

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**THIAGO FERNANDES DE OLIVEIRA**

**Efeitos sexo-dependentes da exposição  
crônica ao cádmio sobre a reatividade  
vascular de ratos**

Vitória

2022

**THIAGO FERNANDES DE OLIVEIRA**

**Efeitos sexo-dependentes da exposição crônica ao cádmio sobre a reatividade vascular de ratos**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

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

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Camila Almenara Cruz  
Pereira

**VITÓRIA**

**2022**



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

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DO CANDIDATO AO GRAU DE DOUTOR PELO PPGCF CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS.**

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “EFEITOS SEXO-DEPENDENTES DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CÁDMIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS” elaborada por THIAGO FERNANDES DE OLIVEIRA, candidato ao Grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 01 de dezembro de 2022, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

Aprovada

---

Reprovada

---

Vitória, ES – 01 de dezembro de 2022.

*Priscila Rossi de Batista*

---

Profª. Drª. Alessandra Simão Padilha  
(PPGCF-UFES) – Orientadora

---

Profª. Drª. Priscila Rossi de Batista  
(EMESCAM) - Titular externa

---

Profª. Drª. Ivanita Stefanon  
(PPGCF-UFES) – Titular interna

*Marcelo Perim Baldo*

---

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo  
(UNIMONTES) – Titular externo

Marcelo Perim Baldo  
Assinado de forma digital por Marcelo Perim Baldo  
Dados: 2022.12.01 19:07:46 -03'00'

---

Prof. Dr. Leonardo dos Santos  
(PPGCF-UFES) – Titular interna





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  
IVANITA STEFANON - SIAPE 99991266  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - PPGCFI/CCS  
Em 07/12/2022 às 20:23

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/618510?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  
LEONARDO DOS SANTOS - SIAPE 1803126  
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS  
Em 24/02/2023 às 16:22

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/657137?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 24/02/2023 às 18:33

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/657187?tipoArquivo=O>

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

O48e Oliveira, Thiago Fernandes de, 1991-  
Efeitos sexo-dependentes da exposição crônica ao cádmio sobre a reatividade vascular de ratos / Thiago Fernandes de Oliveira. - 2022.  
73 f. : il.

Orientadora: Alessandra Simão Padilha.

Coorientadora: Camila Almenara Cruz Pereira.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. reatividade vascular. 2. diferenças sexuais. 3. exposição ao cádmio. I. Padilha, Alessandra Simão. II. Pereira, Camila Almenara Cruz. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

---

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”  
(Marthin Luther King)

## AGRADECIMENTOS

Foram 4 anos de muita dedicação e de percalços por quais pessoas muito importantes para mim fizeram que eu não desistisse em nenhum momento.

Primeiro agradeço a Deus, por ter me dado saúde, sabedoria e ter colocado pessoas que me incentivaram, me deram as oportunidades de conhecer uma vocação que até então eu não imaginava que tinha.

Agradeço também aos meus pais por todo suporte que me deram. Por terem aberto mão dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus e por toda educação e amor. Minha irmã que me ajudava sempre que precisava e falava que estava tudo bem quando eu não tinha muita motivação para continuar.

Minha noiva, Juliana por ter me apoiado e me incentivado em cada fase desses anos e ser uma das minhas fontes de inspiração.

A minha orientadora, Alessandra Padilha, por todos os ensinamentos dado tanto no mestrado e agora no doutorado. Ter aberto as portas da pós graduação e por ser uma grande amiga.

A minha coorientadora, Camila Almenara, por ter me ensinado com muita paciência, ter acreditado em meu potencial e ser uma amiga incrível.

Aos meus amigos do laboratório e da pós graduação, Bárbara, Larissa, Rakel, Marquinhos, Renata, Marito, Gilson, Emilly, Filipe, Felipe, Maylla e João.

Aos amigos Patrick, Rosiane, Thainan Souto pela amizade e pelas ajudas durante o período.

