClCd<sub>2</sub> in rats. For this, Wistar rats received drinking water (Ct) or 100 mg/L ClCd<sub>2</sub> solution (Cd) via drinking water for 7 days. Weight, plasma cadmium concentration, systolic blood pressure (SBP) and aortic ring responses to vasoactive agents were analyzed. Even at low plasma concentration ( $1.66 \pm 0.38 \mu\text{g/L}$ ), the animals exposed to the metal showed an increase in SBP ( $141.5 \pm 3.0$  vs  $128.7 \pm 1.84$  mmHg) and in the contractile response to Phenylephrine (Phe) in isolated aortic rings. Removal of vascular endothelium and inhibition of the enzyme nitric oxide synthase (NOS) through L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) similarly increased contraction to Phenylephrine. Despite this, there was an increase in the protein expression of p-eNOS Ser<sup>1177</sup> and in the basal production of nitric oxide (NO). Removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through Catalase incubation (1000 U/ml-1) reduced the contractile response only in the Cd group, which showed lower expression of Catalase and increased basal production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In Phe (1  $\mu\text{M}$ ) pre-contracted rings, Cd group showed a reduction in endothelium-dependent (ACh) and independent (SNP) relaxation when compared to Ct group. However, in KCl (60 mM) pre-contracted rings, the response to SNP was similar between groups. Together, the results demonstrate that 7 days of exposure to Cadmium lead to increased blood pressure and aortic contraction to Phe and reduced relaxation. These vascular effects seem to involve reduced Catalase antioxidant defense against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with probable reduced activation of potassium channels, balanced by an increase in eNOS activity.

**Keywords:** Cadmium · Oxidative stress · Blood pressure · Vascular damage · Potassium channels

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CÁDMIO

Os registros relacionados a descoberta do Cádmio descrevem acontecimentos no século XIX, em dois reinos diferentes da antiga Alemanha. Em 1817, no Reino da Prússia, o médico Johann Roloff encontrou irregularidades em um lote de óxido de zinco provenientes da fábrica de produtos farmacêuticos de Karl Hermann. Os testes realizados por Johann sugeriram que as amostras continham arsênico. Karl ficou preocupado com a imagem da sua empresa e decidiu investigar melhor, descobrindo que não se trata de arsênico, e sim outro metal.

No mesmo ano, no reino vizinho de Hanover, Friedrich Stromeyer, professor da Universidade de Göttingen, percebeu que ao aquecer carbonato de zinco surgia uma coloração amarelada, o qual ele posteriormente comprovou se tratar de um novo metal, o Cádmio (TARAKINA; VERBERCK, 2017).

O Cádmio está localizado no grupo 12 ou IIB da tabela periódica e é simbolizado pela sigla *Cd*. Apresenta peso molecular de 112,411 u e número atômico 48. Tem como principais características: maleabilidade, ductilidade, resistência mecânica, e coloração branco prateado (DUFFUS, 2002). Além de não possuir função biológica conhecida nos seres humanos, este metal é altamente tóxico, o que tem motivado sua substituição por outros compostos e tornado sua regulamentação cada vez mais rigorosa (TARAKINA; VERBERCK, 2017).

### 1.2 ROTAS DE EXPOSIÇÃO

O Cádmio é obtido da natureza através de fontes geogênicas, tais como a erosão e abrasão gradual de rochas, erupções vulcânicas e incêndios florestais. E antropogênicas, que derivam da fundição e refino de chumbo, cobre e zinco, combustão de combustíveis fósseis e do uso de fertilizantes fosfatados (FAROON, 2012). Ele também é utilizado na produção de cloreto de polivinil (PVC), pigmentos e baterias. Estimava-se que em 2000, na União Europeia, 73% do consumo de Cádmio

seria destinado para a produção de baterias níquel-cádmio (NORDIC COUNCIL OF MINISTERS, 2003).

Em função de sua alta toxicidade, foram estabelecidos alguns parâmetros de controle biológicos para exposição ocupacional ao Cádmio através da Norma Regulamentadora 7 (NR 7). Segundo esta, a dosagem de Cádmio na urina serve como indicador biológico e o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) é de 5 µg/g de creatinina, e pode ser colhido a qualquer momento desde que o trabalhador esteja trabalhando nas últimas semanas (NR 7, 2022).

Além da contaminação ocupacional, as indústrias também são responsáveis pela contaminação do solo e água de regiões vizinhas. Em geral, em águas não poluídas, a concentração de Cádmio é inferior a 1 µg/L (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009).

Durante séculos no Japão, eram extraídos metais das minas de Kamioka, na Prefeitura de Toyama. Lá os trabalhadores fundiam o zinco extraído da mina e despejavam a suspensão com Cádmio no chão. Isso fez com que o Cádmio chegasse aos lençóis freáticos e atingisse o rio Jintsu e seus afluentes, contaminando plantações de arroz à 50km de distância da usina. Apenas a partir de 1910, a população começou a relatar fortes dores articulares e musculares, provenientes de uma doença até então desconhecida e que posteriormente receberia o nome de Itai-Itai, caracterizada por osteomalácia, osteoporose, disfunção tubular renal e anemia. (BULMER, F. M. R.; ROTHWELL, H. E.; FRANKISH, 1938; HAGINO, N.; YOSHIOKA, 1960; NORDBERG et al. , 2007)

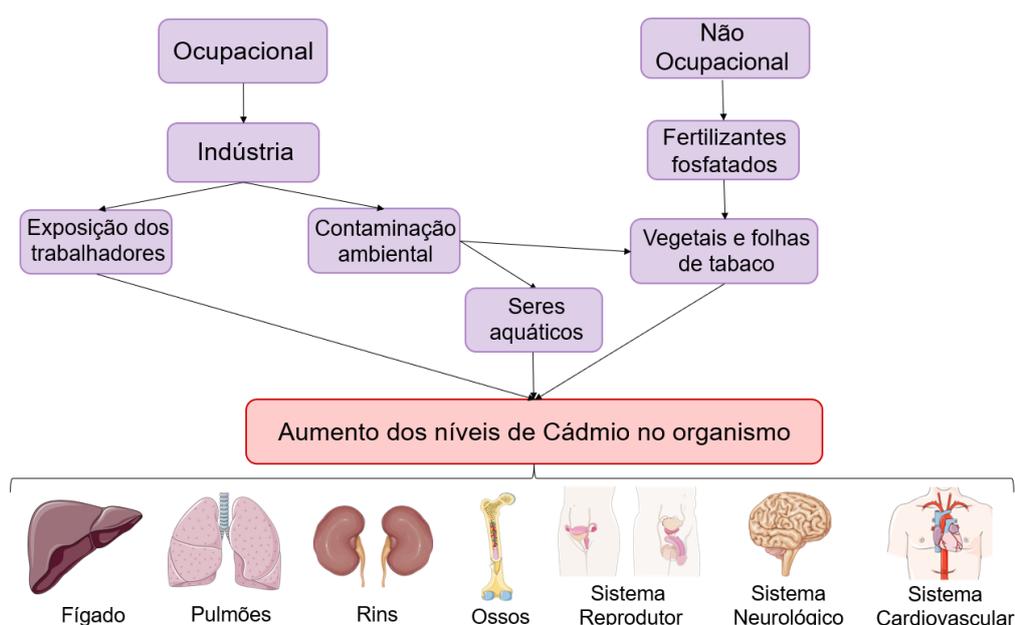
Apesar da água potável apresentar baixas concentrações de Cádmio, normalmente entre 0,01 e 1 µg/L, leitos contaminados podem aumentar esses níveis exponencialmente (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009).

Em 2015, o rompimento da barragem de Fundão em Mariana, Minas Gerais despejou mais 50 milhões de m<sup>3</sup> de rejeito de minério no Rio Doce, importante rio que abastece cidades do estado de Minas Gerais e do Espírito Santo. O fluxo de lama foi transportado por mais 650km até chegar ao Oceano Atlântico. Uma pesquisa recente revelou que o conteúdo de Cádmio e outros metais na água aumentou em níveis acima dos limites permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)

para materiais sedimentares (DUARTE et al., 2021). Dois anos após o desastre, peixes demersais comestíveis foram capturados do Rio Doce, em Linhares, e analisados. As concentrações de Cádmio e outros metais pesados no fígado e músculos estavam acima tanto das diretrizes brasileiras, quanto das internacionais para Limite Máximo de Resíduos em alimentos (GABRIEL et al., 2020).

Uma das fontes de exposição não-ocupacional ao Cádmio é a ingestão de alimentos contaminados. No ambiente aquático, os maiores acumuladores de Cádmio são crustáceos, cefalópodes, caranguejos, moluscos bivalves e ostras. (SATARUG, 2018). Ostras provenientes de áreas contaminadas da costa da Nova Zelândia apresentam concentrações de Cádmio duas vezes maiores do que ostras de áreas não contaminadas do Oceano Pacífico (COPES et al., 2008).

Além disso, vegetais enriquecidos com fertilizantes fosfatados se tornaram uma importante fonte de exposição ao metal. Alguns deles tendem a acumular altos níveis de Cádmio em suas folhas, como os vegetais folhosos, sementes oleaginosas e as folhas de tabaco (WHO, 1992), assim, a exposição ocorre tanto através da ingestão de alimentos contaminados, quanto pela inalação da fumaça do tabaco (SATARUG et al., 2003). Estima-se que a concentração sanguínea de Cádmio em fumantes seja de 1,58  $\mu\text{g/L}$ , em comparação com 0,38  $\mu\text{g/L}$  em não-fumantes. (FAROON, 2012).



**Figura 1:** Principais rotas de exposição ao Cádmio e seus efeitos tóxicos nas diferentes partes do corpo (Figura criada a partir do servidor Smart Servier, 2022).

### 1.3 MECANISMOS DE ABSORÇÃO E TRANSPORTE DE CÁDMIO

O Cádmio é absorvido principalmente pelo trato respiratório e em menor proporção pelo trato gastrointestinal. A absorção cutânea é relativamente rara. Ao entrar no corpo, ele é transportado pela corrente sanguínea através de eritrócitos e albumina e então se acumula nos rins, fígado e intestino (SATARUG, 2018; TINKOV et al., 2018)

Estima-se que cada cigarro contenha 1-2 µg de Cádmio, destes, cerca de 10% é inalado com uma taxa de absorção de 40-50% nos pulmões (TAHA et al., 2018). Pela via gastrointestinal a absorção fica em torno de 5% (WHO, 1992). Assim, na população fumante, os níveis de Cádmio sanguíneo aumentam em até três vezes, quando comparados à população não-fumante (ATSDR, 2008) e esse aumento tem sido associado a desordens cardiovasculares, como dano no endotélio vascular e hipertensão (AFRIDI et al., 2010).

O Cádmio utiliza o transportador de metais divalentes 1 (DMT1) como mecanismo de transporte, mesmo utilizado pelo ferro, zinco, magnésio e cálcio (KLASSEN et al., 2009). Após a sua absorção, ele circula pelo sangue ligado à metalotioneína (MT), através de quatro grupos tiol de cisteínas em uma ligação particularmente forte, formando um complexo, o MT-Cd<sup>2+</sup>, que funciona como um quelante do metal, impedindo seus efeitos deletérios sobre as células. No entanto, esse complexo, após ser filtrado e reabsorvido pelos túbulos proximais renais, tem essa ligação quebrada fazendo com que os íons Cd<sup>2+</sup> sejam liberados e promovam sua ação tóxica (FRIBERG et al., 2019).

O fígado é órgão alvo primário na toxicidade aguda ao Cádmio, enquanto que os rins são o alvo principal na toxicidade crônica. Acredita-se que na intoxicação crônica o Cádmio estimula a produção de mais MT e o efeito tóxico começa a surgir quando a quantidade de íons Cd<sup>2+</sup> excede a capacidade do quelante (SABOLIĆ et al., 2010).

Após sua absorção, o Cádmio pode permanecer no organismo por longos períodos, tendo sua meia vida estimada entre 15 à 30 anos em humanos (NIGRA et al., 2016). Apesar do grande acúmulo no fígado, é nos rins que está contido até 50% da carga corporal total desse metal (NORDBERG et al., 2007).

Em fumantes, observou-se um acúmulo progressivo deste metal na aorta (NORDBERG; KJELLSTRÖM, 1979). Inclusive, há evidências de que o Cádmio se acumula seletivamente na camada média dos vasos, formada por células musculares lisas, e que a quantidade do metal na aorta está intimamente relacionada com a quantidade de maços de cigarro fumados ao ano (ABU-HAYYEH et al., 2001). Além disso, a exposição ao Cádmio também parece promover efeitos deletérios sobre a camada íntima, formada pelo endotélio vascular, um importante modulador do tônus vascular (ALMENARA et al., 2013; MAJUMDER et al., 2008; YOOPAN et al., 2008).

Na prática clínica, a concentração de Cádmio na urina de 24 horas é um marcador para a exposição de longo prazo (crônica), devido à lenta excreção do Cádmio pela via urinária; enquanto a concentração sanguínea de Cádmio reflete a exposição mais recente (aguda), decorrente dos últimos meses (NORDBERG et al., 2007).

#### 1.4 AÇÕES DO CÁDMIO SOBRE OS DIFERENTES SISTEMAS

A exposição crônica ao Cádmio provoca diversas disfunções, incluindo anormalidade na atividade dos túbulos renais e pulmonar, osteomalácia, osteoporose e o surgimento de câncer em diversos tecidos (JACOBSON; TURNER, 1980).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a exposição ao Cádmio pode promover o desenvolvimento de doenças musculoesqueléticas, como: osteoporose, osteoartrite e artrite reumatóide (REYES-HINOJOSA et al., 2019). O Cádmio causa desmineralização óssea através de interação direta com células ósseas, inibição de proteinases C de procolágeno e da produção de colágeno. Assim, osteomalácia e osteoporose podem ser observados em envenenamentos graves (STAESSEN et al., 1999).

Nos rins, o acúmulo desse metal causa distúrbio na integridade funcional dos túbulos proximais, reduzindo assim a capacidade de reabsorver nutrientes, vitaminas e minerais, o que leva a proteinúria (BERNARD, 2004).

Trabalhadores expostos ao Cádmio também apresentaram disfunção olfatória e alterações neurocomportamentais na memória, atenção e velocidade psicomotora

(KIM et al., 2005). Além disso, doenças neurodegenerativas estão associadas a exposição ao metal, tais como: Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), Esclerose Múltipla (EM), Parkinson e Alzheimer (BRANCA; MORUCCI; PACINI, 2018).

Nos pulmões, a inalação de Cádmio pode provocar redução da capacidade vital e aumento da espessura da parede alveolar, favorecendo o surgimento de doenças pulmonares como Doença Obstrutiva Pulmonar Crônica (DPOC) e enfisema (LAMPE et al., 2008).

Quanto ao seu potencial carcinogênico, este ocorre pela capacidade do Cádmio de promover alterações na sinalização e diferenciação celular, proliferação celular e apoptose (WAALKES, 2003). Mesmo em baixas doses, a exposição ao Cádmio promove efeitos mutagênicos e teratogênicos, além de alterações na fertilidade masculina e feminina (KUMAR; SHARMA, 2019).

Em mulheres, a alteração na produção hormonal pode causar distúrbios no ciclo menstrual, dificuldade de engravidar ou manter uma gestação e redução do peso do bebê ao nascer (THOMPSON; BANNIGAN, 2008).

Todos esses efeitos deletérios do Cádmio sobre o organismo forçaram as autoridades sanitárias a adotar um limite de tolerância biológica de Cádmio no sangue, estabelecido em 5 µg/L pela American Conference Of Governmental Industrial Hygienists - ACGIH (2007).

## 1.5 AÇÕES DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

A exposição crônica ao Cádmio tem sido associada a disfunção cardíaca, aterosclerose e hipertensão (LIN; HAO; CHU, 2021). Estudos epidemiológicos relacionaram o aumento da concentração de Cádmio na urina com o aumento da incidência de doenças cardiovasculares e da mortalidade (TELLEZ-PLAZA et al., 2013).

Em 1919, pesquisadores observaram que ratos expostos agudamente ao Cádmio apresentavam coloração arroxeada nos testículos. (ALSBERG; SCHWARTZE, 1919). Mais tarde, outros pesquisadores observaram o mesmo fenômeno, e perceberam que era proveniente de uma hemorragia (HOEY, 1966; KAR;

DAS, 1960; PAŘÍZEK, 1956). Alguns anos depois, a causa dessa hemorragia foi identificada: o Cádmio causava quebra nas junções entre as células endoteliais de capilares e vênulas do testículo, provocando aumento da permeabilidade vascular, edema, hemorragia e necrose (AOKI; HOFFER, 1978; FENDE; NIEWENHUIS, 1977; SACERDOTE; CAVICCHIA, 1983)

Por revestirem a superfície luminal dos vasos, as células do endotélio vascular estão expostas a agentes tóxicos circulantes na corrente sanguínea. Os mecanismos envolvidos na toxicidade do Cádmio sobre o endotélio vascular estão relacionados ao aumento na expressão da NOX2, com concomitante aumento de espécies reativas de oxigênio e redução da biodisponibilidade de NO (ALMENARA et al., 2013) bem como com a redução da expressão da eNOS (KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014; YOOPAN et al., 2008) e do seu estado de fosforilação (MAJUMDER et al., 2008); e diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (VASSALLO et al., 2018).

A interrupção da integridade endotelial gerada pelo metal, promove formação de lacunas entre as células, o que permite que o Cádmio atinja a camada média dos vasos, onde ficam as células musculares lisas (PROZIALECK; EDWARDS; WOODS, 2006). No músculo liso vascular (MLV), a exposição ao Cádmio promove o crescimento, proliferação, remodelamento vascular e enrijecimento arterial (SANGARTIT et al., 2014), além de causar aumento na produção de matrizes extracelulares, especialmente glicosaminoglicanos (FUJIWARA; WATANABE; KAJI, 1998).

Essas alterações podem levar à diversas disfunções cardiovasculares, dentre elas, a hipertensão arterial, onde a pressão exercida pelo sangue para circular nas artérias do corpo aumenta. Atualmente, de acordo com European Society of Cardiology (ESC) e a European Society of Hypertension (ESH), o ideal, para todos os pacientes, incluindo aqueles com diabetes mellitus ou insuficiência renal, é que a pressão arterial seja < 140 mmHg para pressão sistólica, e < 90 mmHg para diastólica (WILLIAMS et al., 2018).

Além de induzir disfunção no endotélio e no MLV, a hipertensão arterial promovida pela exposição ao Cádmio também está associada ao dano no túbulo renal proximal, retenção de sal e consequente aumento do volume sanguíneo (SATARUG

et al., 2005), interação com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (BALARAMAN et al., 1989) e estímulo ao sistema nervoso simpático (FADLOUN; LEACH, 1980).

A principal via de entrada do Cádmio na célula é através de canais iônicos presentes nas células endoteliais, no músculo liso e nos fibroblastos. As propriedades químicas do Cádmio são muito semelhantes às do Cálcio, assim, o metal pode mimetizar a entrada de Cálcio por canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC), alterando a homeostase intracelular do  $\text{Ca}^{+2}$ . De fato, pesquisadores constataram que a absorção de Cádmio pode ser inibida por bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{+2}$ , (BLAZKA; SHAIKH, 1991).

Outros processos intracelulares que dependem do  $\text{Ca}^{+2}$  também são alterados com a interferência do Cádmio, como a produção de IP3, e ativação da PKC, proteína quinase envolvida na sensibilização da contração ao Cálcio (PROZIALECK et al., 2008).

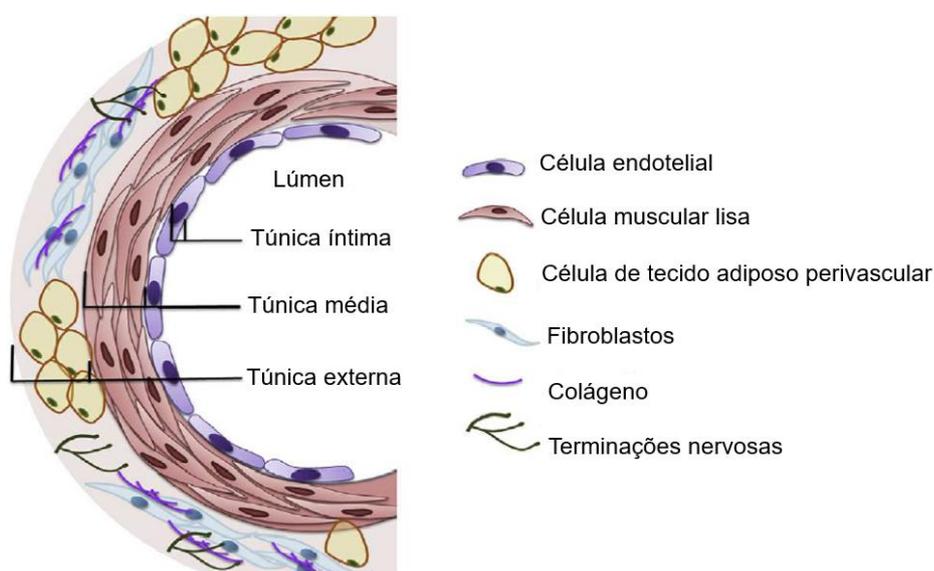
Diversos estudos tem demonstrado que as disfunções vasculares provocadas pela exposição ao Cádmio vão depender do tempo e do modelo de exposição (ALMENARA et al., 2013; BILGEN et al., 2003; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020 ; TZOTZES et al., 2007; DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010). Esses estudos demonstraram os efeitos de exposições consideradas de médio a longo prazo. Entretanto não existem na literatura estudos com curto tempo de exposição que possibilitem verificar os efeitos da exposição ao Cádmio sobre a pressão arterial e a função vascular a curto prazo.