Aos professores da pós graduação meu eterno carinho, por todo o conhecimento ensinado e toda a dedicação que tiveram na formação de diversos mestres e doutores durante o período.

Aos professores Leonardo dos Santos, Ivanita Stefanon, Dalton Vassallo, Silvana Meyrelles e Juliana Hott agradeço de coração todo o carinho que tiveram por mim e todos os ensinamentos e orientação que foram dadas.

Nenhuma palavra que eu descreva nesse breve relato de agradecimento demonstrará o quanto sou grato a essas pessoas por tudo que fizeram por mim e para a minha família.

À CAPES, FAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Formas de exposição ao Cd e supostos mecanismos que estão associados ao desenvolvimento da hipertensão arterial. Com o aumento da concentração de Cd na corrente sanguínea ocorre; 1- 2- aumento da atividade do sistema nervo simpático, 3- aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), 4- redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e 5- aumento da proteína 1 de adesão celular vascular (VCAM1) e chaperonina 60 (HSP60). O aumento das ERO e a redução do NO induz disfunção endotelial. Almenara et al. (2020).

Figura 2: (A) Aorta torácica imersa na placa de petri, banhada com solução de Krebs-Henseleit, momentos antes da remoção do tecido adiposo perivascular (TAP). (B) Após a extração do TAP, o segmento de aorta sendo cortado em anéis de 4 mm aproximadamente (Angeli, 2009).

Figura 3: Esquema ilustrativo de preparação dos segmentos isolados de aorta para análise da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados Biopac System (Angeli, 2013).

Figura 4: Registro gráfico com curvas representando os testes realizados para avaliação do músculo liso vascular e a integridade funcional do endotélio vascular. (A) período inicial de 30 min de estabilização, com tensão próxima a 1g. (B) 1° dose de KCl (75 mM). (C) Troca de solução de Krebs- Henseleit para remover o KCl. (D) Período de estabilização após o 1° KCl. (E) 2° KCl. (F) Período de 30 min onde ocorre a contração máxima ao KCl. (G) Troca de solução de Krebs-Henseleit para remover o KCl. (H) Período de 30 min de estabilização (I) Pré contração do anel de aorta com Fe ( $10^{-6}$  M). (J) Período onde ocorre estabilização a contração a Fe. (L) Adição da ACh ( $10^{-5}$  M). No eixo das abscissas observamos o tempo e no eixo das ordenadas a tensão em g que os anéis estavam expostos (Dias, 2011).

Figura 5: Média (e EPM) das atividade da MPO no sangue de Wistar machos e fêmeas do grupo Ct e do grupo Cd após 30 dias de exposição ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey. \*P <0.05 Controle macho. #P <0.05 Controle fêmeas. Amostra: CdM (13); CtM (14); CdF (17) e CtF (10).

Figura 6: Valores expressos em média e EPM; ANOVA 2 Vias. n= 9 para controle e n=6 para cádmio. \*p<0,05 comparação do dia 30 entre o grupo controle machos e grupo cádmio machos, #p<0,05 comparação do dia 30 entre o grupo cádmio macho e grupo cádmio fêmea. Valores em mmHg.

Figura 7: Os símbolos representam media +- EPM. A curva de ACh foi iniciada após contração máxima à fenilefrina. Não há diferença estatística entre as curvas (p>0,05). O número de animais está representado entre parênteses. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. Molar (M)

Figura 8: Os símbolos representam media +/- EPM, expressos como percentual de relaxamento ap NPS após a pré-contração com fenilefrina. O número de animais está representado entre parênteses. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. Molar (M)

Figura 9: Os símbolos representam media +- EPM expressos como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina. O número de animais está representado entre parênteses. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. Molar (M)

Figura 10: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em segmentos de aorta de ratas dos grupos Controle e Cádmio. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t de Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. \*p< 0,05.