## 1.6 TÔNUS VASCULAR

### 1.6.1 Características da artéria aorta

A artéria aorta é considerada uma artéria de condutância elástica, por ser rica em elastina na camada média. Sua proximidade com o coração torna essa característica muito importante, pois permite a acomodação de grandes mudanças de volume sanguíneo. Isso possibilita o amortecimento das oscilações do fluxo sanguíneo tornando o movimento mais homogêneo nos vasos distais (PUGSLEY; TABRIZCHI, 2000)

As paredes da artéria aorta são formadas por três camadas: a túnica íntima, mais interna, composta por uma única camada de células endoteliais e sustentada por uma membrana basal. A túnica média, composta principalmente por elastina e fibras elásticas, com células musculares lisas intercaladas e fibras de colágeno. E a túnica adventícia, composta principalmente por miofibroblastos e fibroblastos, encarregados pela síntese da matriz extracelular fibroelástica, característica da adventícia. A aorta possui ainda componentes responsáveis por nutrir e inervar sua parede, são eles: *vasa vasorum*, *nervi vasorum* e vasos linfáticos, Fig. 2 (MUNJAL; BORDONI, 2021).



**Figura 2:** Representação das camadas que compõe a parede da artéria aorta (modificado de ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

Selecionamos a artéria aorta como objeto de estudo levando em consideração o seu papel fisiológico e as evidências de que a exposição ao Cádmio promove acúmulo deste metal na camada média da aorta com uma proporção diretamente relacionada a quantidade de maços de cigarro fumados ao ano (ABU-HAYYEH et al., 2001). Além de observações em estudos anteriores que demonstraram alterações na reatividade aórtica em animais expostos ao Cádmio em diferentes concentrações e tempos de exposição. (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020; TZOTZES et al., 2007).

O estresse oxidativo induzido pelo Cádmio pode provocar peroxidação lipídica e promover a formação de aterosclerose, e um dos principais locais afetados é a artéria aorta (MANCA et al., 1994; MEIJER et al.1996).

### **1.6.2 Tônus vascular e sua regulação**

Em homeostase, o tônus vascular é equilibrado por estímulos vasodilatadores e vasoconstrictores que adaptam fluxo e pressão sanguínea às condições necessárias naquele momento. Esses estímulos são provenientes de neurotransmissores, hormônios, variações de pressão sanguínea e fatores derivados do endotélio (JACKSON, 2000; RAMESHRAD et al., 2016; STURTZEL, 2017)

### **1.6.3 Vasoconstrição**

A modulação mediada pelo endotélio vascular ocorre através da produção de substâncias vasoativas que desencadeiam diversas vias que irão promover relaxamento ou contração do músculo liso vascular. Dentre as substâncias vasoconstritoras estão: a Endotelina-1 (ET-1) (YANAGISAWA et al., 1988), a Angiotensina II (SKEGGS et al., 1954), o ânion superóxido (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986) e produtos derivados do ácido araquidônico como Prostaglandinas  $H_2$  (PGH<sub>2</sub>) e  $F_{2\alpha}$  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) e o Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (FRÖLICH; FÖRSTERMANN, 1989).

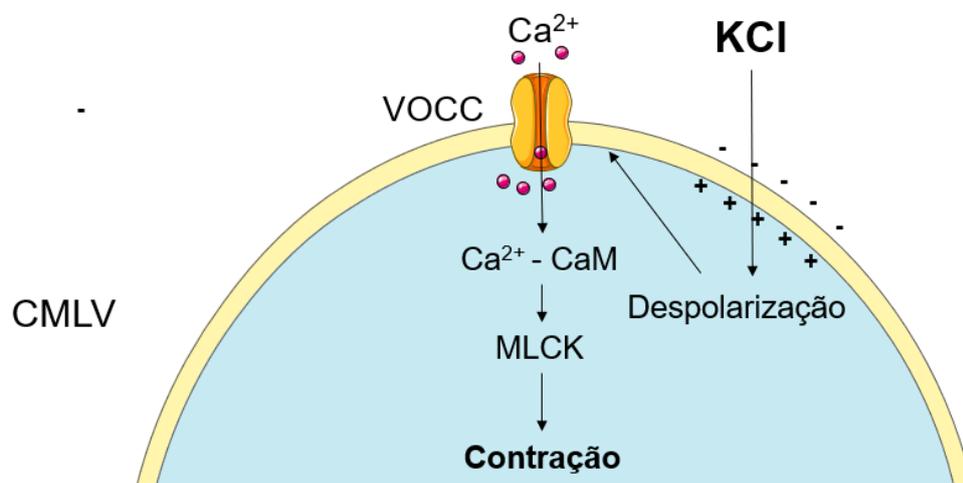
Na célula muscular lisa vascular (CMLV), a contração depende do aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico, que ocorre através do influxo deste íon por meio de canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem (VOCs), por receptores (ROCs), por estoque (SOC) ou ativados pelo estiramento (SAC), e também pela liberação de  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático). (BLAUSTEIN; HAMLYN, 2010; GHOSH et al., 2017; KIM et al., 2008)

O  $Ca^{2+}$  então se liga a Calmodulina formando o complexo  $Ca^{2+}$  - CaM que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), responsável por fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC<sub>20</sub>), o que permite que a cabeça da miosina se ligue ao filamento de actina e promova a contração (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). Essa contração

pode ser mediada por acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico (LAMOUNIER-ZEPTEP; BALTAS; MORANO, 2003).

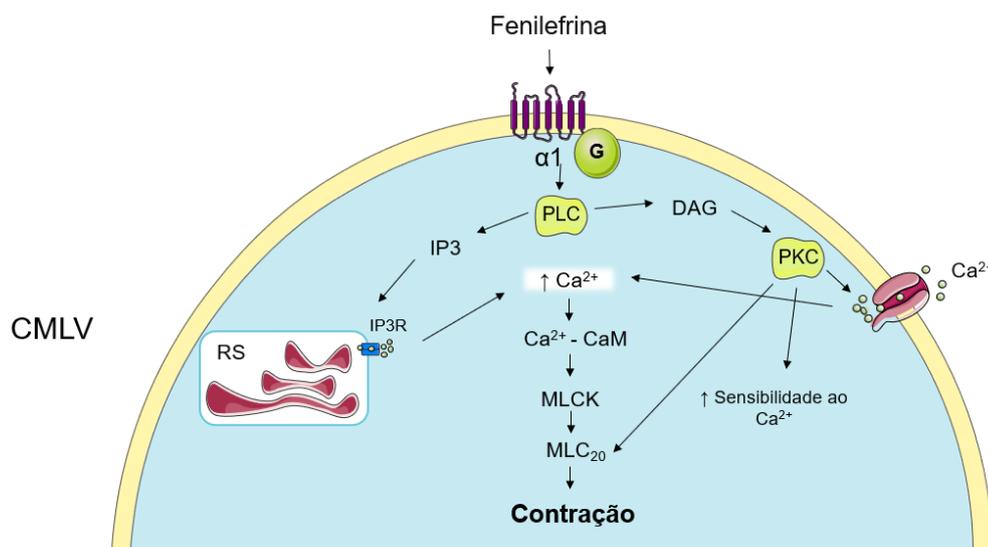
Um exemplo de acoplamento eletromecânico é a contração promovida pelo KCl através da despolarização da membrana, onde o aumento da concentração de  $K^+$  extracelular, promove influxo de  $Ca^{2+}$  para dentro da CMLV através da abertura de canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem tipo L (VOCC). O KCl também age como sensibilizador de cálcio na contração do músculo liso (Fig. 3) (RATZ et al., 2005).

Por outro lado, a contração à Fenilefrina é um exemplo de acoplamento farmacomecânico. Esta se liga ao receptor  $\alpha 1$ -adrenérgico acoplado a uma proteína G que ativa a Fosfolipase C (PLC), que por sua vez estimula a síntese de IP3 e DAG. O IP3 age nos receptores IP3R no retículo sarcoplasmático promovendo a liberação de  $Ca^{+2}$  intracelular. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que promove a abertura de canais de  $Ca^{+2}$  na membrana, aumenta a sensibilidade das proteínas contráteis ao



**Figura 3:** Mecanismo de contração da célula muscular lisa vascular (CMLV) induzida pelo Cloreto de Potássio (KCl) (Figura criada a partir do servidor Smart Servier, 2022).

$Ca^{+2}$  e fosforila a cadeia leve da miosina ( $MLC_{20}$ ). Além disso, o aumento do  $Ca^{+2}$  intracelular ativa a quinase de cadeia leve da miosina (MLCK) promovendo contração do MLV. Outros exemplos de agonistas contráteis são a norepinefrina, endotelina, angiotensina II e a serotonina (Fig. 4) (BÁRÁNY, 1996; FUKATA et al., 2001).



**Figura 4:** Mecanismo de contração da célula muscular lisa vascular (CMLV) induzida pela Fenilefrina (Figura criada a partir do servidor Smart Servier, 2022).

#### 1.6.4 Vasodilatação

As substâncias vasodilatadoras produzidas no endotélio são: o óxido nítrico (NO), o Fator Hiperpolarizante derivado do Endotélio (EDHF) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) e a Prostaciclina (MONCADA et al., 1977). Sendo NO mais significativo em artérias de grande calibre, como a aorta, do que em artérias de resistência (BOHLEN, 2015).

A produção dessas substâncias vasodilatadoras pela célula endotelial pode ocorrer por estímulos físicos (estiramento, *shear stress*) ou químicos (acetilcolina, bradicinina, histamina, adenosina difosfato (ADP), entre outras) (MATLUNG; BAKKER; VANBAVEL, 2009).

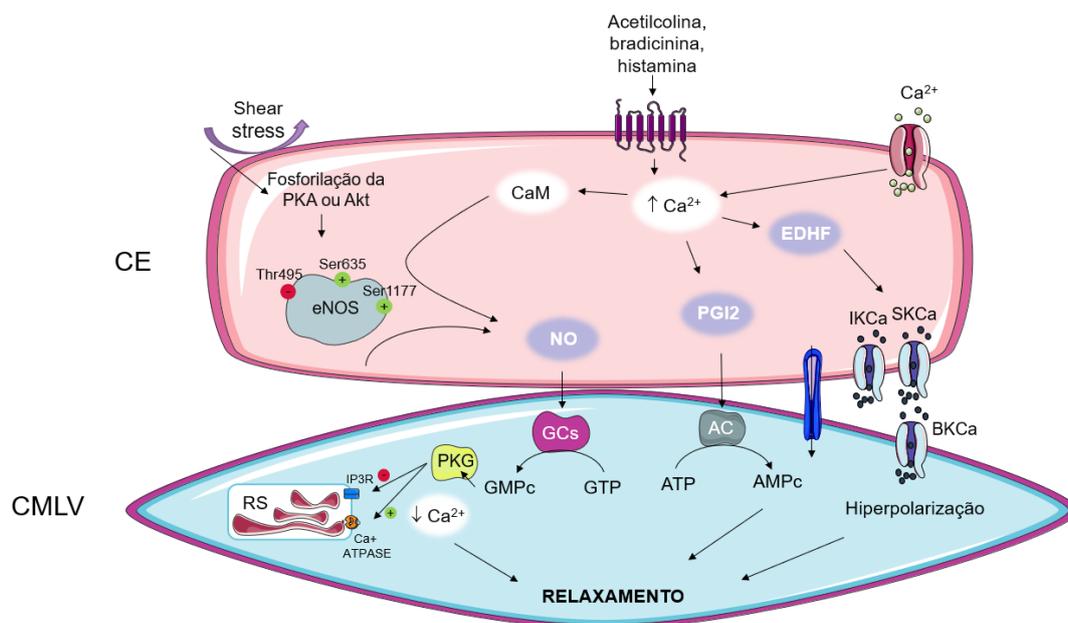
A indução do relaxamento à Acetilcolina (ACh) ocorre através do estímulo ao receptor muscarínico (M) acoplado à uma proteína G na célula endotelial, que ativa a Fosfolipase C (PLC). Esta tem como mensageiro secundário o trifosfato de inositol (IP3). O IP3 promove abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup> no retículo endoplasmático, o que aumenta a concentração de Ca<sup>2+</sup> no citosol. O Ca<sup>2+</sup> forma um complexo com a Calmodulina (Ca<sup>2+</sup>-CaM), que regula positivamente a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção de NO e L-Citrulina a partir de O<sup>2</sup> e L-

arginina. O NO produzido é facilmente difundido para o MLV, promovendo vasodilatação (Fig. 5) (SAHRAWAT; CHATTERJEE, 2016).

Além disso, a Acetilcolina também estimula a produção de EDHF's e Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Esta última é um prostanóide derivado da via da Ciclo-oxigenase (COX). Nesse caso, fosfolipídeos de membrana sofrem ação da fosfolipase A2 (PLA2) e liberam ácido aracdônico, este sofre ação da enzima ciclooxigenase (COX) ou da peroxidase e forma prostaglandina H2 (PGH2) que ao sofrer isomerização ou redução, produz protanóides vasoconstritores como tramboxano (TxA<sub>2</sub>) e outras PG's e vasodilatadores, como é o caso da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), (DAVIDGE, 2001).

A COX possui duas isoformas: a COX-1, constitutiva e expressada em condições basais e a COX-2, induzível por citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, e geralmente expressa em processos inflamatórios (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Normalmente existe um equilíbrio entre a produção de vasodilatadores e vasoconstritores derivados da COX, entretanto, disfunções vasculares podem provocar um desbalanço nessa via.

A vasodilatação induzida pela prostaciclina ocorre por meio da ativação de receptores G na membrana celular do MLV, aumentando a concentração de AMPc no citosol que por sua vez ativa a PKA, que impede a interação entre a actina e a miosina (KONUKOGLU; UZUN, 2016). Enquanto que a vasodilatação induzida pelos EDHFs ocorre através da abertura de canais de potássio dependentes de Ca<sup>+2</sup> de baixa e intermediária condutância (SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub>) presentes no endotélio que promovem hiperpolarização da célula endotelial, esta é difundida para o MLV através de junções mioendoteliais. Além disso, o efluxo de K<sup>+</sup> ativa a Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> ATPase e canais de potássio retificantes (Kir), hiperpolarizando a célula muscular lisa e promovendo vasodilatação (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009).



**Figura 5:** Mecanismo de relaxamento induzido pelo óxido nítrico no músculo liso vascular (MLV) (Figura criada a partir do servidor Smart Servier, 2022).

A vasodilatação produzida pelo óxido nítrico ocorre através da estimulação da guanilato ciclase solúvel (GCs) que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc), este último ativa a proteína quinase G (PKG) que promove: recaptura do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático (RS) através da SERCA ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPASE), impede o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) e pelos receptores IP3R no retículo, e promove a remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  através da abertura de canais de potássio dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{KCa}^{2+}$ ). Com a redução de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, reduz-se também o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, o que impede a MLCK de fosforilar a miosina. A redução do cálcio citosólico também ativa a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), inibindo a interação da miosina com a actina e provocando relaxamento (Fig. 5).

Além disso, na presença de um receptor de elétrons, o NO reage com tióis de cisteína e forma proteínas S-nitrosiladas, essa reação ocorre apenas em algumas proteínas e também desempenha um papel na regulação do tônus vascular (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015)

O estresse de cisalhamento (shear stress) também pode estimular a eNOS através da indução das vias da proteína quinase A (PKA) e B (Akt), que promovem

fosforilação dos sítios de ativação da enzima (Ser1177 e Ser635) e inibição da fosforilação de seu sítio inibitório (Thr495) (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

A proteína quinase C (PKC) é responsável pela fosforilação do resíduo Thr495, que promove inibição da atividade da eNOS. Estudos sugerem que o estresse de cisalhamento reduz a atividade da PKC (KUMAR et al., 2010)

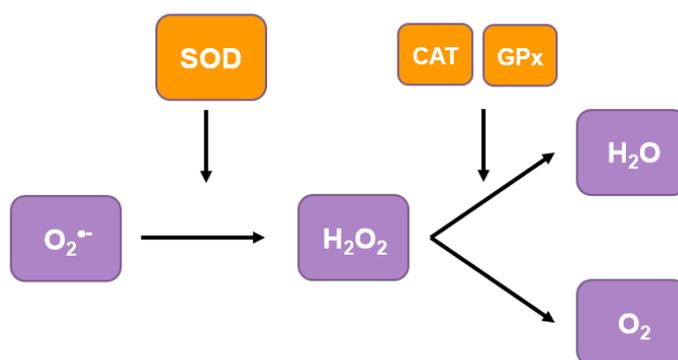
### **1.6.5 Biodisponibilidade do óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio**

A biodisponibilidade do NO pode ser atribuída à redução na sua produção ou em sua maior degradação. Sabe-se que a interação dessa molécula com ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) provoca a formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que promove degradação oxidativa do cofator BH4 (tetrahydrobiopterina) da NOS tornando-a desacoplada, o que induz a produção de mais espécies reativas de oxigênio (EROs) (MILSTIEN; KATUSIC, 1999). Além disso o  $H_2O_2$  pode reagir com metais de transição, através de reação de Fenton, e formar radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (KAJARABILLE; LATUNDE-DADA, 2019).

Em condições normais, baixos níveis de EROs estão presentes nas células e desempenham funções na ativação de vias de sinalização celular. Normalmente o equilíbrio entre a formação de EROs e sua degradação pelo sistema antioxidante são suficientes para a manutenção do equilíbrio oxidativo.

As principais defesas enzimáticas envolvidas nesse processo são a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). A SOD é responsável por degradar  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , e a GPx e a CAT catalisam a transformação de  $H_2O_2$  em  $H_2O + O_2$  (Fig.6) (HE et al., 2017).

Os principais responsáveis pela formação de EROs nos vasos são a respiração celular, processos metabólicos e algumas enzimas, tais como, a xantina oxidase, óxido nítrico sintase, citocromos p450 e a principal delas, a NADPH oxidase (NOX), que catalisa a produção de  $O_2^{\bullet-}$  após a redução de  $O_2$  usando NADPH como doador de elétrons (BRIEGER et al., 2012).



**Figura 6:** Ilustração do principal sistema antioxidante responsável pela degradação de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  em  $H_2O + O_2$  (Figura criada a partir do servidor Smart Servier, 2022).

Existem sete isoformas diferentes da NADPH oxidase presentes em mamíferos, apenas algumas delas são expressas no sistema cardiovascular. Nos vasos, são expressas nas células endoteliais (NOX-1, NOX-2, NOX-4 e NOX-5), nas células do músculo liso vascular (NOX-1, NOX-4 e NOX-5) e nas células adventícias (NOX-2 e NOX-4) (GARCÍA-REDONDO et al., 2016). Quanto à produção de ERO's, as NOX-1, 2 e 4 produzem  $O_2^{\bullet-}$ , enquanto a NOX-4 produz principalmente  $H_2O_2$ .

O núcleo catalítico das NOX's é formado por seis domínios transmembrana e um domínio citosólico C-terminal que possui locais de ligação de NADPH e cofator FAD. A atividade das NOX-1, 2 e 3 dependem de subunidades organizadoras (p47phox ou NOX01), estabilizadoras (p22phox) e ativadoras (p67phox ou NOXA1), além de uma proteína com afinidade à GTP (Rac1 ou Rac2). Além disso, a NOX2 também possui a subunidade reguladora p40phox. E no caso dessa isoforma específica, a subunidade gp91phox representa o núcleo catalítico da enzima e está diretamente envolvida no transporte de elétrons.

A NOX4 é composta apenas pela sua unidade catalítica e uma subunidade estabilizadora (p22phox), e sua atividade não depende de subunidades citosólicas, como também é o caso da NOX5, essa última dependente da ligação com cálcio intracelular (BUVELOT; JAQUET; KRAUSE, 2019).

Todos as estruturas e mecanismos elucidados até aqui participam do processo de regulação da reatividade vascular. E são de grande importância para a compreensão das análises realizadas neste estudo.

## 1.7 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Diversos estudos realizados com exposição ao Cádmio já demonstraram suas repercussões negativas sobre a função vascular e a pressão arterial (ALMENARA et al., 2013; BILGEN et al., 2003; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014; SANGARTIT et al., 2014; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020; SOMPAMIT et al., 2010; YOOPAN et al., 2006). De acordo com esses estudos, exposições a longo prazo levam ao aumento da pressão arterial.

É sabido que a hipertensão arterial afeta tanto as artérias elásticas quanto as musculares, provocando alterações a nível molecular e celular que desregulam a função e estrutura vascular (TOUYZ, 2000). Além disso, essas alterações estão associadas à formação de aterosclerose (LI & CHEN, 2000).

Quanto à hipertensão promovida pela exposição ao Cádmio, dentre os mecanismos propostos, estão: a ativação simpática (FADLOUN; LEACH, 1980) e a disfunção endotelial, com aumento do estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO (ALMENARA et al., 2013; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020), indicando a importância dos vasos sanguíneos como alvos da ação deletéria do Cádmio. Esses efeitos se tornam preocupantes, especialmente em um contexto de exposição ocupacional ou em tabagistas, visto que o Cádmio pode permanecer no organismo por longos períodos, tendo sua meia vida estimada entre 15 à 30 anos (NIGRA et al., 2016).