Figura 11: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença da enzima catalase em segmentos de aorta de Wistar machos e fêmeas dos grupos

Controle e Cádmio. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t de Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. \*p< 0,05. Molar (M)

Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da apocinina em segmentos de aorta de ratas Wistar dos grupos Controle e Cádmio. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. Anova 2 vias com poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. Molar (M)

Figura 13: Expressão proteica da peNOS, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta abdominal de fêmeas dos grupos Controle (n=5) e Cádmio (n=3). Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  EPM, como relação entre a densidade das bandas da peNOS e da proteína total. Teste-t Student não pareado, p>0,05.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

Acetilcolina (ACh)

Apocinina (Apo)

Áreas abaixo da curva (AUC)

Cádmio (Cd)

Catalase (Cat)

Cloreto de potássio (KCl)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq)

Diferenças das áreas abaixo das curvas (dauc)

Doenças cardiovasculares (DCV)

Erro padrão da média (EPM)

Estrogênio (E2)

Fenilefrina (Fe)

Inibidor não-seletivo da NOS, o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Metalotioneína (MT)

Mieloperoxidase (MPO)

Nitroprussiato de sódio (NPS)

Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

Óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico sintase (NOS)

Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Partículas por milhão (PPM)

Resposta máxima (R<sub>máx</sub>)

Sensibilidade (pd<sub>2</sub>)

Transportador de metais divalentes (DMT1)

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	ASPECTOS GERAIS SOBRE O CÁDMIO .....	13
1.2.	EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO.....	14
1.3.	ABSORÇÃO DO CÁDMIO PELO ORGANISMO .....	15
1.4.	EFEITOS DO CÁDMIO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	17
1.5	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E CÁDMIO.....	19
1.6	RELAÇÃO ENTRE ESTROGÊNIO E CÁDMIO .....	21
2.	JUSTIFICATIVA .....	24
3.	OBJETIVOS .....	25
3.1.	Objetivos gerais.....	25
3.2.	Objetivos específicos .....	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1.	ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	26
4.2	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	26
4.2.1	Peso dos animais antes e após a exposição ao Cádmio.....	26
4.2.2	Dosagem do Cádmio e do estrogênio.....	27
4.2.3	Verificação da pressão arterial sistólica .....	27
4.2.4	Obtenção dos anéis isolados de aorta torácica.....	27
4.2.5	Efeitos da exposição por trinta dias ao $\text{ClCd}_2$ sobre a via do NO .....	31
4.2.6	Participação das espécies reativas de oxigênio na exposição por trinta dias ao $\text{ClCd}_2$ sobre a resposta contrátil à Fe .....	31
4.2.7	Participação dos prostanóides na exposição por trinta dias ao $\text{ClCd}_2$ sobre a resposta contrátil à Fe.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.3	Dosagem do mieloperoxidase (MPO).....	31
4.4	Análise proteica através do Western Blotting.....	32
4.5	Expressão dos resultados e análise estatística.....	33

5	RESULTADOS .....	34
5.1	Concentração plasmática de cádmio e estrogênio .....	34
5.2	Peso dos animais.....	34
5.3	Mieloperoxidase .....	35
5.4	Avaliação da pressão arterial sistólica.....	35
5.5	REATIVIDADE VASCULAR .....	36
5.5.1	Resposta Vascular ao KCl.....	36
5.5.2	Efeito da exposição crônica ao $\text{ClCd}_2$ por 30 dias sobre o relaxamento dependente do endotélio em anéis isolados de aorta .....	37
5.5.3	Efeito da exposição ao $\text{ClCd}_2$ por 30 dias sobre a reatividade à fenilefrina em anéis isolados de Wistar .....	40
5.5.4	Participação da via do óxido nítrico na exposição por 30 dias com $\text{ClCd}_2$ sobre a resposta vasoconstritora em aorta torácica .....	41
5.5.5	Participação de espécies reativas de oxigênio na exposição por 30 dias com $\text{ClCd}_2$ sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica .....	43
5.6	Expressão proteica.....	46
5.6.1	Expressão proteica da eNOS.....	46
6	DISCUSSÃO .....	46
6.1	CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CÁDMIO.....	47
6.2	EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO $\text{ClCd}_2$ NO GANHO PONDERAL.....	48
6.3	EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO NA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	49
6.4	ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE .....	51
6.5	CONCENTRAÇÃO DE ESTROGÊNIO .....	52
6.6	EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA E AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO.....	53
6.7	EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA .....	54