Apesar do grande volume de estudos sobre as implicações do Cádmio nos vasos sanguíneos, esses se limitam a efeitos à longo prazo e pouco se sabe sobre os impactos desse metal que podem surgir mais precocemente. De fato, um estudo anterior do nosso laboratório identificou que em apenas 7 dias de exposição ao Cádmio já foi possível observar aumento da pressão arterial em ratos (ALMENARA et al., 2013). No entanto, a função vascular não foi avaliada neste cenário. Assim, a literatura carece de estudos que determinem os efeitos iniciais da exposição ao Cádmio na função vascular, questão importante tanto do ponto de vista fisiopatológico, afim de esclarecer a progressão das vasculopatias induzidas pelo metal, como também do ponto de vista clínico, para sugerir terapias que visem a redução do dano em exposições por curtos períodos. Diante disso, o objetivo desse estudo foi

determinar os efeitos precoces (7 dias) da exposição ao CdCl<sub>2</sub> sobre a pressão arterial e função vascular de ratos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos da exposição por 7 dias ao Cloreto de Cádmio (ClCd<sub>2</sub>) sobre a pressão arterial e reatividade vascular da aorta de ratos machos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a concentração plasmática de Cádmio atingida após o período de 7 dias de exposição;
- Avaliar se a exposição aguda ao ClCd<sub>2</sub> altera a pressão arterial sistólica de ratos;
- Descrever os efeitos da exposição aguda ao ClCd<sub>2</sub> sobre a função contrátil e relaxante da aorta de ratos e as vias de agentes vasoativos envolvidas;

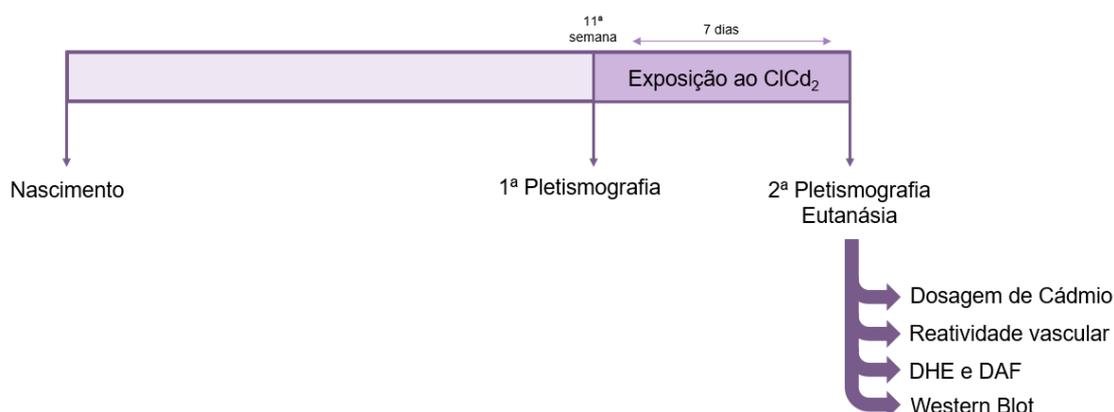
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Utilizamos neste estudo ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com idade aproximada de 12 semanas (250 e 350 g). Esses animais foram fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Tais animais foram mantidos em gaiolas (quatro indivíduos por gaiola) sob condições controladas de temperatura (23°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração padrão para roedores.

O manejo dos animais foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES - CEUA 09/2020).

Os ratos foram inicialmente divididos em dois grupos: Controle (Ct) e Cádmio (Cd). O grupo Cd foi exposto ao Cloreto de Cádmio (100 ppm) através da água de beber por 7 dias, enquanto o grupo Ct bebeu água potável sem o acréscimo da substância.



**Figura 7:** Representação do cronograma de experimentos realizados nos animais utilizados neste estudo (Figura criada a partir do servidor Smart Servier, 2022).

Antes e após os 7 dias de exposição, a pressão arterial sistólica foi aferida. Após a última aferição de pressão, os animais foram anestesiados com quetamina (50mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) administrada por via intraperitoneal, o sangue foi

coletado e os animais foram eutanasiados. As artérias aorta foram então coletadas para avaliação da reatividade vascular e amostras de sangue e tecido foram armazenadas para análises posteriores, conforme a Figura 7.

### 3.2 VERIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada pelo método de pletismografia de cauda modificado, descrito por Plehm et al. (2006). As medidas foram realizadas nos animais dos grupos Ct e Cd antes e após os 7 dias de exposição ao metal, através de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science, Inc.). Os animais foram previamente aclimatados para se adaptarem às condições de medida do pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. Foram coletadas três medidas de pressão para cada animal, antes e após o tratamento, e o valor referente à pressão sistólica do animal foi calculado como média aritmética dessas três medidas.

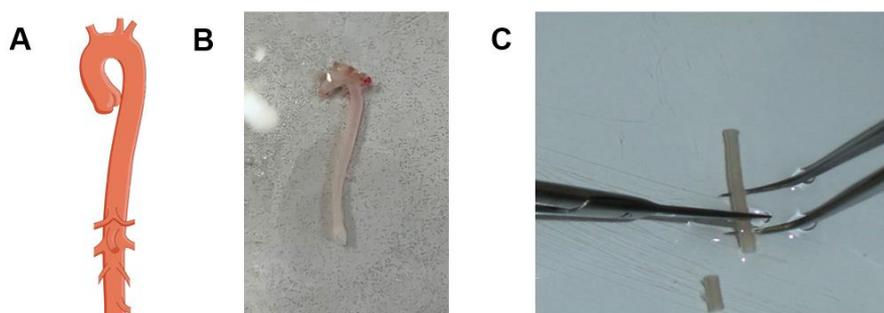
### 3.3 DOSAGEM SANGUÍNEA DE CÁDMIO

O sangue de animais de ambos os grupos foi coletado através de punção na artéria aorta abdominal. Essas amostras foram armazenadas em tubos heparinizados e posteriormente centrifugadas a 6000 rpm, 4°C durante 20 minutos para obtenção do soro plasmático que foi armazenado a -80°C para posterior dosagem. A determinação dos níveis Cádmio no soro foi realizada através de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Nexlon 300-D, Perkin Elmer, Germany) (da Costa et al., 2021) com limite de detecção de Cádmio 0,20 µg/L, no Centro de Ciências Exatas – Departamento de Química (Universidade Federal do Espírito Santo).

### 3.4 OBTENÇÃO DA AORTA

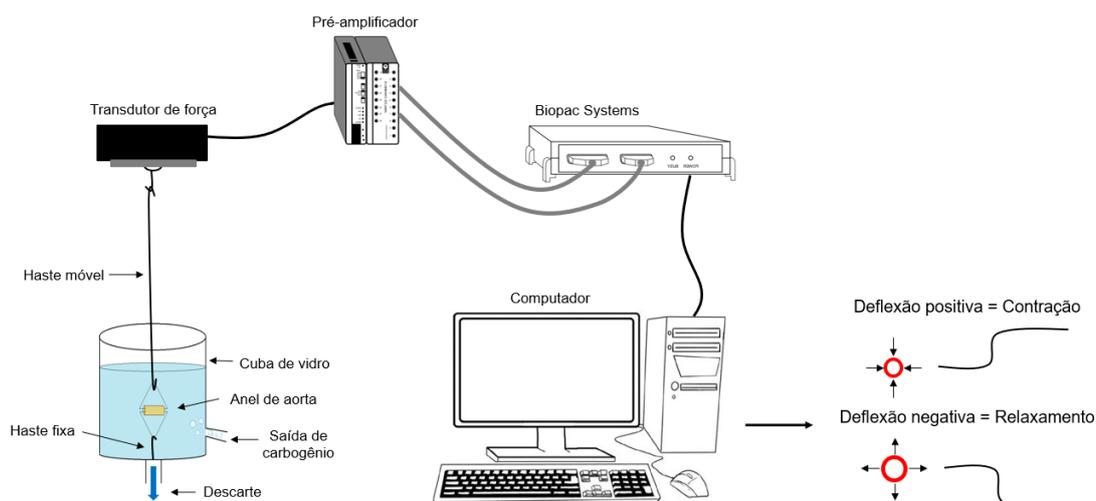
Imediatamente após a remoção, a aorta torácica descendente foi imersa em solução de Krebs-Henseleit, composta por (mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5;

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17; NaHCO<sub>3</sub> 24; Glicose 11; EDTA 0,01. A aorta foi então dissecada de tecido conectivo e adiposo e dividida em seis anéis de aproximadamente 3 a 4 mm, resultando em 6 anéis por animal. Alguns desses anéis tiveram seu endotélio removido mecanicamente através da fricção do lúmen com uma haste metálica.



**Figura 8:** (A) Ilustração da artéria aorta. (B) Aorta torácica após a dissecção para remoção do tecido conectivo e adiposo perivascular. (C) Corte dos anéis em segmentos cilíndricos de 3-4 mm (Ilustração criada a partir do servidor Smart Servier, 2022).

Os anéis foram colocados em cubas individuais, contendo 5ml de Krebs-Henseleit aquecida a  $36\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e continuamente aerada com mistura carbogênica composta por 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>, mantendo o pH estável em 7.4. Dois triângulos de aço inoxidável foram passados no lúmen dos anéis de forma que ficassem paralelos à luz do vaso. Um fio foi fixado na parte inferior da cuba, na parede do banho. Enquanto o outro foi conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica (TSD125C, CA, USA) que por sua vez era conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA - USA), e este à um computador (Figura 9).



**Figura 9:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular "in vitro". Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems*.

Uma vez montados no aparato, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de aproximadamente 1 g, que era reajustada quando necessário, durante o período de 45 minutos de estabilização.

### 3.4.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular

Depois de estabilizados, os anéis foram incubados duas vezes com 75 mM de cloreto de potássio (KCl), primeiro até que sua tensão fosse dobrada, afim de verificar a integridade funcional do músculo liso vascular. Em seguida os anéis foram lavados com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso. Então, foi realizada uma segunda incubação com KCl, dessa vez por 30 minutos, para verificar a tensão máxima desenvolvida pelo anel.

### 3.4.2 Avaliação do endotélio vascular

Após avaliar a integridade funcional do músculo liso vascular, os anéis foram lavados trocando-se a solução de Krebs na cuba 3 vezes e esperado tempo de estabilização da tensão. Em seguida, foi testada a integridade funcional do endotélio

através da avaliação da vasodilatação em resposta à Acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$  M após pré-contracção com Fenilefrina (Fe)  $10^{-6}$  M. Em alguns anéis, o endotélio foi removido mecanicamente, o que foi comprovado pelo relaxamento máximo de 10%. Como é sabido, a exposição ao Cádmio pode afetar a função endotelial e alterar o relaxamento a Acetilcolina, assim, não descartamos os anéis dos animais expostos que não atingiram valores similares aos animais do grupo controle (~90%).

### 3.4.3 Protocolos experimentais

#### 3.4.3.1 Efeito da exposição ao Cloreto de Cádmio por 7 dias na resposta vasoconstritora à Fenilefrina

Após o teste do endotélio, os anéis foram lavados e estabilizados novamente. Em seguida, segmentos com endotélio preservado foram expostos aos seguintes fármacos: L-NAME  $100\mu\text{M}$  (inibidor não seletivo da oxido nítrico sintase), SOD  $150\text{ U.MI}^{-1}$  (“scavenger” do ânion superóxido –  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Catalase  $1000\text{ U/ml}$  (“scavenger” do peróxido de hidrogênio –  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Apocinina  $30\ \mu\text{M}$  (inibidor da NADPH oxidase), Losartan  $10\ \mu\text{M}$  (antagonista de receptor AT1), Alopurinol  $100\ \mu\text{M}$  (inibidor da Xantina Oxidase), Indometacina  $10\ \mu\text{M}$  (inibidor não específico da ciclooxigenase) e Verapamil  $1\ \mu\text{M}$  (bloqueador de canais de cálcio). Um dos anéis obtidos de cada animal não foi incubado com qualquer fármaco, de modo a servir como controle à resposta obtida pelos anéis incubados com os fármacos acima mencionados. Alguns anéis tiveram seu endotélio removido para avaliar os efeitos da exposição ao  $\text{ClCd}_2$  sobre a modulação endotelial.

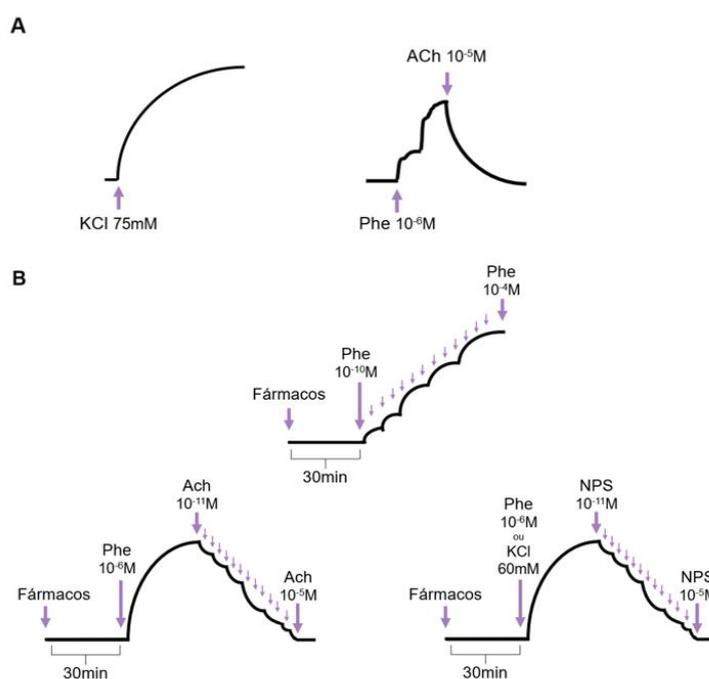
Trinta minutos após as incubações, foi realizada uma curva concentração-resposta ao agonista alfa-adrenérgico Fenilefrina (Fe -  $10^{-10}$  a  $10^{-4}$  M) de maneira cumulativa, com o objetivo de investigar o efeito da exposição ao  $\text{ClCd}_2$  sobre a resposta vasoconstritora à Fenilefrina.

#### 3.4.3.2 Efeito da exposição ao Cloreto de Cádmio por 7 dias na resposta vasodilatadora dependente do endotélio

A função endotelial foi avaliada através da curva de concentração-resposta à ACh, um agonista muscarínico. Para esse protocolo experimental, anéis de aorta com endotélio preservado foram pré-contraídos com  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ , e após obtido o platô, foi realizada uma curva concentração resposta a ACh ( $1 \cdot 10^{-11}$  a  $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ).

### 3.4.3.3 Efeito da exposição ao Cloreto de Cádmio por 7 dias na resposta vasodilatadora independente do endotélio

A vasodilatação não mediada pelo endotélio foi avaliada, em anéis com endotélio removido, através do Nitroprussiato de Sódio (NPS), já que este é um doador de óxido nítrico. Um dos anéis foi incubado com Azul de metileno  $10 \mu\text{M}$  (inibidor da enzima Guanilato Ciclase solúvel) por 30 minutos e então os segmentos foram pré-contraídos com  $\text{Fe } 10^{-6} \text{ M}$ , e, uma vez atingido o platô, foi realizada uma curva concentração-resposta ao NPS ( $1 \cdot 10^{-11}$  a  $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ). Em alguns anéis, a pré-contracção foi realizada com  $\text{KCl } 60\text{mM}$ , para investigar a participação dos canais para  $\text{K}^+$  no relaxamento induzido pelo NPS.



**Figura 10:** Representação dos registros de reatividade vascular: A) Contração máxima do músculo liso vascular ao KCl (75 mM) e teste de integridade do endotélio. B) Curvas concentração-resposta à Fe, Ach e NPS. (Modificado de Peçanha, 2009).

### 3.5 PROTOCOLOS DE FLUORESCÊNCIA

Os protocolos de fluorescência foram realizados no Laboratório Multiusuário de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) - CCS/UFES.

Logo após a eutanásia dos animais e dissecação da aorta, alguns anéis foram separados para realização de protocolos de fluorescência para detecção *in situ* de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Secções de aorta previamente congeladas à -80°C em O.C.T Compound, (Tissue-Tek ) foram cortadas em secções de 10µm de espessura no criostato (Killik ®, Easy Path) e colocadas em lâminas previamente gelatinizadas. Essas lâminas foram então incubadas com tampão fosfato (0,1M) contendo CaCl<sub>2</sub> (0,45M) e acomodadas em estufa a 37°C durante 30 minutos afim de remover o meio de inclusão.

#### 3.5.1 Quantificação “*in situ*” de óxido nítrico

Utilizamos 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para detecção de óxido nítrico “*in situ*” de acordo com método descrito por Rossi et al., 2020. Após remoção do meio de inclusão e secagem, as lâminas foram incubadas em câmara escura com DAF (8µM) na presença e na ausência de L-NAME (100µM) a 37°C por 30 min, para avaliar a fluorescência dependente da síntese do óxido nítrico. Imagens digitais foram capturadas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500, câmera Leica DFC 310 FX usando configurações de imagens idênticas em ambos os grupos. A média amostral foi obtida através de quatro imagens de segmentos de aorta por animal. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software Image J.

#### 3.5.2 Quantificação “*in situ*” de peróxido de hidrogênio

Analizamos a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por meio da 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) através de protocolo adaptado, previamente descrito por Somberg et al., 2017. Após a remoção do meio

de inclusão e secagem das lâminas, elas foram incubadas em câmara escura com DCF-DA (10 $\mu$ M) na presença ou ausência de Catalase (1000u/mL) a 37°C por 30 min, que foi utilizada como controle negativo para a produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500, câmera Leica DFC 310 FX usando as mesmas configurações de imagem em ambos os grupos. A média amostral foi obtida através de quatro imagens de segmentos de aorta por animal. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software Image J.

### 3.7 EXPRESSÃO PROTEICA

Amostras de aorta foram trituradas com tampão RIPA gelado (Sigma Aldrich) com inibidor de protease (Sigma Aldrich), NaF (10mM) e NaVO 3 (1mM) e centrifugadas a 6000 RPM a 4° C, durante 15 minutos. A concentração proteica do sobrenadante recolhido foi definida através de ensaio de Bradford (Bio-rad). As amostras de proteínas foram homogeneizadas com solução de Laemmli (Dodecil Sulfato de Sódio 10%, 10 mM DTT, glicerol 20%, Tris HCl 200mM e azul de bromofenol 0,075%) e carregadas em géis de acrilamina TGX StainFree FastCast 10% (BioRad), juntamente com uma escala padrão de peso (Protein Unstained Standard, Bio-rad), e separadas por eletroforese (Mini-PROTEAN Tetracell, Bio-rad) durante 2,5-3h a 80V em tampão de corrida contendo 140mM de glicina, 37mM de Tris-Base e 1% de Dodecil Sulfato de Sódio (Sigma Aldrich). Os géis foram ativados com irradiação UV (ChemiDoc XRS + Image System, Bio-rad) durante 1 minuto, para detecção da fluorescência emitida pelos resíduos de triptofano presentes nas proteínas.

As proteínas, já separadas, foram então transferidas para membranas de nitrocellulose (Bio-rad) por 18h a 0,02A em solução de transferência gelada contendo: 140mM de glicina, 37mM de Tris-base e 20% de methanol. Essas membranas foram então bloqueadas com leite desnatado 5% (Molico, Nestlé) em uma solução TBST, contendo 20mM Tris HCl, 150 mM NaCl e 0,1% de Tween 20, por 1h. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários para as proteínas de interesse: Anti-phospho-NOS3 (Ser1177, 1:250, Santa Cruz), anti-catalase (1:10000, Sigma Aldrich, Alemanha) ou anti-gp91phox (1:2500, BD transductions Laboratories, San Jose, CA, EUA) em solução de 3% albumina de soro bovino em TBST. As membranas foram então lavadas com TBST e incubadas com anticorpos anti-camundongo

(1:5000, Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) ou anti-coelho (1:5000, Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) acoplados a peroxidase, em solução de albumina de soro bovino a 3% em TBST, por 1h, sob agitação. Após lavagem com TBTS, as membranas foram finalmente incubadas com solução ECL contendo 0,1M Tris-HCl, 1,25mM luminol, 0,2mM ácido p-cumárico e 0,01% de peróxido de hidrogênio. As bandas das proteínas de interesse foram detectadas e registradas por fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

A intensidade de luminescência de cada banda de interesse foi normalizada pela luminescência referente às proteínas totais da amostra, por meio do software Image Lab 6.0.1 (Bio-rad).

### 3.8 RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As respostas ao KCl estão expressas pelo  $\Delta$  KCl, calculado subtraindo a tensão após a incubação com o segundo KCl pela tensão basal (registrada imediatamente antes da incubação), em gramas.

As respostas induzidas pela Fenilefrina foram calculadas diminuindo-se a tensão obtida após cada incubação da tensão basal e normalizadas pela resposta máxima ao KCl (75mM). O relaxamento dependente (ACh) e independente do endotélio (NPS) foram expressos como porcentagem do relaxamento (tensão da dose – tensão basal) em relação ao aumento de tensão registrado na pré-contração à Fenilefrina (1  $\mu$ M) ou ao KCl (60mM).

A contração ao KCl e o peso foram comparados por Teste t Student não pareado. As curvas de reatividade vascular, pressão arterial sistólica (PAS) e a densidade média de fluorescência nas análises *in situ* foram comparados por ANOVA duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. Nas curvas que apresentaram diferenças estatisticamente significantes em ambos os grupos, foi calculada a diferença das áreas abaixo da curva (dAUC) afim de comparar a magnitude do efeito dos fármacos entre os grupos, expressas como a porcentagem da dAUC (% dAUC) do anel sem incubação de mesmo animal. A expressão proteica foi expressa como a

razão entre os sinais correspondentes à proteína estudada e a proteína total no immunoblot e foram comparados através de Teste t Student não pareado.

Para análise dos dados e aplicação das análises estatísticas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel (Redmond, Washington, EUA) e GraphPad Prism Software 8.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PESO DOS ANIMAIS E GANHO PONDERAL

Ao comparar o peso inicial e após os 7 dias de exposição, os animais do grupo Controle e Cádmio apresentaram peso semelhante (Tabela 1).

**Tabela 1:** Peso corporal antes e após a exposição por 7 dias ao CdCl<sub>2</sub>.

	Peso corporal (g)	
	Inicial	Final
Controle (n=7)	279,28 ± 11,6	328,07 ± 14,3
Cádmio (n=7)	282,57 ± 8,08	321,85 ± 12,8

Valores expressos em média e EPM; Teste t-Student.  $p > 0,05$

Quanto a variação de ganho de peso ponderal, esta também não apresentou diferença entre os grupos (Tabela 2). Indicando que um curto período de exposição ao CdCl<sub>2</sub>, não houveram grandes repercussões relativas ao ganho de peso.

**Tabela 2:** Variação de ganho ponderal após a exposição por 7 dias ao CdCl<sub>2</sub>.

	Varição de Ganho Ponderal (g)
	Ganho ponderal
Controle (n=7)	48,7 ± 5,6
Cádmio (n=7)	38,1 ± 5,9

Valores expressos em média e EPM; Teste t-Student.  $p > 0,05$

## 4.2 CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO NO SORO SANGUÍNEO

Após 7 dias de exposição ao Cádmio, os animais de ambos os grupos foram eutanasiados e o sangue coletado para quantificação de Cádmio no plasma sanguíneo. O grupo Controle expressou uma concentração de Cádmio inferior ao limite de quantificação do método ( $< 0,2 \mu\text{g/L}$ ,  $n=4$ ), enquanto o grupo Cádmio apresentou  $1,66 \pm 0,38 \mu\text{g/L}$  ( $n= 9$ ) de Cádmio plasmático.

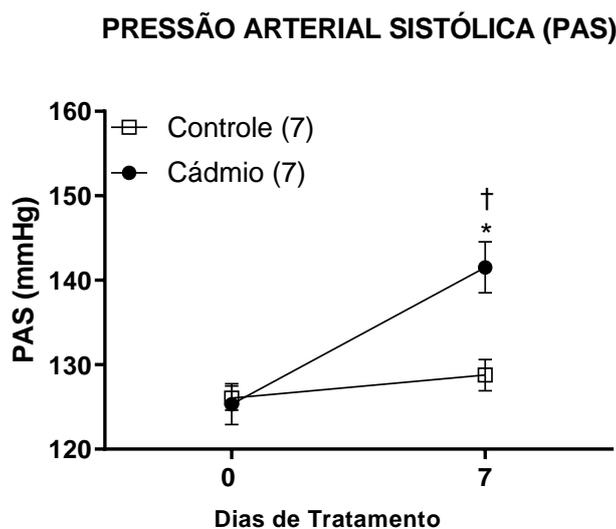
## 4.3 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Os animais do grupo Controle (Ct) e do grupo Cádmio (Cd) apresentaram pressão arterial sistólica (PAS) semelhante antes da exposição ao metal, no dia 0. Porém, após 7 dias de exposição, a pressão sistólica do grupo Cd apresentou-se significativamente maior quando comparada à do grupo Ct (Figura 11, Tabela 3). Esses dados sugerem que sete dias de exposição ao Cádmio (100 ppm, via água de beber) são suficientes para elevar a pressão arterial sistólica de ratos.

**Tabela 3:** Valores médios da Pressão Arterial Sistólica (PAS) dos animais dos grupos Controle e Cádmio antes e após 7 dias de exposição.

Pressão Arterial Sistólica (PAS)		
	Inicial	Final
Controle (n=7)	$126,0 \pm 1,4$	$128,7 \pm 1,84$
Cádmio (n=7)	$125,3 \pm 2,4$	$141,5 \pm 3,0^* \dagger$

Valores expressos em média e EPM; ANOVA 2 vias e pós-teste Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs Cádmio dia 0.  $\dagger p < 0.05$  vs Controle dia 7



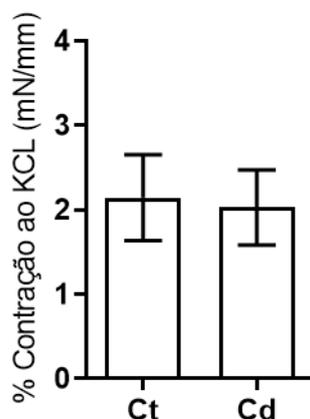
**Figura 11:** Média da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de pletismografia de cauda em ratos dos grupos Controle e Cádmio, antes e após 7 dias de exposição. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA (duas vias). \* $p < 0,05$  vs Controle, dia correspondente, † $p < 0,005$  vs Cádmio dia 0.

#### 4.4 REATIVIDADE VASCULAR

##### 4.4.1 Contração do músculo liso vascular ao Cloreto de Potássio (KCl)

A exposição dos anéis de aorta ao KCl (75 mM) provocou resposta contrátil similar em ambos os grupos experimentais (Controle  $2,14 \pm 0,11$  g,  $n=31$ ; vs Cádmio  $2,02 \pm 0,11$  g,  $n=33$ , teste t-Student não pareado), por isso, a resposta contrátil à Fe foi normalizada pela contração máxima ao KCl, em porcentagem.

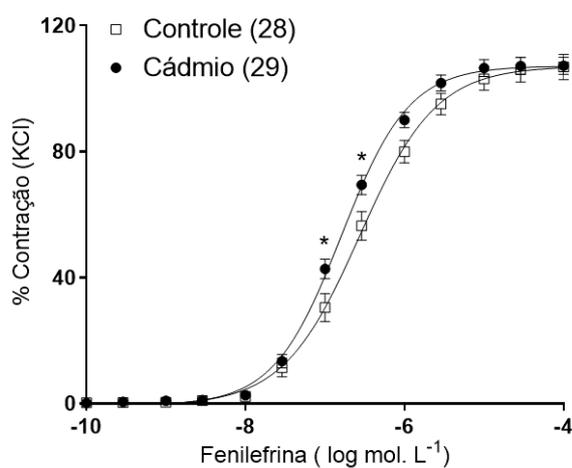
### % Contração ao KCL



**Figura 12:** Avaliação da função muscular lisa dos segmentos de aorta ( $\Delta$  Contração ao KCL). Valores expressos em média e EPM;  $p > 0,05$ , Teste t de Student não pareado.

#### 4.4.2 Reatividade à Fenilefrina de segmentos isolados de aorta

A incubação com concentrações crescentes de Fenilefrina, um agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, foi capaz de produzir contração nos anéis aórticos de ambos os grupos. No entanto, a curva do grupo Cádmio apresentou-se deslocada para a esquerda em relação à do grupo Controle, demonstrando aumento na resposta contrátil à Fenilefrina (Figura 13).



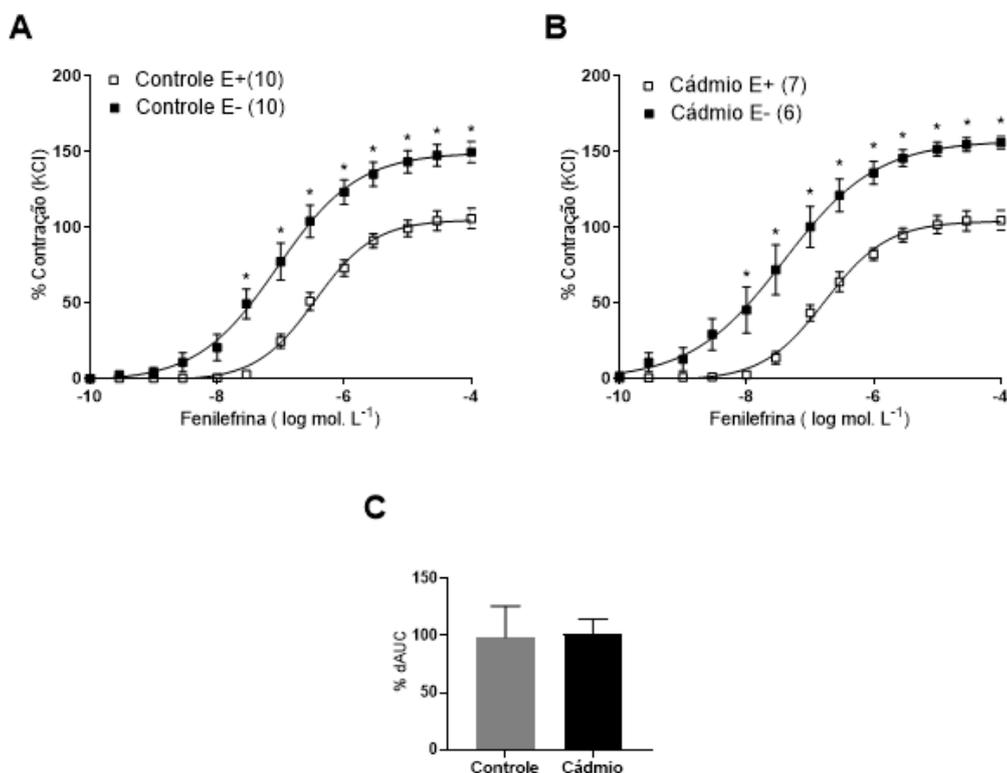
**Figura 13:** Curvas concentração-resposta a Fe em segmentos aórticos dos grupos Controle e Cádmio após 7 dias de exposição ao  $\text{ClCd}_2$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias,

pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs contração do Controle à mesma dose de Fenilefrina.

#### 4.4.2.1 Efeitos da exposição por 7 dias ao Cádmio sobre a modulação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para definir se haveria alguma participação do endotélio no aumento da resposta contrátil à Fenilefrina, removemos o endotélio de alguns anéis e analisamos o comportamento das curvas de ambos os grupos. Observamos que a remoção mecânica do endotélio aumentou a resposta contrátil à Fenilefrina tanto do grupo Controle quanto do grupo Cádmio (Figura 14). Isso acontece, pois no endotélio são produzidos fatores vasodilatadores que contrabalanceiam a contração do músculo liso vascular.

Entretanto, não houve diferença na magnitude dessa resposta entre os grupos (dAUC%). Indicando que provavelmente, o aumento da resposta contrátil à Fenilefrina não se deve a alterações produzidas no endotélio vascular.



**Figura 14:** Curvas concentração-resposta à Fe de segmentos aórticos dos grupos: (A) Controle e após remoção do endotélio (E-); (B) Cádmio e após remoção do endotélio (E-); \* $p < 0,05$  vs Controle ou Cádmio por ANOVA duas vias com pós-teste

de Bonferroni. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.

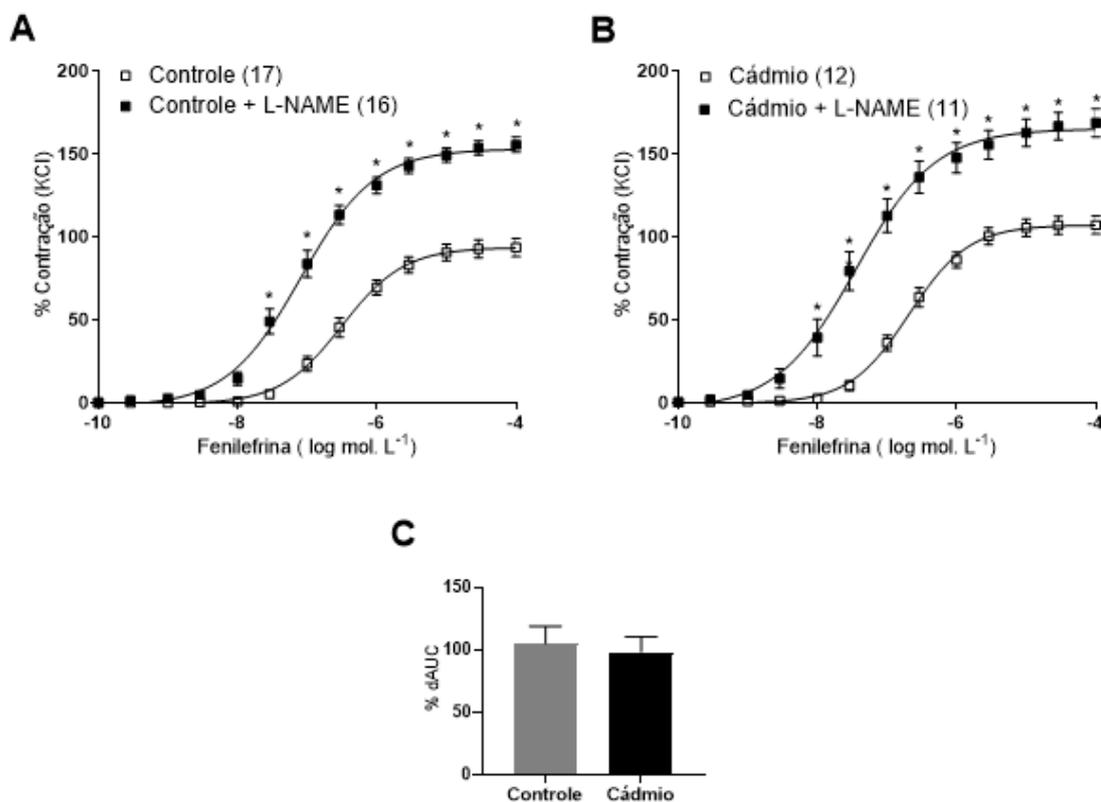
#### 4.4.2.2 Efeitos da exposição por 7 dias ao Cádmio sobre as espécies reativas de oxigênio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Investigamos algumas vias de agentes vasoativos relacionados com o estresse oxidativo, afim de verificar a influência dessas vias no aumento da resposta contrátil à Fenilefrina no grupo exposto ao Cádmio.

##### 4.4.2.2.1 Participação da via do óxido nítrico na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

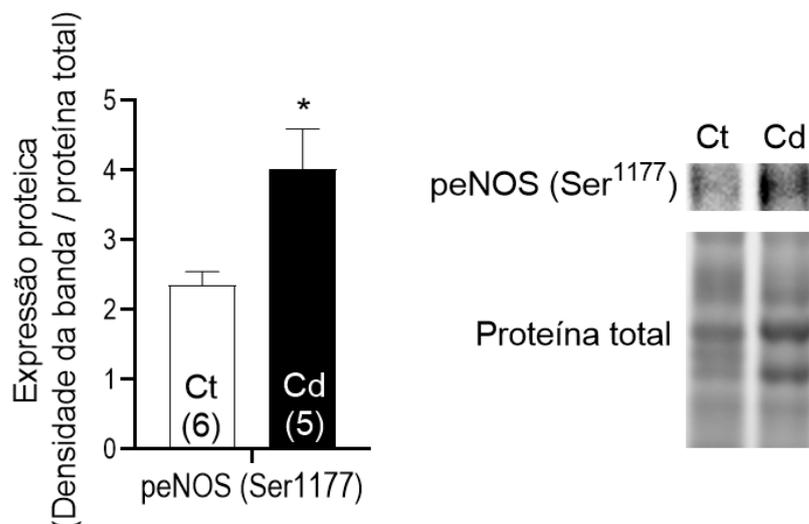
O óxido nítrico desempenha um importante papel como agente vasodilatador, sendo produzido no endotélio e posteriormente difundido para o MLV. Por esse motivo, decidimos avaliar a participação do NO na resposta contrátil à Fenilefrina. Para isso, utilizamos o L-NAME (100 $\mu$ M), que é um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), enzima responsável pela produção de óxido nítrico.

Observamos que ao inibir a NOS, ambos os grupos tiveram um aumento da resposta contrátil à Fenilefrina. Entretanto, a magnitude desse efeito não foi diferente entre os grupos (Figura 15), indicando que provavelmente a biodisponibilidade do óxido nítrico não seria a responsável pelo aumento da resposta contrátil à Fenilefrina no grupo exposto ao Cádmio.



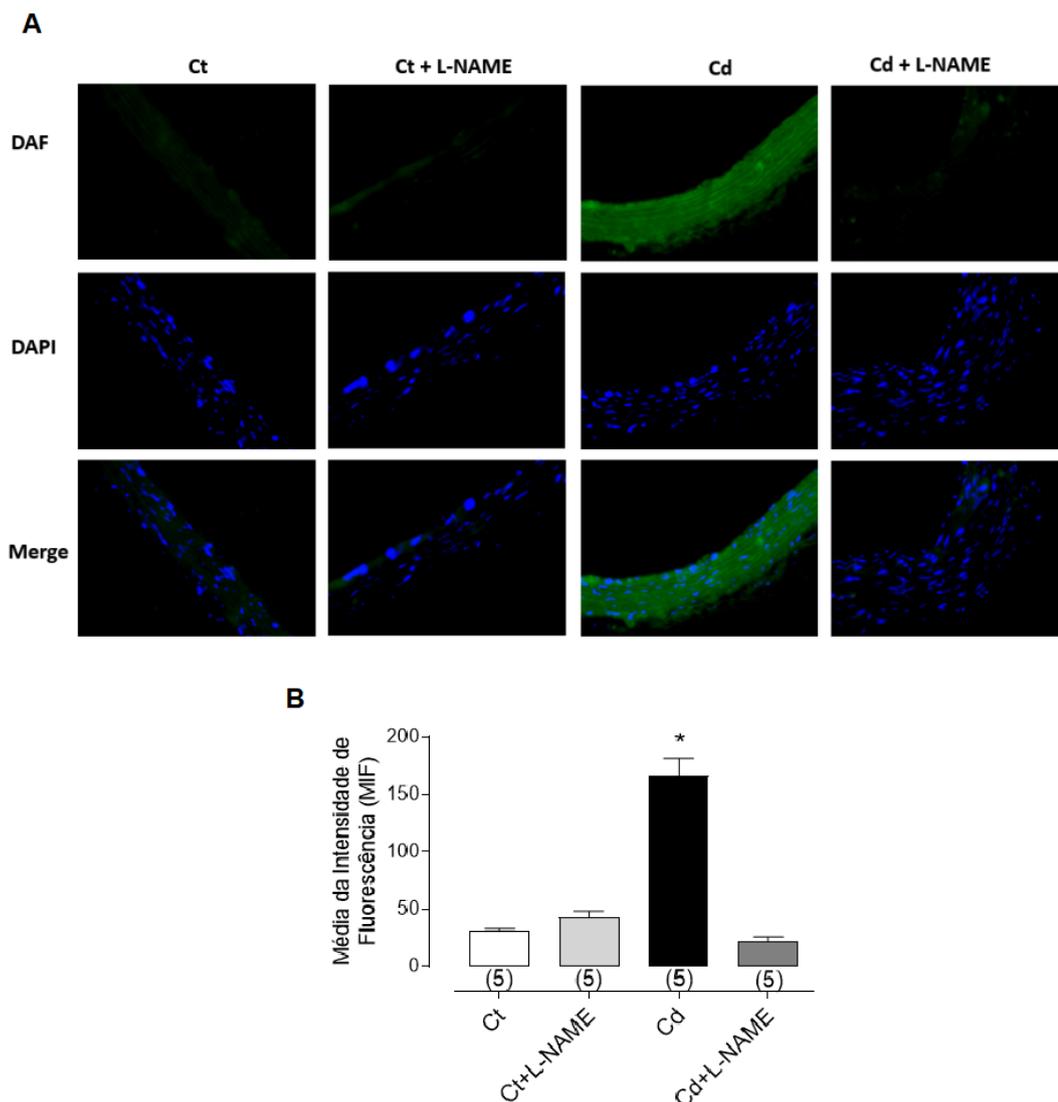
**Figura 15:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não do L-NAME em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle vs L-NAME e (B) Cádmio vs L-NAME. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.

Entretanto, ao avaliarmos a expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada (p-eNOS<sup>ser1177</sup>) observamos um aumento da expressão no grupo exposto ao Cádmio quando comparado ao grupo Controle (Figura 16). Indicando que haveria uma maior ativação da eNOS nesses animais, com uma possível maior produção de NO.



**Figura 16:** Resultados da expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase fosforilada (p-eNOS-ser1177) por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica em ratos dos grupos Controle e Cádmio. Valores expressos em média e EPM como relação entre a densidade das bandas da p-eNOS e das proteínas totais. Teste t não pareado: \*p < 0,05 vs Controle.

Como a atividade da eNOS se mostrou afetada pela exposição ao Cádmio, decidimos verificar se a produção basal de NO também estaria aumentada. Para isso, realizamos um ensaio de detecção “*in situ*” de NO através de sonda DAF-2 fluorescente em secções de 10 µm de anéis isolados de aorta. Como podemos observar na Figura 17, o grupo Cádmio apresentou fluorescência aumentada em relação ao grupo Controle. A inibição da NOS através da incubação de L-NAME inibiu completamente a formação de NO em ambos os grupos experimentais indicando que a diferença expressa representa de fato a produção basal de NO, o que demonstra a especificidade do método. Esses dados corroboram com o aumento na expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase ativada (p-eNOS<sup>ser1177</sup>).



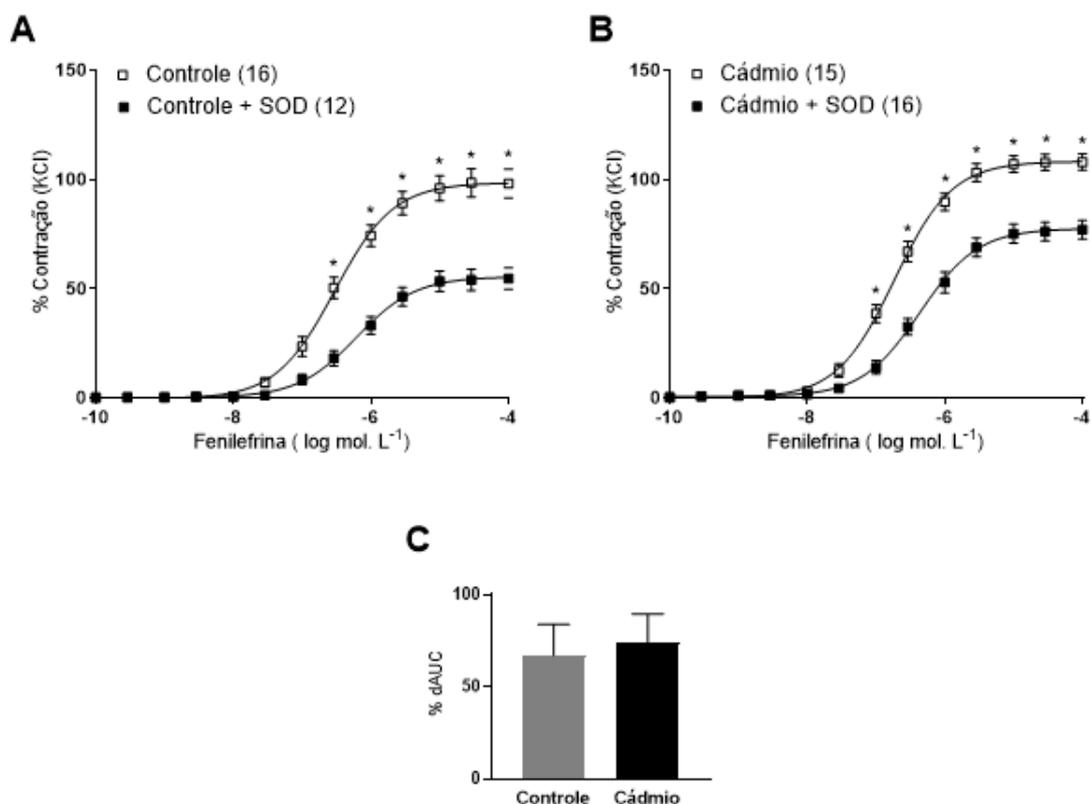
**Figura 17:** Detecção de NO “*in situ*” em secções de aorta. (A) Imagens representam os segmentos de aorta marcados com a sonda fluorescente DAF-2 no grupo Controle e Cádmio na presença e ausência de L-NAME. (B) Gráfico demonstrando a análise semi-quantitativa dos níveis de fluorescência. Dados expressos em média  $\pm$  EPM da densidade de fluorescência. Análise comparativa realizada através de ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Ct, Ct+L-NAME e Cd+L-NAME.

#### 4.4.2.2.2 Participação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

Os resultados apresentados até então indicam que a exposição ao Cádmio aumentou a síntese de NO, no entanto sua ação modulatória sobre a contratilidade à Fenilefrina foi igual entre os grupos. Essa biodisponibilidade do óxido nítrico pode ter sido equilibrada por reação com espécies reativas de oxigênio, em especial, o ânion

superóxido. Por esse motivo, investigamos a participação do ânion superóxido na resposta contrátil à Fenilefrina. Para isso, utilizamos um *scavenger* do  $O_2^{\cdot-}$ , a enzima SOD (150 U/ml).

Observamos que a incubação com essa enzima reduziu a resposta contrátil em ambos os grupos (Figura 18). Entretanto, não observamos diferença na magnitude dessa resposta entre os grupos. O que sugere que não haveria participação do  $O_2^{\cdot-}$  no aumento da resposta contrátil à Fenilefrina.



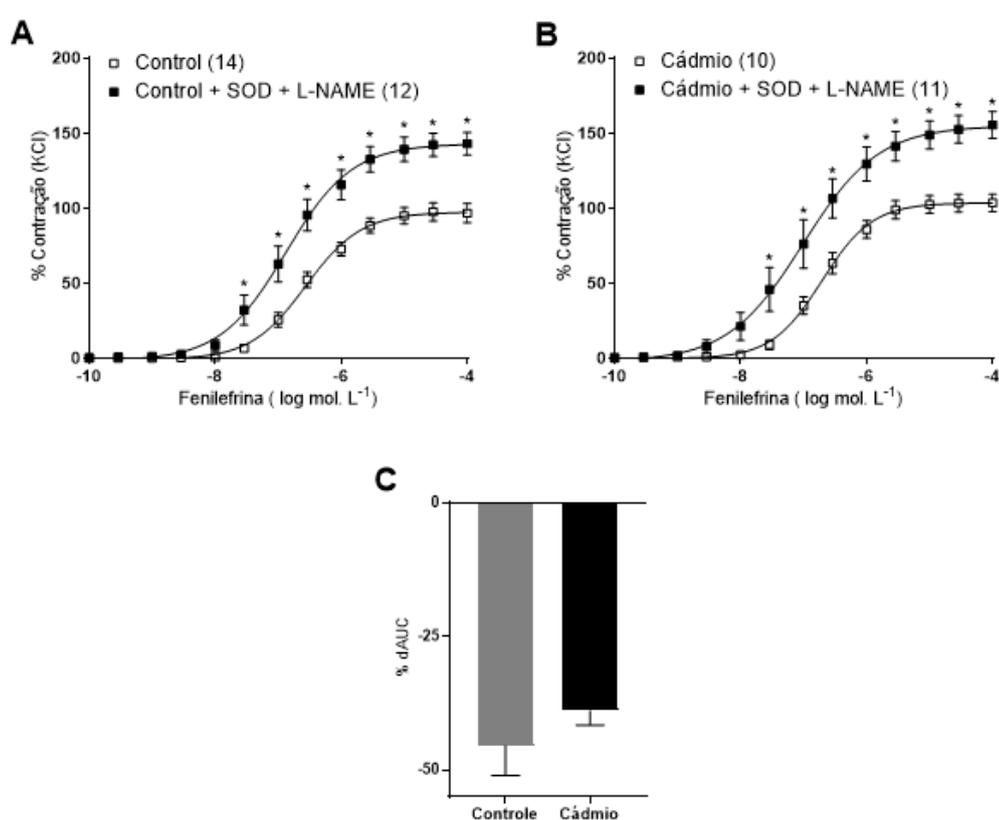
**Figura 18:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não da SOD em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.

#### 4.4.2.2.3 Participação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) sobre o papel do óxido nítrico na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

Para investigar a contribuição do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) na biodisponibilidade do óxido nítrico nos vasos expostos ao Cádmio, realizamos uma co-incubação de

SOD + L-NAME. Observamos que a incubação com os fármacos aumentou a resposta contrátil à Fenilefrina em ambos os grupos, sem diferença significativa em suas magnitudes.

Assim, além de não observarmos participação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) no aumento da reatividade, também identificamos que não houve contribuição desta espécie reativa de oxigênio sobre o papel do óxido nítrico nos anéis de aorta expostos ao Cádmio.

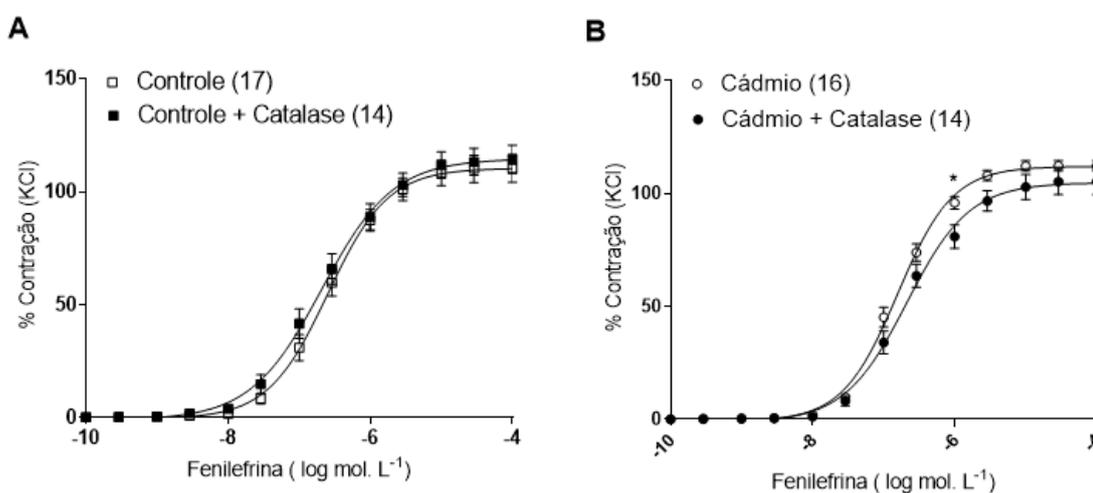


**Figura 19:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de SOD+L-NAME em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.

#### 4.4.2.2.4 Participação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

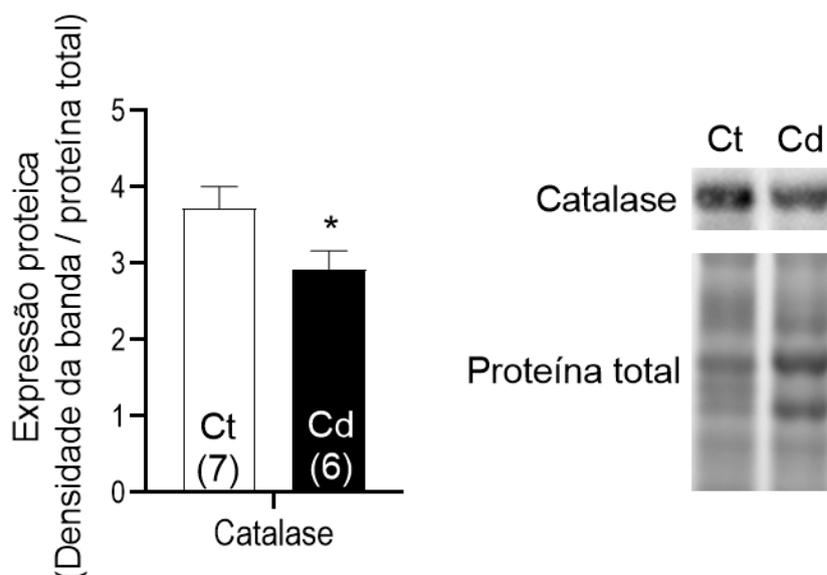
Como observado anteriormente, a exposição por 7 dias ao cádmio promoveu aumento da resposta à FE. Isso pode dever-se ao aumento da liberação de fatores contráteis e/ou redução de fatores relaxantes. Conforme dados publicados pelo nosso laboratório, tanto a exposição crônica (ALMENARA et al., 2013) quanto a administração *in vitro* de Cádmio (ANGELI et al., 2013), promoveram aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio na aorta, dentre elas, o peróxido de hidrogênio. Cabe ressaltar que a depender da concentração de  $H_2O_2$  formada em um vaso, esse agente pode atuar produzindo contração (altas concentrações) ou relaxamento (baixas concentrações) (GAO et al., 2003).

Assim, anéis isolados de aorta de ratos expostos ou não ao Cádmio por 7 dias, foram incubados com a enzima Catalase (1000U/ml), responsável pela degradação de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , previamente à curva concentração-resposta à FE, para investigar a participação do  $H_2O_2$  nas respostas contráteis das artérias. A adição da Catalase reduziu a resposta contrátil à Fenilefrina apenas no grupo Cádmio (Figura 20), não alterando a resposta no grupo Controle. Esses resultados sugerem que a exposição ao Cádmio promove aumento de  $H_2O_2$ , o que contribui para o aumento da resposta a Fenilefrina no grupo exposto.



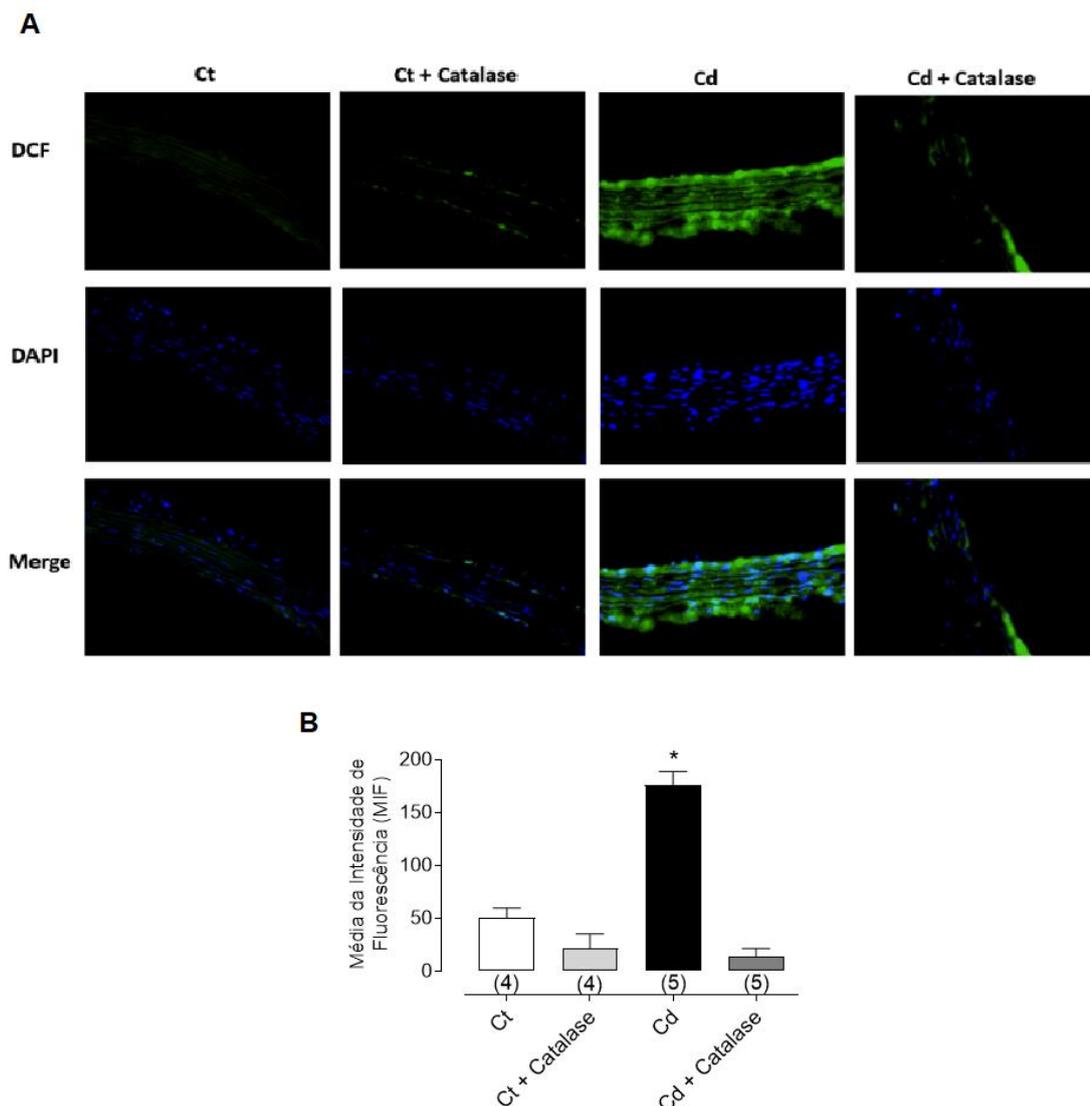
**Figura 20:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Catalase em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Cádmio.

Avaliamos também a expressão proteica da Catalase através da técnica de Western blot, e observamos que o grupo exposto ao Cádmio apresentou redução na expressão dessa enzima (Figura 21), o que corrobora com os dados de reatividade acima mencionados.



**Figura 21:** Resultados da expressão proteica da Catalase, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica em ratos dos grupos Controle (n = 7) e Cádmio (n = 6). Valores expressos em média e EPM como relação entre a densidade das bandas da Catalase e das proteínas totais. Teste t não pareado: \*p < 0,05 vs Controle.

Também avaliamos a produção *in situ* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da sonda de fluorescência DCF-DA e pudemos observar que houve um aumento na produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no grupo exposto ao Cádmio (Figura 22). A incubação com Catalase reduziu a marcação com a sonda e igualou as respostas entre os grupos, o que demonstra a especificidade do método. Esses dados corroboram com as análises reatividade e também com a expressão proteica reduzida da Catalase.

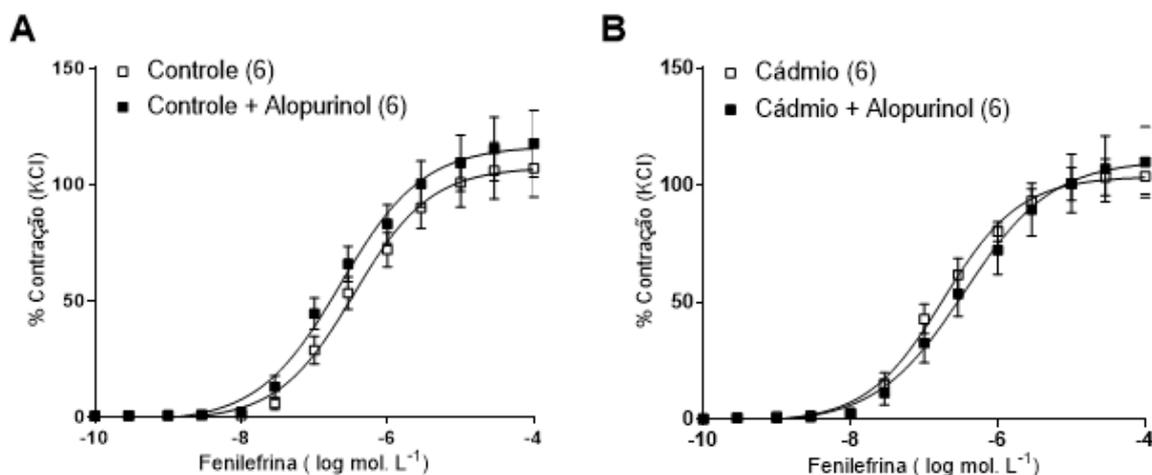


**Figura 22:** Detecção de  $H_2O_2$  “in situ” em secções de aorta. (A) Imagens de fluorescência representam os segmentos na presença da sonda fluorescente DCF-DA no grupo Controle e Cádmio na presença e ausência de Catalase. (B) Gráfico demonstrando a análise semi-quantitativa dos níveis de fluorescência. Dados expressos em média  $\pm$  EPM da densidade de fluorescência. Análise comparativa realizada através de ANOVA duas vias e pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Ct, Ct+Catalase e Cd+Catalase.

#### 4.4.2.3 Participação da Xantina Oxidase na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

Sabe-se que o principal oxidante produzido pela Xantina Oxidase (XO) é o  $H_2O_2$ . Desta forma, investigamos a participação desta enzima na reatividade vascular

de anéis de aorta de ratos expostos ou não ao cádmio. Para isso, utilizamos o Alopurinol, um inibidor da XO.



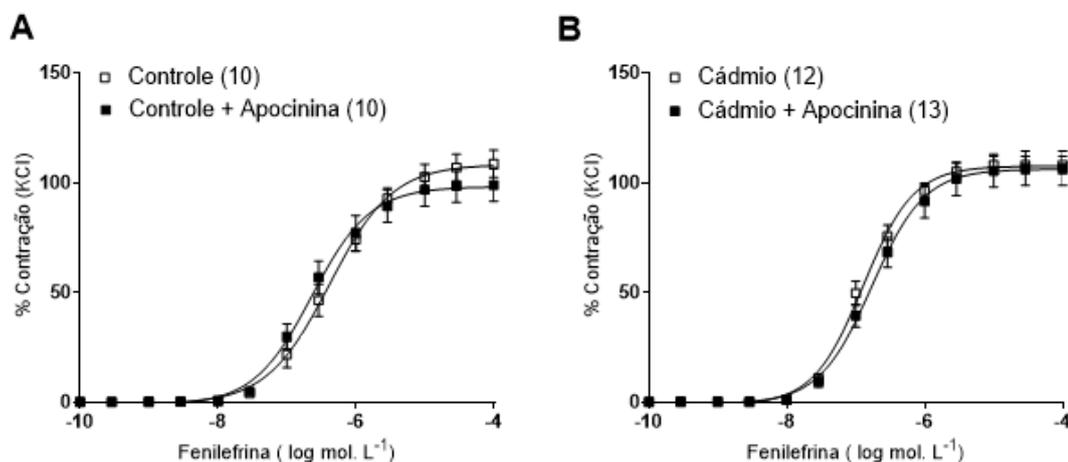
**Figura 23:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Alopurinol em segmentos aórticos dos grupos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni.  $p > 0,05$ .

Os resultados demonstraram reatividade vascular similar antes e após a incubação com o fármaco em ambos os grupos experimentais, descartando a xantina oxidase como fonte do excesso de  $H_2O_2$  observado nos ratos Cádmio (Figura 23).

#### 4.4.2.4 Participação da NADPH oxidase na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

Um trabalho anterior do nosso laboratório, observou aumento da expressão proteica da NOX2, uma isoforma da NADPH oxidase, e aumento da liberação de ânion superóxido em aorta isolada de ratos expostos cronicamente ao Cádmio (ALMENARA et al., 2013). A NADPH oxidase é a principal enzima produtora de espécies reativas de oxigênio vascular. Essa enzima catalisa a produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) após a redução do  $O_2$  utilizando a NADPH<sup>+</sup> como doador de elétrons (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000). Um aumento desta enzima poderia contribuir para o aumento da formação de  $H_2O_2$ , uma vez que, após a quebra do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pela SOD, ocorre a formação de  $H_2O_2$ . Para investigar a contribuição desta enzima no aumento da resposta a Fe no grupo Cádmio, utilizamos a Apocinina (30

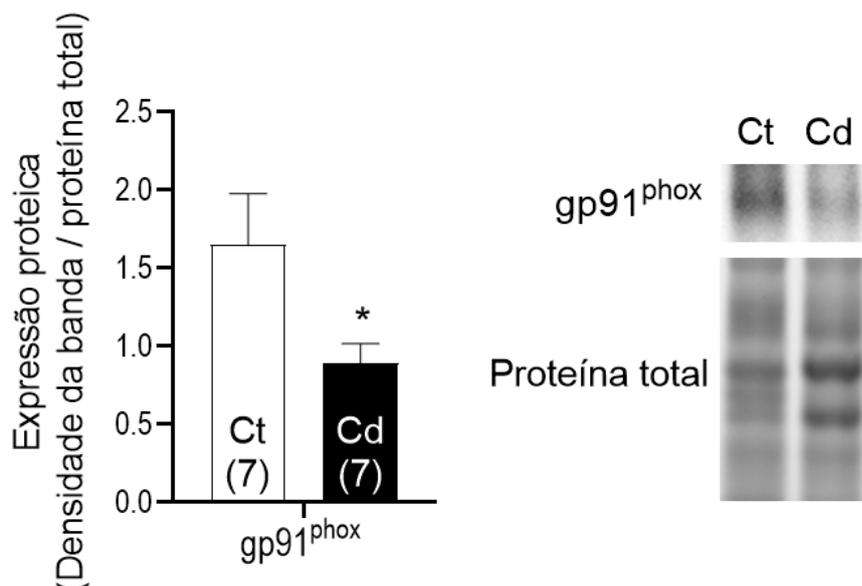
$\mu\text{M}$ ), que impede a translocação das subunidades citosólicas da NADPH oxidase, inibindo-a.



**Figura 24:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Apocinina em segmentos aórticos dos grupos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni.  $p > 0,05$ .

A adição da apocinina não alterou a resposta contrátil à Fenilefrina em ambos os grupos (Figura 24).

Também avaliamos a expressão proteica da subunidade gp91<sup>phox</sup> (NOX2) e observamos que o grupo exposto ao Cádmio apresentou uma redução na expressão dessa subunidade (Figura 25), sugerindo uma redução na expressão da NOX2, embora seu efeito sobre a modulação das respostas contráteis à fenilefrina tenha sido similar entre os grupos.

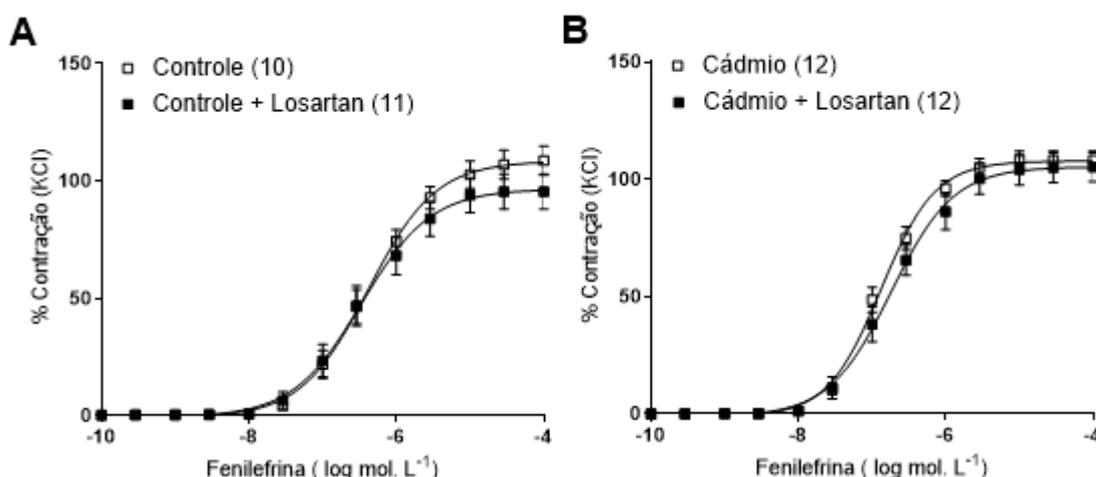


**Figura 25:** Resultados da expressão proteica da subunidade gp91<sup>phox</sup> (NOX2) por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica em ratos dos grupos Controle (n = 7) e Cádmio (n = 7). Valores expressos em média e EPM como relação entre a densidade das bandas da gp91<sup>phox</sup> e das proteínas totais. Teste t não pareado: \*p<0,05 vs Controle.

#### 4.4.2.5 Participação da Angiotensina II na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

A administração de Cádmio *in vitro* aumentou a participação da Angiotensina II local no aumento da resposta contrátil a Fenilefrina (ANGELI et al., 2013). Apesar de, em nosso estudo, não termos observado alteração na reatividade à Fenilefrina que indicasse participação da NADPH Oxidase, houve porém, uma redução na expressão proteica da subunidade gp91<sup>phox</sup> (NOX2). Assim, sabendo que Angiotensina II é um potente estimulador da NADPH oxidase, seu desbalanço poderia reduzir o estímulo da NOX2. Dessa forma, avaliamos a participação da Angiotensina II na reatividade à fenilefrina em anéis de aorta dos grupos Controle e Cádmio através da adição de Losartan (10 µM), um antagonista de receptor AT1.

A adição de Losartan não alterou a resposta contrátil a Fenilefrina em nenhum dos grupos (Figura 26), indicando a não participação da Angiotensina II via receptores AT1 na modulação da resposta contrátil à Fe nos grupos Controle e Cádmio.

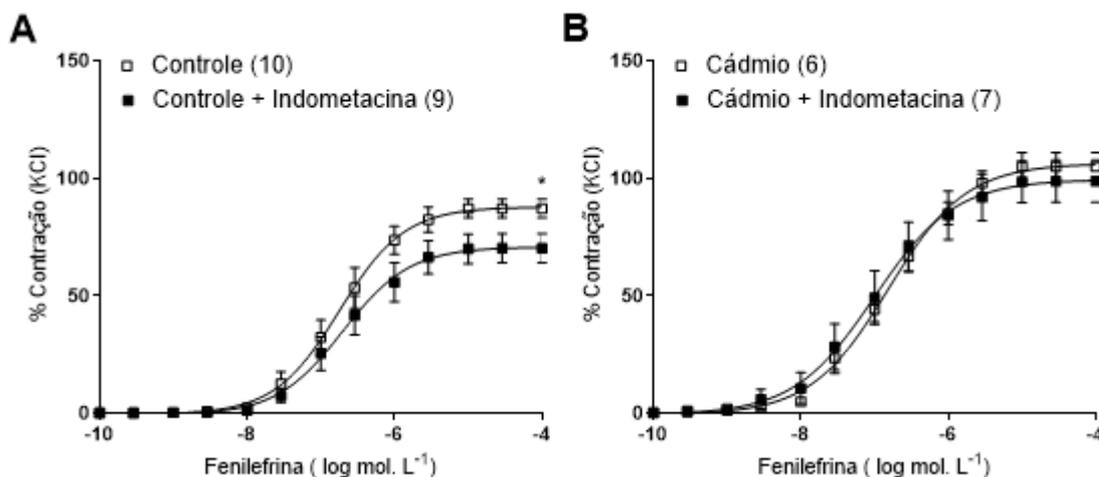


**Figura 26:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Losartan em segmentos aórticos dos grupos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmió. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni.  $p > 0,05$ .

#### 4.4.2.6 Participação da via da enzima Ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

A via da Ciclo-oxigenase apresentou-se comprometida após exposição ao Cádmió *in vitro* em artérias de condutância (ANGELI et al., 2013) e também pela via intraperitoneal (14 dias - 1 mg/kg) em artérias de resistência (JÚNIOR et al., 2020). Assim, para avaliar a participação da via da Ciclooxigenase no aumento da resposta contrátil à Fenilefrina nos animais expostos ao Cádmió, utilizamos um inibidor não seletivo da COX, a Indometacina.

A incubação com o fármaco no grupo Controle reduziu a resposta contrátil a Fenilefrina, o mesmo não ocorreu no grupo Cádmió. Os resultados sugerem uma redução da modulação positiva dos prostanóides derivados da COX na resposta contrátil à Fenilefrina de ratos expostos ao Cádmió.



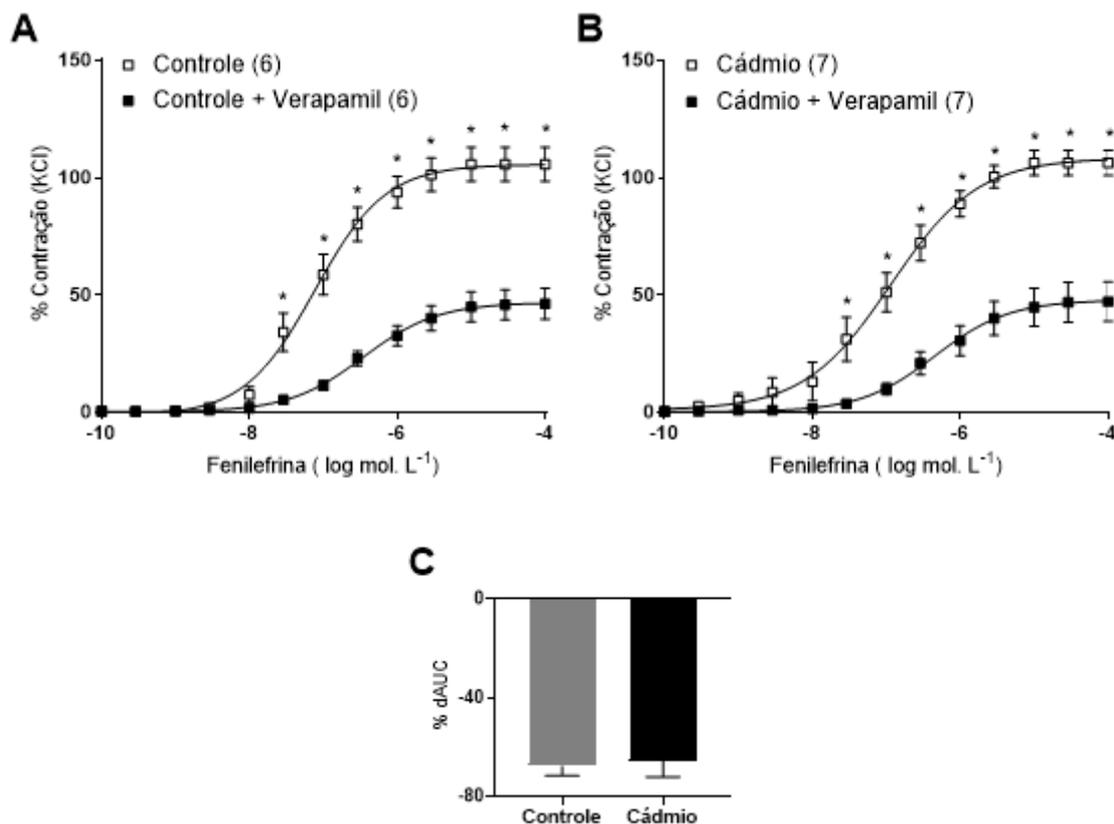
**Figura 27:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Indometacina em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós- teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Controle.

#### 4.4.2.7 Participação dos canais para $Ca^{2+}$ na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

Os canais para  $Ca^{2+}$  participam da contração das células musculares lisas aumentando o cálcio intracelular, o que desencadeia a cascata que resulta na contração do músculo liso vascular (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

Por serem cátions bivalentes, os íons  $Cd^{2+}$  podem ser transportados pelos canais de cálcio dependentes de voltagem. Em células eletricamente excitáveis, os canais para  $Ca^{2+}$  parecem ser a principal via de entrada do Cádmio (MARTELLI et al., 2006)

Por isso, decidimos avaliar se haveria alguma alteração na função desses canais na contração à fenilefrina. Para isso, utilizamos o Verapamil, fármaco bloqueador de canais de  $Ca^{2+}$  tipo L (VOCs). Observamos que o bloqueio dos canais de  $Ca^{2+}$  reduziu significativamente a reatividade a Fenilefrina em ambos os grupos com magnitude semelhante (Figura 28). Isso indica que os canais de  $Ca^{2+}$  não estariam influenciando no aumento da reatividade à Fenilefrina no grupo Cádmio.



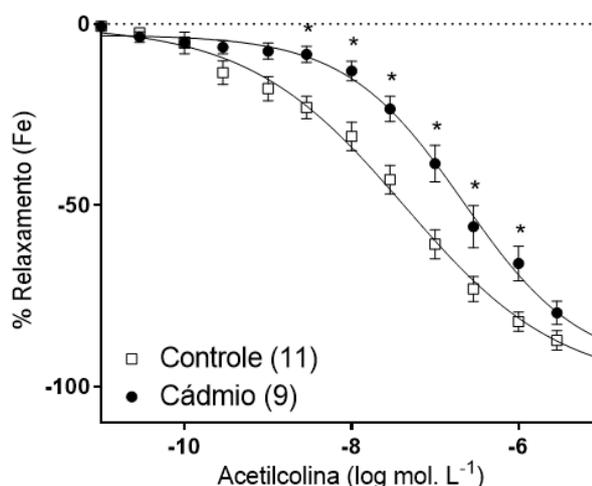
**Figura 28:** Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Verapamil em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.

#### 4.4.3 Relaxamento dependente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica

Trabalhos anteriores do nosso laboratório com exposição crônica ao Cádmio verificaram redução do relaxamento à ACh em aorta isolada de ratos (ALMENARA et al., 2013) e também de camundongos ApoE <sup>-/-</sup> (OLIVEIRA et al., 2019). Assim, avaliamos o relaxamento dependente do endotélio através da incubação de um agonista dos receptores muscarínicos, a Acetilcolina (ACh). Esse fármaco age, principalmente, estimulando a produção de óxido nítrico no endotélio, que se difunde para o músculo liso vascular para promover vasodilatação (RATTMANN, 2009).

Anéis com endotélio preservado foram pré-contraídos com Fenilefrina, e não houve diferença na pré-contracção entre os grupos. A adição de acetilcolina induziu relaxamento nos dois grupos. Entretanto, o grupo Cádmio apresentou a curva de relaxamento à ACh deslocada para a direita, indicando menor resposta à ACh em relação ao grupo Controle (Figura 29).

Essa alteração poderia ser decorrente de uma redução da produção de vasodilatadores derivados do endotélio, induzidos pela ACh, ou pelo impedimento da ação desses vasodilatadores sobre o músculo liso vascular subjacente.

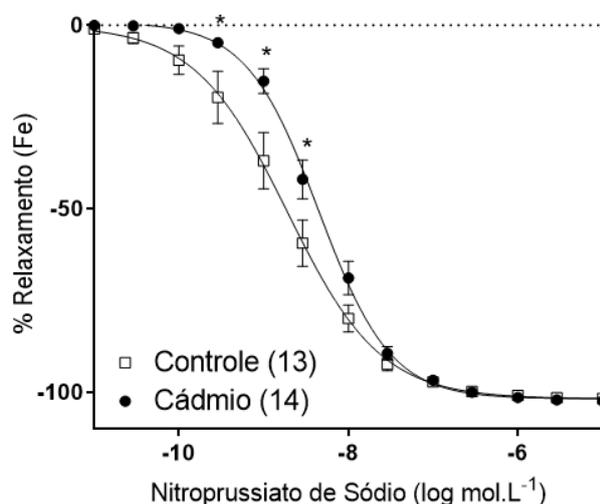


**Figura 29:** Curvas concentração-resposta a ACh de segmentos aórticos dos grupos Controle e Cádmio após 7 dias de exposição ao ClCd<sub>2</sub>. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs contração do Controle à mesma dose de Acetilcolina.

#### 4.4.4 Relaxamento independente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica

Para verificar se a redução do relaxamento à ACh poderia ser decorrente de alterações na via de sinalização do óxido nítrico (NO) no músculo liso vascular, o endotélio de alguns anéis aórticos foi removido e a avaliação do relaxamento ao Nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de NO, foi realizada.

Anéis de aorta que tiveram seu endotélio removido mecanicamente foram pré-contraídos com Fenilefrina, e não houve diferença na pré-contracção entre os grupos. A adição de NPS induziu o relaxamento dos anéis isolados de aorta em ambos os grupos. Entretanto, da mesma forma que no relaxamento à ACh, a curva de relaxamento ao NPS do grupo Cd se mostra deslocada para a direita, sugerindo menor resposta ao NPS no grupo Cádmio (Figura 30). Esse resultado sugere que o prejuízo do relaxamento no grupo Cd também envolve o downstream do NO no músculo liso vascular.



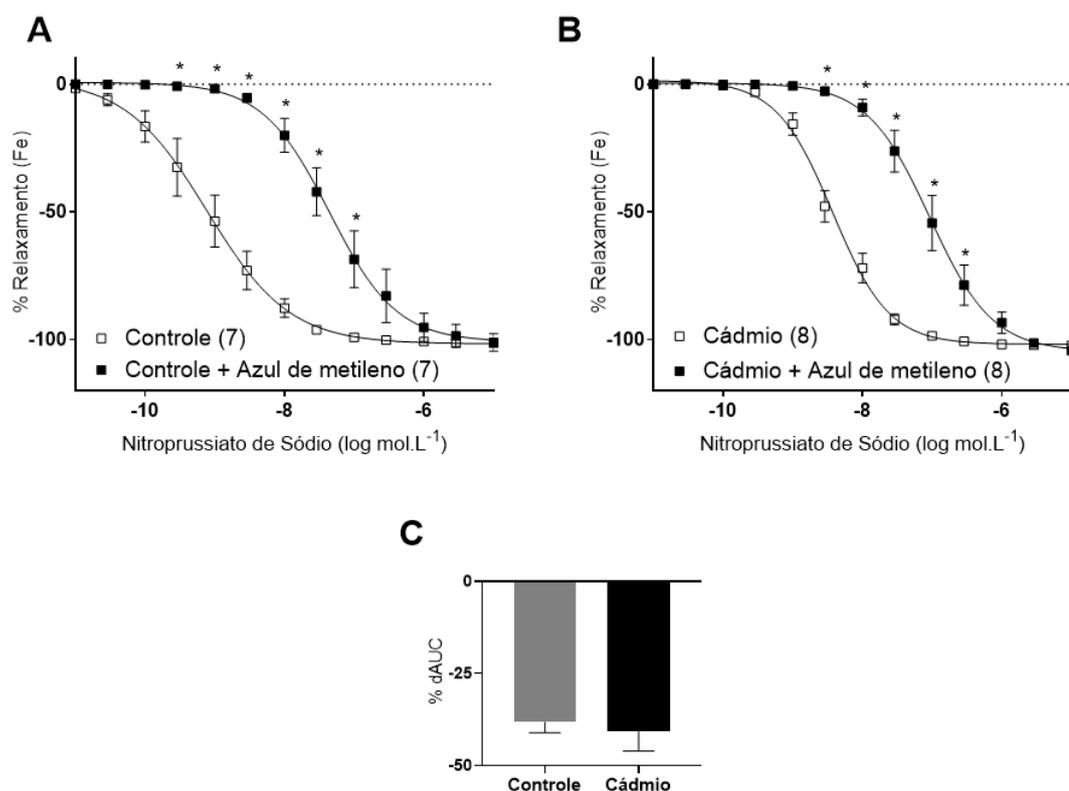
**Figura 30:** Curvas concentração-resposta ao NPS de segmentos aórticos dos grupos Controle e Cádmio após 7 dias de exposição ao CICd<sub>2</sub>. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs contração do Controle à mesma dose de NPS.

#### 4.4.4.1 Participação da enzima Guanilato Ciclase solúvel no relaxamento independente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica

O óxido nítrico produzido e liberado pelo endotélio se difunde para as células do músculo liso vascular, onde, dentre outros mecanismos, age estimulando a Guanilato Ciclase solúvel (GCs), o que desencadeia uma cascata intracelular que resulta na vasodilatação (LINCOLN; DEY; SELLAKE, 2001)

Assim, a redução do relaxamento ao Nitroprussiato de sódio no grupo Cd pode ser decorrente de alterações na atividade dessa enzima. Por isso, avaliamos a participação da GCs na redução do relaxamento ao NPS através da incubação do Azul de metileno (10  $\mu$ M), um inibidor da GCs.

A adição de Azul de metileno reduziu a resposta ao NPS em ambos os grupos experimentais (Figura 31), indicando participação similar da Guanilato Ciclase no relaxamento induzido pelo NPS em ambos os grupos.



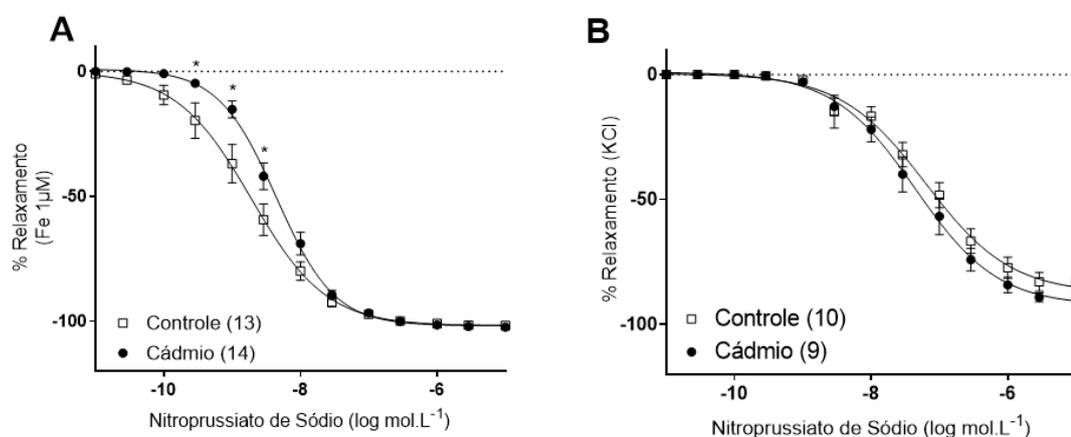
**Figura 31:** Curvas concentração-resposta ao NPS na presença ou não de Azul de Metileno em segmentos aórticos dos grupos (A) Controle e (B) Cádmio. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Controle ou Cádmio. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses.

#### 4.4.4.2 Participação dos canais para $K^+$ no relaxamento independente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica

Além da via da GCs, a vasodilatação mediada pelo NO também envolve outras vias, dentre elas a ativação de canais para  $K^+$  (IRVINE; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2003).

Para avaliar a participação dos canais para  $K^+$  na redução do relaxamento induzida pelo NPS, alguns anéis foram pré-contraídos com KCl (60mM) ao invés de Fenilefrina, em seguida, foram desenvolvidas curvas concentração-resposta ao NPS no grupo Controle e Cádmio.

Observamos que a pré-contração com KCl aboliu a diferença da resposta independente do endotélio ao NPS entre os grupos quando comparados aos anéis pré contraídos com Fenilefrina. Isso sugere que a exposição ao Cádmio alterou a atividade dos canais para  $K^+$  voltagem dependentes e pode justificar o menor relaxamento ao NPS.



**Figura 32:** Curvas concentração-resposta ao NPS em segmentos aórticos dos grupos Controle e Cádmio (A) Anéis pré-contraídos com Fe 1  $\mu$ M (B) Anéis pré-contraídos com KCl 60 mM. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses. ANOVA duas vias pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs Controle a mesma dose de NPS.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que curtos períodos de exposição a baixa concentração de Cádmio (100 ppm), similar àquelas encontradas no plasma de fumantes, foi capaz de promover aumento da pressão arterial e disfunção vascular na aorta de ratos. A disfunção observada parece envolver o aumento da biodisponibilidade de  $H_2O_2$  e a redução da ativação dos canais para  $K^+$ , acompanhada de aumento da atividade da eNOS

### 5.1 EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CURTO PRAZO AO CÁDMIO SOBRE O PESO DOS ANIMAIS E O GANHO PONDERAL

Após serem expostos por 7 dias ao Cádmio os animais não apresentaram diferença significativa de peso e ganho ponderal quando comparados ao grupo Controle.

Outras exposições em tempos maiores, com a mesma concentração utilizada nesse estudo, relataram redução do peso dos animais após 30 dias (ALMENARA et al., 2013) e 8 semanas (SOMPAMIT et al., 2010) de exposição. Este último estudo também avaliou o consumo de água e alimentos dos animais, e apesar da redução no peso, não houve alteração no consumo. Entretanto, no estudo de Oliveira e colaboradores (2019), apesar de não terem observado redução no peso dos camundongos, estes apresentaram menor ganho ponderal, justificado pelo consumo de ração reduzido após 28 dias de exposição.

Exposição à concentrações menores de Cádmio (32 ppm) durante 2 meses não afetaram o peso dos animais (SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020) ao final do tratamento. No estudo de Zhang e colaboradores (2019), exposições em diferentes concentrações (1, 10, ou 100  $\mu\text{g/L}$ ) durante a gestação associado à mais 10 semanas após o nascimento da prole não demonstraram alterações nos parâmetros de peso corporal. Isso indica que as alterações induzidas pelo Cádmio parecem ser tempo e concentração dependentes.

## 5.2 CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO NO SORO SANGUÍNEO.

Neste estudo, a concentração plasmática de Cádmio encontrada nos animais expostos foi de  $1,66 \pm 0,38 \mu\text{g/L}$   $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Essa concentração é relevante pois mesmo nos países onde a população tem níveis mais elevados de Cádmio no sangue, a média ainda é inferior a  $4 \mu\text{g/L}$  no sangue total. Vale ainda ressaltar que os níveis plasmáticos de Cádmio são considerados relacionados à exposição recente e são menores do que a concentração no sangue total já que a maior parte do Cádmio no sangue se encontra nos eritrócitos. No plasma, o Cádmio circula inicialmente ligado à metalotioneína e à albumina (WHO, 1992).

Um estudo realizado em doadores de sangue em uma cidade do noroeste do Brasil identificou que a média dos níveis séricos de Cádmio em fumantes e não-fumantes era de  $0,92 \mu\text{g/L}$  e  $0,30 \mu\text{g/L}$ , respectivamente (FARO et al., 2014). Concentrações ainda maiores são relatadas em uma investigação sobre os níveis plasmáticos de cádmio em mulheres fumantes, no qual estas apresentaram média de  $2,98 \pm 0,12 \text{ ng/ml}$  (SADEGHI et al., 2014). Outro estudo, dessa vez com trabalhadores de oficinas automobilísticas, identificou níveis séricos significativamente mais elevados em mecânicos do que no grupo controle ( $1,17 \pm 0,52 \mu\text{g/L}$  vs  $0,41 \pm 0,09$ ) (ISHOLA et al., 2017). Assim, as concentrações encontradas em nosso estudo são similares às concentrações encontradas principalmente em populações fumantes e expostas ocupacionalmente.

## 5.3 EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Os animais expostos por 7 dias ao Cádmio apresentaram aumento da pressão arterial sistólica em relação ao grupo Controle. Assim como observado neste estudo, o aumento da PAS após 7 dias de exposição (100ppm) já havia sido reportado anteriormente por um estudo anterior do nosso laboratório (ALMENARA et al., 2013). Outros estudos com diferentes dosagens e vias de exposição ao Cádmio também relataram aumento da pressão arterial sistólica após o tratamento (BILGEN et al., 2003; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014; SANGARTIT et al., 2014; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020; SOMPAMIT et al., 2010; YOOPAN et al., 2006), reforçando o importante efeito do cádmio sobre a pressão arterial.

O aumento da pressão arterial provoca disfunção na camada íntima é média das artérias, provocando alterações associadas a aterogênese (TOUYZ, 2000; LI & CHEN, 2000). Na literatura, a hipertensão arterial promovida pela exposição ao Cádmio está associada a danos renais (SATARUG et al., 2005), interação com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (BALARAMAN et al., 1989), estímulo do sistema nervoso simpático (FADLOUN; LEACH, 1980) e disfunção no endotélio (ALMENARA et al., 2013; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014; YOOPAN et al., 2008) e do músculo liso vascular (FUJIWARA; WATANABE; KAJI, 1998; SANGARTIT et al., 2014).

Sabe-se que disfunção vascular em aorta é considerada um ponto de partida para doenças como a aterosclerose. Por isso, também investigamos se a exposição por curto período ao Cádmio poderia promover disfunção vascular precoce em aorta isolada de ratos.

#### 5.4 EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR

De fato, evidenciamos que a exposição por 7 dias e em baixa concentração de Cádmio, foi capaz de aumentar a resposta contrátil à Fe. Esses resultados são compatíveis com os observados em exposições por 30 dias (ALMENARA et al., 2013; BILGEN et al., 2003). No entanto, outros estudos com tempo de exposição maior, 60 dias (SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020) e 120 dias (TZOTZES et al., 2007), não relataram diferença nessas respostas. Inclusive, alguns trabalhos demonstraram que a exposição por 8 semanas na água de beber em camundongos reduziu a reatividade a Fenilefrina (DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010). Essas diferenças observadas entre os dados da literatura, podem sugerir que as alterações vasculares causadas pelo Cádmio são tempo-dependentes. Uma alteração nas concentrações de agentes moduladores da resposta contrátil poderia justificar essa alteração na resposta à fenilefrina observada nas aortas de ratos expostos ao Cádmio.

Para avaliar se o curto período de exposição ao Cádmio poderia ter alterado a modulação endotelial, a reatividade vascular à Fe foi comparada em anéis isolados de aorta na ausência (E-) e na presença do endotélio (E+). Embora a magnitude das respostas tenha sido similar entre os grupos, não foi descartado um desbalanço entre fatores relaxantes e contráteis induzidos pela exposição ao metal, e algumas vias vasoativas endoteliais foram testadas.

Como estudos anteriores já evidenciaram que a exposição crônica ao Cádmio pode reduzir a participação do NO em resposta à Fe (ALMENARA et al., 2013), essa via também foi avaliada. No entanto, de acordo com os resultados obtidos pela incubação com L-NAME, não foi observada alteração da modulação do NO sobre a resposta à Fe em anéis de aorta de ratos exposto ao Cádmio, quando comparados ao grupo Ct. Contudo, a expressão proteica da eNOS fosforilada (Ser<sup>1177</sup>) e a produção basal de NO se mostraram aumentadas em aorta de ratos expostos ao Cádmio quando comparados ao grupo Ct. Em outros contextos relativos a 30 e 60 dias de exposição ou incubação *in vitro*, o Cádmio parece alterar a reatividade vascular através de mecanismos dependentes do endotélio, diminuindo a biodisponibilidade do NO através do aumento do estresse oxidativo (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020)

Análises da exposição *in vitro* ao Cádmio em anéis de aorta, demonstraram redução da biodisponibilidade do NO sem alteração na expressão da eNOS (ANGELI et al., 2013). Em exposição por 30 dias em ratos, o aumento da produção de ânion superóxido reduziu a biodisponibilidade do NO, apesar do aumento da expressão proteica da eNOS e da produção basal de NO (ALMENARA et al., 2013). Em nosso estudo o aumento da ativação eNOS e da produção NO poderia ser decorrente de um mecanismo compensatório em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo Cádmio.

De fato, diversos trabalhos têm associado os danos cardiovasculares causados pela exposição ao Cádmio ao aumento do estresse oxidativo provocado pelo metal (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020). As espécies reativas de oxigênio (EROs) de maior relevância relacionadas a doenças cardiovasculares são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). (DHALLA; TEMSAH; NETTICADAN, 2000). Além de inibir a atividade da enzima Guanilato Ciclase solúvel (BRUNE; SCHMIDT; ULLRICH, 1990), aumentando a vasoconstrição, o  $O_2^{\cdot-}$  também reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) ao combinar-se com ele, formando ONOO<sup>-</sup> (peroxinitrito). (KAWASHIMA; YOKOYAMA, 2004). O  $H_2O_2$  também pode reagir com metais de transição, através de reação de Fenton, e formar radical hidroxila (OH•) (KAJARABILLE; LATUNDE-DADA, 2019). O Cádmio, entretanto, não tem capacidade de gerar radicais livres diretamente, pois não é um metal de Fenton (JOMOVA; VALKO, 2011).

O estresse oxidativo pode ser compensado pela ação de enzimas antioxidantes. Enquanto a Superóxido Dismutase (SOD) catalisa a transformação de

ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a Catalase (CAT) encarrega-se de transformar este último em  $H_2O + O_2$  (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004). Em nossos resultados não encontramos participação do ânion superóxido no aumento da reatividade vascular à Fe no grupo exposto, entretanto, a remoção catalítica do peróxido de hidrogênio, através da incubação de Catalase, reduziu a resposta contrátil à Fenilefrina apenas no grupo Cd.

Esses dados sugerem uma maior biodisponibilidade de  $H_2O_2$ , atuando como fator contrátil e contribuindo para o aumento da resposta à Fenilefrina. Essa hipótese foi confirmada através do protocolo de fluorescência com a sonda DCF-DA, onde observamos maior produção  $H_2O_2$  *in situ*. Além disso, expressão proteica da Catalase também estava reduzida no grupo exposto ao Cádmio. De fato, um estudo anterior demonstrou que o Cádmio pode interagir com o resíduo Gln167 da Catalase bloqueando a passagem de  $H_2O_2$  para o centro ativo da enzima, causando, assim, a redução da atividade da Catalase por impedimento estérico dos canais (WANG et al., 2015), o que também justifica o aumento de  $H_2O_2$  nos animais expostos ao metal.

Em exposição por 30 dias (100ppm) ao Cádmio, um estudo anterior do nosso grupo também observou a participação da Catalase no aumento do estresse oxidativo, sugerindo redução da atividade da enzima (ALMENARA et al., 2013). De fato, a redução da atividade da Catalase é unânime na grande maioria dos estudos com Cádmio, independente da dose, tempo de exposição e órgão alvo, sendo evidenciado nos rins, fígado, testículos e cérebro (CASALINO et al., 2002; SALOVSKY et al., 1992; SHUKLA et al., 1989).

Zhen et al. (2008) demonstraram que o aumento de  $H_2O_2$  em células endoteliais da artéria coronária humana levaram ao aumento compensatório da expressão da eNOS, o que poderia justificar o aumento da expressão proteica da eNOS fosforilada (Ser1177) encontrado nos animais expostos ao Cádmio no presente estudo.

Para identificar se haveria outra fonte responsável pelo aumento do  $H_2O_2$ , além da redução da expressão da Catalase, realizamos experimentos com inibidores da Xantina oxidase (XO), a qual seu principal produto é o  $H_2O_2$ , e da NADPH Oxidase, que catalisa a produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a partir da redução do  $O_2$  e elétrons doados pela NADPH+ (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000). A SOD endógena então, transforma  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ . No entanto, não observamos alterações significativas na reatividade vascular que indicassem alterações nestas enzimas.

A exposição crônica (30 dias - 100ppm) ao Cádmio identificou participação da NADPH oxidase no aumento do estresse oxidativo na aorta isolada de ratos (ALMENARA et al., 2013). Em nosso estudo, no entanto, identificamos que a expressão proteica da subunidade gp91<sup>phox</sup> estava reduzida, sugerindo redução da atividade da NOX2 em animais expostos em curto período.

Sabe-se que o NO reduz a atividade da NADPH oxidase em células endoteliais através de S-nitrosilação da subunidade p47<sup>phox</sup> (SELEMIDIS et al., 2007). Assim, supomos que o aumento de NO observado nos animais expostos ao Cádmio em nosso estudo tenha provocado redução da atividade da NOX2 por este mecanismo, o que refletiu na redução da expressão proteica de seu sítio catalítico (gp91<sup>phox</sup>).

Um estudo em aortas com exposição ao Cádmio *in vitro* evidenciou a participação da Angiotensina II (Ang II) no aumento da resposta contrátil à Fe. Além disso, nas células musculares lisas a Ang II é capaz de promover aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via ativação da NADPH Oxidase, e esse aumento é inibido pelo antagonista do receptor AT1, Losartan. (ZAFAR et al., 1998). No entanto, no presente estudo, não identificamos participação da Ang II no aumento da resposta contrátil à Fe em aorta isolada de animais expostos em curto prazo ao Cádmio.

Estudo anterior identificou um aumento da liberação de prostanóides vasoconstrictores em aorta isolada de ratos após exposição *in vitro* ao Cádmio (ANGELI et al., 2013). Além disso, outro estudo também observou comprometimento da via da ciclo-oxigenase em artérias de resistência após exposição intra-peritoneal ao Cádmio (14 dias-1mg/kg) (JÚNIOR et al., 2020). No presente estudo, verificamos uma redução da modulação positiva dos prostanóides em resposta à Fe em aorta isolada de animais expostos.

Essa redução na modulação positiva dos prostanóides, no entanto, não contribuiria para o aumento da reatividade à Fe em aorta de animais expostos verificado no presente estudo.

Além das vias vasoativas investigadas, sabe-se que por serem cátions bivalentes, os íons Cd<sup>2+</sup> podem ser transportados pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (MARTELLI et al., 2006). Outrossim, um dos mecanismos envolvidos na vasoconstrição mediada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também parece estar associado aos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem. (HOROWITZ et al., 1996)

O envolvimento dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  nas implicações promovidas pelo Cádmio foram evidenciados num estudo onde verificou-se que a resposta hipertensiva induzida pela administração aguda de Cádmio (1 a 10ug) intracerebroventricular foi prevenida pela administração de Verapamil (MADEDDU et al., 1993). No entanto, de acordo com nossos resultados, não evidenciamos a participação desses canais no aumento da reatividade à Fe em aorta de animais expostos ao Cádmio por 7 dias. Portanto, sugerimos que o aumento da reatividade à Fe parece estar associado ao aumento da liberação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como descrito anteriormente.

Trabalhos realizados em animais expostos cronicamente ao Cádmio, demonstraram que o metal pode comprometer o relaxamento dependente do endotélio, avaliado pela ACh, em aorta isolada de ratos e camundongos (ALMENARA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019). A ACh age nos receptores muscarínicos do endotélio vascular promovendo aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, o que leva à produção de prostaciclina, NO e hiperpolarização dependente do endotélio, que por sua vez irão se difundir para o músculo liso vascular, causando relaxamento (RATTMANN, 2009). Nossos resultados apontaram um prejuízo no relaxamento induzido pela ACh no grupo exposto ao Cádmio, indicando provável redução na produção dessas substâncias ou em sua ação sobre o músculo liso vascular. Estudo prévio do nosso laboratório (OLIVEIRA et al., 2019), verificou que o prejuízo do relaxamento em aorta isolada de camundongos expostos ao Cádmio estava associado à redução da biodisponibilidade do NO.

Como havíamos verificado maior produção de NO nos animais expostos por 7 dias ao Cádmio, decidimos investigar se existia algum prejuízo na sua ação sobre o músculo liso vascular, através do relaxamento independente do endotélio. De fato, nosso estudo demonstrou uma redução do relaxamento ao NPS em aorta de animais expostos quando comparados ao grupo Ct.

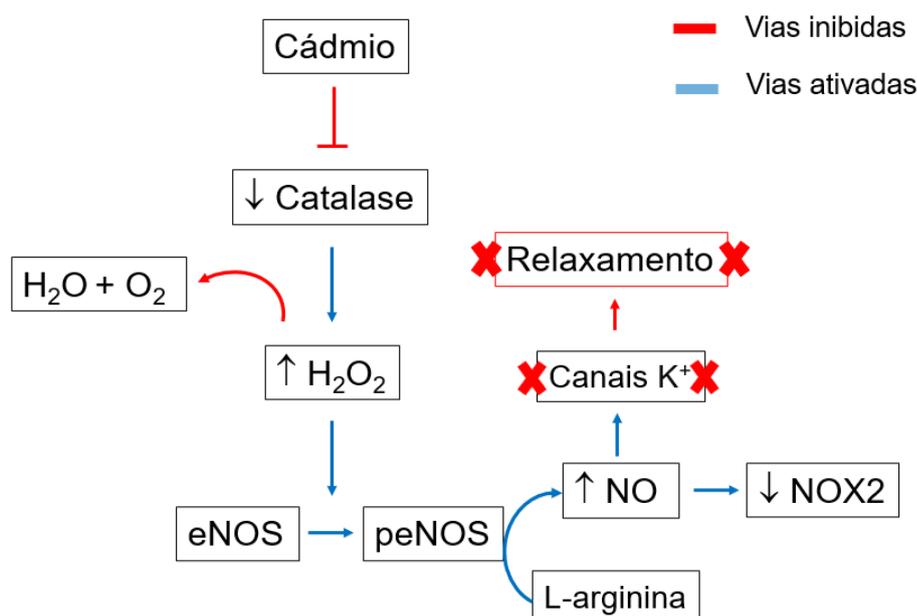
Embora tenhamos evidenciado que em curto período de exposição há um comprometimento do relaxamento independente do endotélio, trabalhos realizados com exposição crônica ao Cádmio (100 ppm (ALMENARA et al., 2013) e 15 ppm (BILGEN et al., 2003)), ou via intraperitoneal por 15 dias (1 mg/kg/dia) (GÖKALP et al., 2009) ou *in vitro* (ANGELI et al., 2013), não observaram diferenças. Isso sugere que um curto período de exposição ao Cádmio pode promover alterações vasculares distintas, contribuindo para a disfunção vascular após período crônico de exposição.

Como observamos redução no relaxamento ao NPS nos animais do grupo Cd, decidimos avaliar a via downstream do NO. Após ser liberado pelo endotélio, o NO age no músculo liso vascular estimulando a enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs), o que desencadeia uma cascata que resulta na vasodilatação (RATTMANN, 2009). Para investigar se o Cádmio havia alterado o downstream do NO, avaliamos a participação dessa enzima nas respostas ao NPS, através de seu inibidor, o Azul de metileno. No entanto, não observamos diferenças que indicasse prejuízo na GCs.

De fato, a via da Guanilato ciclase não é a única via pela qual o NO promove relaxamento do MLV. Por isso, além de induzir o relaxamento ao NPS em anéis pré contraídos com Fenilefrina, também realizamos a mesma curva com os anéis pré contraídos com KCl. Quando submetidos à altas concentrações de potássio, os canais para  $K^+$  são bloqueados assim sendo possível investigar sua participação no relaxamento ao NPS. Observamos que as respostas ao relaxamento se igualaram, indicando uma alteração dos canais para potássio ( $K^+$ ).

Em um estudo com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foi observado que a redução da resposta relaxante ao  $H_2O_2$  estava associada a disfunção na atividade de canais para  $K^+$ . (GAO et al., 2004)

Nossos achados demonstraram que mesmo em um curto período de exposição e em baixa concentração, o Cádmio produziu aumento da reatividade vascular à Fenilefrina associado a redução da expressão da Catalase e ao consequente aumento do  $H_2O_2$ . Acreditamos que o bloqueio da Catalase foi induzido pelo Cádmio. Houve ainda uma redução da atividade da NOX2 e um aumento da atividade da peNOS a da liberação basal de NO, que mesmo se elevando, não foi capaz de contrapor o estresse oxidativo causado pelo Cádmio. Supomos que isso ocorreu em razão de um prejuízo nos canais para  $K^+$  que participam ativamente no relaxamento do músculo liso vascular ao NO (BOLOTINA et al., 1994). Como nosso estudo foi realizado com 7 dias de exposição, consideramos que esse seria o mecanismo inicial pelo qual o Cádmio produz disfunção vascular, predispondo, assim, ao aparecimento de diversas doenças cardiovasculares (Figura 34).



**Figura 33:** Resumo gráfico dos achados do presente estudo com sugestão de mecanismos pelo qual a exposição aguda ao Cádmio leva à disfunção vascular após 7 dias de exposição. A interação do Cádmio inibindo a Catalase promoveu aumento do estresse oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, impossibilitando sua degradação em H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> age de forma compensatória estimulando a eNOS a produzir óxido nítrico (NO), que por sua vez pode atuar reduzindo a atividade do NOX2 através da S-nitrosilação. Apesar do aumento da produção basal de NO, um possível comprometimento dos canais de K<sup>+</sup> na musculatura lisa vascular impede que o relaxamento ocorra plenamente.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados demonstraram que mesmo em um curto período de exposição (7 dias) e em baixas concentração plasmática ( $1,66 \pm 0,38 \mu\text{g/L}$ ), o Cádmio foi capaz de aumentar a pressão arterial sistólica de ratos. Além disso, foi observado aumento da resposta contrátil à Fenilefrina, e redução da resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio em aorta isolada de ratos. Esses resultados foram justificados pela inibição da Catalase induzida pelo Cádmio, que pode ter provocado aumento do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O aumento de peróxido de hidrogênio e a redução do relaxamento exercido pela abertura dos canais para potássio provocaram prejuízo no relaxamento desses vasos. Com os canais menos ativos, a modulação da contratilidade exercida pelo NO estaria prejudicada, mas foi balanceada por um aumento da atividade da eNOS e da produção basal de NO.

Nossos resultados evidenciam a toxicidade do Cádmio no sistema cardiovascular e reforçam a hipótese de que indivíduos que possuem concentração mais elevada de Cádmio no plasma, como os fumantes e pessoas expostas ocupacionalmente, tem maiores chances de apresentar aumento da pressão arterial e disfunção vascular.

Assim, compreendidos alguns dos mecanismos pelos quais a exposição Cádmio age na vasculatura da aorta em exposições por curto período, sugerimos que mais estudos sejam realizados a fim de identificar possíveis terapias que reduzam os danos vasculares nesses casos.

## 7 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.
- AFRIDI, H. I. et al. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. **Journal of Human Hypertension**, v. 24, n. 1, p. 34–43, 2010.
- ALMENARA, C. C. P. et al. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68418, 2013.
- ALSBERG, C. L.; SCHWARTZE, E. W. Pharmacological action of cadmium. **J. Pharmacol**, v. 13, n. Exp. Ther., p. 504–505, 1919.
- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). **Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices**. ACGIH Worldwide, Signature Publications. **Anais**, 2007
- 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 and Medicine**, v. 65, p. 838–848, 2013.
- AOKI, A.; HOFFER, A. P. Reexamination of the Lesions in Rat Testis Caused by Cadmium. **Biology of Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 579–591, 1978.
- BALARAMAN, R. et al. The acute pressor response to cadmium in rats. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 301, p. 254–266, 1989.
- BÁRÁNY, M. **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. [s.l.] Elsevier, 1996.
- BERNARD, A. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. **BioMetals**, v. 17, n. 5, p. 519–523, 2004.
- BILGEN, I. et al. Involvement of Cholinceptors in Cadmium-Induced Endothelial Dysfunction. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 14, n. 1, 2003.
- BLAUSTEIN, M. P.; HAMLIN, J. M. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the Na<sup>+</sup> pump, the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and TRPC proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 12, p. 1219–1229, 2010.
- BLAZKA, M. E.; SHAIKH, Z. A. Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: Role of calcium channels. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 355–363, 1991.

BOHLEN, H. G. Nitric Oxide and the Cardiovascular System. In: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2015. p. 803–828.

BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850–853, 1994.

BRANCA, J. J. V.; MORUCCI, G.; PACINI, A. Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 11, p. 1879–1882, 2018.

BRIEGER, K. et al. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, 2012.

BRUNE, B.; SCHMIDT, K.-U.; ULLRICH, V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. **European Journal of Biochemistry**, v. 192, n. 3, p. 683–688, 1990.

BULMER, F. M. R.; ROTHWELL, H. E.; FRANKISH, E. R. Industrial Cadmium Poisoning: A Report of Fifteen Cases, Including Two Deaths. **Canadian Public Health Journal**, v. 29, p. 19- 26 (8 pages), 1938.

BUVELOT, H.; JAQUET, V.; KRAUSE, K.. Mammalian NADPH oxidases. **NADPH Oxidases**, p. 17-36, 2019.

CASALINO, E. et al. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. **Toxicology**, v. 179, n. 1–2, p. 37–50, 2002.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Significado Ambiental e Sanitário das Variáveis de Qualidade das Águas e dos Sedimentos e Metodologias Analíticas e de Amostragem. **Qualidade das Águas Doces no Estado de São Paulo**, Apêndice E, 2009. p. 9.

COPEL, R. et al. Uptake of cadmium from Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in British Columbia oyster growers. **Environmental Research**, v. 107, n. 2, p. 160–169, 2008.

DA COSTA, C. S. et al. Subacute cadmium exposure disrupts the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, leading to polycystic ovarian syndrome and premature ovarian failure features in female rats. **Environmental Pollution**, v. 269, p. 116154, 2021.

DAVIDGE, S. T. Prostaglandin H Synthase and Vascular Function. **Circulation Research**, v. 89, n. 8, p. 650–660, 2001.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655–673, 2000.

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.

DUARTE, E. B. et al. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. **Chemosphere**, v. 262, p. 127879, 2021.

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.

FADLOUN, Z.; LEACH, G. D. H. The effects of Cd<sup>2+</sup> on the myogenic activity and the responsiveness of the rat portal vein to perimural stimulation, noradrenaline and potassium ions. **British Journal of Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 181, 1980.

FARO, A. R. M. DA C. DE et al. Serum cadmium levels in a sample of blood donors in the Western Amazon, Brazil, 2010-2011. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 2, p. 403–414, 2014.

FAROON. **Toxicological Profile for Cadmium**. [s.l.] CRC Press, 2002.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical Science**, v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009.

FENDE, P. L.; NIEWENHUIS, R. J. An Electron Microscopic Study of the Effects of Cadmium Chloride on Cryptorchid Testes of the Rat. **Biology of Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 298–305, 1977.

FRIBERG, L. et al. **Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal: Volume II: Effects and response**. 1985. Reeditado pela CRC press, 2019.

FRÖLICH, J. C.; FÖRSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research**, v. 19, p. 211–5, 1989.

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. 175–180, 1998.

FUKATA, Y. et al. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 32–39, 2001.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GABRIEL, F. Â. et al. Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. **PeerJ**, v. 8, p. e10266, 2020.

GAO, Y.-J. et al. Vascular relaxation response to hydrogen peroxide is impaired in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 1, p. 143–149, 2004.

GAO, Y. J. et al. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 6, p. 1085–1092, 2003.

GARCÍA-REDONDO, A. B. et al. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. **Pharmacological Research**, v. 114, p. 110–120, 2016.

GHOSH, D. et al. Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. **Advances in Pharmacology**, v. 78, p. 49-87, 2017.

GÖKALP, O. et al. Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in cadmium-hypertensive rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, n. 7, p. 447–453, 2009.

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H Oxidase. **Circulation Research**, v. 86, n. 5, p. 494–501, 2000.

HAGINO, N.; YOSHIOKA, Y. A study of the etiology of Itai-Itai disease. **J. Jpn. Orthop. Assoc.**, v. 35, p. 812–815, 1960.

HE, L. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 2017.

HOEY, M. J. The effects of metallic salts on the histology and functioning of the rat testis. **Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 461-NP, 1966.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews**, v. 76, n. 4, p. 967–1003, 1996.

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; KEMP-HARPER, B. K. NO<sup>-</sup> Activates Soluble Guanylate Cyclase and Kv Channels to Vasodilate Resistance Arteries. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1301–1307, 2003.

ISHOLA, A. B. et al. Serum level of lead, zinc, cadmium, copper, and chromium among occupationally exposed automobile workers in Benin city. **International Journal of Environment and Pollution Research**, v. 5, n. 1, p. 70–79, 2017.

JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 173–178, 2000.

JACOBSON, K. B.; TURNER, J. E. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. **Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 1–37, 1980.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2–3, p. 65–87, 2011.

JÚNIOR, J. E. G. P. et al. Cadmium exposure activates NADPH oxidase, renin-angiotensin system and cyclooxygenase 2 pathways in arteries, inducing

hypertension and vascular damage. **Toxicology Letters**, v. 333, p. 80–89, 2020.

KAJARABILLE; LATUNDE-DADA. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4968, 2019.

KAR, A. B.; DAS, R. P. Testicular changes in rats after treatment with cadmium chloride. **Acta Biol**, v. 5, n. Med. Ger., p. 153– 173., 1960.

KAWASHIMA, S.; YOKOYAMA, M. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 6, p. 998–1005, 2004.

KIM, H. R. et al. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165–2180, 2008.

KIM, S. D. et al. Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 1, p. 326–334, 2005.

KONUKOGLU, D.; UZUN, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. **Hypertension: from basic research to clinical practice**, p. 511-540, 2016.

KUKONGVIRIYAPAN, U. et al. Curcumin protects against cadmium-induced vascular dysfunction, hypertension and tissue cadmium accumulation in mice. **Nutrients**, v. 6, n. 3, p. 1194–1208, 2014.

KUMAR, S. et al. Shear stress stimulates nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial cells via a reduction in catalase activity: role of protein kinase C $\delta$ . **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 298, n. 1, p. L105–L116, 2010.

KUMAR, S.; SHARMA, A. Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. **Reviews on Environmental Health**, v. 34, n. 4, p. 327–338, 2019.

LAMOUNIER-ZEPTER, V.; BALTAS, L. G.; MORANO, I. Distinct Contractile Systems for Electromechanical and Pharmacomechanical Coupling in Smooth Muscle. **Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction**. Springer, Boston, MA, 2003. p. 417-426.

LAMPE, B. J. et al. Association between 24-Hour Urinary Cadmium and Pulmonary Function among Community-Exposed Men: The VA Normative Aging Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 9, p. 1226–1230, 2008.

LI, Jian-Jun; CHEN, Ji-Lin. Inflammation may be a bridge connecting hypertension and atherosclerosis. **Medical hypotheses**, v. 64, n. 5, p. 925-929, 2005.

LIN, H.-C.; HAO, W.-M.; CHU, P.-H. Cadmium and cardiovascular disease: An overview of pathophysiology, epidemiology, therapy, and predictive value. **Revista**

**Portuguesa de Cardiologia**, v. 40, n. 8, p. 611–617, 2021.

LINCOLN, T. M.; DEY, N.; SELLAK, H. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 3, p. 1421–1430, 2001.

MADEDDU, P. et al. Verapamil Prevents the Acute Hypertensive Response to Intracerebroventricular Cadmium in Conscious Normotensive Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 6, n. 3, p. 193–197, 1993.

MAJUMDER, S. et al. Cadmium reduces nitric oxide production by impairing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 86, n. 1, p. 1–10, 2008.

MANCA, Dino et al. Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium. **Archives of toxicology**, v. 68, n. 6, p. 364–369, 1994.

MARTELLI, A. et al. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1807–1814, 2006.

MATLUNG, H. L.; BAKKER, E. N. T. P.; VANBAVEL, E. Shear Stress, Reactive Oxygen Species, and Arterial Structure and Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 7, p. 1699–1709, 2009.

MEIJER, G. W. et al. Cadmium and atherosclerosis in the rabbit: reduced atherogenesis by superseding of iron?. **Food and chemical toxicology**, v. 34, n. 7, p. 611–621, 1996.

MILSTIEN, S.; KATUSIC, Z. Oxidation of Tetrahydrobiopterin by Peroxynitrite: Implications for Vascular Endothelial Function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 681–684, 1999.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis Research**, v. 11, n. 3, p. 323–344, 1977.

MUNJAL, A.; BORDONI, B. Histology, vascular. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2021.

NIGRA, A. E. et al. Environmental Metals and Cardiovascular Disease in Adults: A Systematic Review Beyond Lead and Cadmium. **Current Environmental Health Reports**, v. 3, n. 4, p. 416–433, 2016.

NORDBERG G.F. et al. Cadmium. In: **Handbook on the Toxicology of Metals**. Amsterdam: Elsevier. 2007; 445–486.

NORDBERG, G. F.; KJELLSTRÖM, T. Metabolic model for cadmium in man. **Environmental Health Perspectives**, v. 28, p. 211–217, 1979.

NORDIC COUNCIL OF MINISTERS. Cadmium Review. **UNEP Governing Council**, n. 4, p. 26, 2003.

NR 7, NORMA REGULAMENTADORA - 7 (2022) Programa de controle médico de saúde ocupacional. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. Portaria MTP n.º 567, de 10 março de 2022.

OLIVEIRA, T. F. et al. Chronic Cadmium Exposure Accelerates the Development of Atherosclerosis and Induces Vascular Dysfunction in the Aorta of ApoE<sup>-/-</sup> Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 187, n. 1, p. 163–171, 2019.

PAŘÍZEK, J. Effect of Cadmium Salts on Testicular Tissue. **Nature**, v. 177, n. 4518, p. 1036–1037, 1956.

PLEHM, R.; BARBOSA, M. E.; BADER, M. Animal models for hypertension/blood pressure recording. **Methods in molecular medicine**, v. 129, n. Cardiovascular Disease, p. 115–126, 2006.

PROZIALECK, W. C. et al. The Vascular System as a Target of Metal Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 102, n. 2, p. 207–218, 2008.

PROZIALECK, W. C.; EDWARDS, J. R.; WOODS, J. M. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. **Life Sciences**, v. 79, n. 16, p. 1493–1506, 2006.

PUGSLEY, M. K.; TABRIZCHI, R. The vascular system. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 2, p. 333–340, 2000.

RAMESHRAD, M. et al. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. **Life Sciences**, v. 145, p. 190–204, 2016.

RATTMANN, Y. D. Mecanismos endoteliais envolvidos nos efeitos vasculares da dicksonia sellowiana (**Presl.**) Hook. 2009. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

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.

REYES-HINOJOSA, D. et al. Toxicity of cadmium in musculoskeletal diseases. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 72, p. 103219, 2019.

ROSSI, E. M. et al. Chronic Iron Overload Restrains the Benefits of Aerobic Exercise to the Vasculature. **Biological Trace Element Research**, v. 198, n. 2, p. 521–534, 2020.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 250, n. 5, p. H815–H821, 1986.

SABOLIĆ, I. et al. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. **BioMetals**, v. 23, n. 5, p. 897–926, 2010.

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

SADEGHI, Naficeh et al. The relationship between bone health and plasma zinc, copper lead and cadmium concentration in osteoporotic women. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2014.

SAHRAWAT, T. R.; CHATTERJEE, D. Time-Dependent Model to Mimic Acetylcholine Induced Vasodilatation in Arterial Smooth Muscle Cells. **International Letters of Natural Sciences**, v. 52, p. 60–66, 2016.

SALOVSKY, P. et al. Changes in antioxidant lung protection after single intra-tracheal cadmium acetate instillation in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 11, n. 3, p. 217–222, 1992.

SANGARTIT, W. et al. Tetrahydrocurcumin Protects against Cadmium-Induced Hypertension, Raised Arterial Stiffness and Vascular Remodeling in Mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114908, 2014.

SANTAMARIA-JUAREZ, C. et al. Aortic dysfunction by chronic cadmium exposure is linked to multiple metabolic risk factors that converge in anion superoxide production. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1–9, 2020.

SATARUG, S. et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. **Toxicology Letters**, v. 137, n. 1–2, p. 65–83, 2003.

SATARUG, S. et al. Cadmium-induced nephropathy in the development of high blood pressure. **Toxicology Letters**, v. 157, n. 1, p. 57–68, 16 maio 2005.

SATARUG, S. Dietary Cadmium Intake and Its Effects on Kidneys. **Toxics**, v. 6, n. 1, p. 15, 10 mar. 2018.

SELEMIDIS, S. et al. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. **Cardiovascular research**, v. 75, n. 2, p. 349–358, 2007.

SHUKLA, G. S. et al. Glutathione peroxidase and catalase in liver, kidney, testis and brain regions of rats following cadmium exposure and subsequent withdrawal. **Industrial Health**, v. 27, n. 2, p. 59–69, 1989.

SKEGGS, L. T. et al. The existence of two forms of hypertensin. **The Journal of experimental medicine**, v. 99, n. 3, p. 275–82, 1954.

**Smart Servier**. Disponível em: <<https://smart.servier.com/>>. Acesso em: 23 jan. 2022.

SOMBERG, L. B. et al. Shock associated with endothelial dysfunction in omental microvessels. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 1, p. 30–37, 2017.

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.

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.

STURTZEL, Caterina. Endothelial cells. **The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology**, p. 71-91, 2017.

TAHA, M. M. et al. Impact of occupational cadmium exposure on bone in sewage workers. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 24, n. 3–4, p. 101–108, 2018.

TARAKINA, N. V.; VERBERCK, B. A portrait of cadmium. **Nature Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 96–96, 2017.

TELLEZ-PLAZA, M. et al. Cadmium Exposure and Incident Cardiovascular Disease. **Epidemiology**, v. 24, n. 3, p. 421–429, 2013.

THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 304–315, 2008.

TINKOV, A. A. et al. Gut as a target for cadmium toxicity. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 429–434, 2018.

TOUYZ, Rhian M. Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure--implications in the pathogenesis of hypertension. **The Canadian journal of cardiology**, v. 16, n. 9, p. 1137-1146, 2000.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. 4, p. 339–352, 2004.

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.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 97–120, 1998.

VASSALLO, D. V. et al. Preliminary Studies of Acute Cadmium Administration Effects on the Calcium-Activated Potassium (SKCa and BKCa) Channels and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity in Isolated Aortic Rings of Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 183, n. 2, p. 325–334, 2018.

WAALKES, M. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 533, n. 1–2, p. 107–120, 10 dez. 2003.

WANG, J. et al. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 59–67, 2015.

WILLIAMS, Bryan et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). **European heart journal**, v. 39, n. 33, p. 3021-3104, 2018.

WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 134: Cadmium. **WHO: Geneva, Switzerland**, 1992.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411–415, 1988.

YOOPAN, N. et al. Contribution of cholinergic muscarinic functions in cadmium-induced hypertension in rats. **Toxicology Letters**, v. 164, p. S155, 2006.

YOOPAN, N. et al. Attenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 2, p. 157–161, 2008.

ZAFAR, A. M. et al. Role of NADH/NADPH Oxidase–Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Angiotensin II–Induced Vascular Hypertrophy. **Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 488–495, 1998.

ZHANG, T. et al. The effects of long-term exposure to low doses of cadmium on the health of the next generation of mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 312, p. 108792, 2019.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, 2015.

ZHEN, J. et al. Upregulation of Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Reactive Oxygen Species. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 28–34, 2008.