6.8	EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE A VIA DO NO .....	55
6.9	EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE A VIA DOS RADICAIS LIVRES .....	57
7	CONCLUSÃO .....	59
8	REFERÊNCIAS .....	60

## RESUMO

**Introdução:** As doenças cardiovasculares são as maiores causas de morte no mundo, e a maior prevalência em homens na idade adulta que se iguala após a menopausa em mulheres indica a possibilidade de proteção do sistema cardiovascular exercida provavelmente por ação dos hormônios sexuais femininos. A exposição ao cádmio (Cd) está associada a diversas doenças cardiovasculares, como aterosclerose e hipertensão arterial, provavelmente por induzir estresse oxidativo e disfunção vascular. Como a totalidade dos estudos experimentais dos efeitos do Cd sobre a vasculatura têm sido feitos em machos, não se sabe se fêmeas teriam a função vascular afetada pela exposição a esse metal. A hipótese desse estudo é que a exposição ao Cd interfere de forma distinta nas respostas vasculares da aorta de ratos machos e fêmeas, devido a ação protetora do estrogênio sobre a função vascular. **Objetivo:** Comparar efeitos da exposição crônica ao cloreto de cádmio 100 ppm sobre a função vascular de artérias de condutância de Wistar machos e fêmeas. **Material e**

**Métodos:** os experimentos foram realizados em Wistar machos e fêmeas com 3 meses de idade que receberam cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$  100 mg/L em água potável durante 30 dias) ou veículo (água filtrada). Antes do início da exposição e ao final desta, foram registrados pressão arterial sistólica e o peso dos animais. Após os 30 dias de exposição ao metal, os animais foram eutanasiados e foram coletados sangue para a dosagem de cádmio e estrogênio, e aorta torácica para a avaliação da reatividade vascular. **Resultados:** Wistar fêmeas expostas ao Cd tiveram menor ganho de peso sem alterações significativas da pressão arterial sistólica após exposição ao metal. A exposição ao Cd também não alterou o nível de estrogênio nas ratas, em comparação as fêmeas do grupo controle. Na análise da mieloperoxidase (MPO) foi encontrado aumento da atividade dessa enzima em ambos os grupos expostos ao metal. A exposição ao cádmio produziu uma concentração do metal no sangue de 2,89  $\mu\text{g/L}$  contra 0,27  $\mu\text{g/L}$  encontrada nas fêmeas não expostas, nos machos foi observado aumento da concentração do metal em relação as fêmeas, machos expostos tiveram 4,7  $\mu\text{g/L}$  e não expostos 0,3  $\mu\text{g/L}$ . Os machos tiveram redução da resposta vasodilatadora na curva de ACh e não foi observado alteração ao NPS. Na curva dose-resposta a Fe teve aumento da resposta contrátil. Não foi encontrada alteração na resposta vascular à Fenilefrina (Fe), Acetilcolina (ACh) e ao Nitroprussiato de sódio (NPS) nas fêmeas. A incubação com L-NAME deslocou a curva concentração-resposta à Fe nos dois grupos, mas esse efeito foi menor em machos expostos ao Cd, sugerindo redução da biodisponibilidade de óxido nítrico. Além disso, a incubação com apocinina e catalase, reduziu a resposta à Fe em machos expostos ao Cd, sugerindo participação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente, na hiper-reatividade produzida pela exposição ao metal. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição por 30 dias ao Cd produz aumento de pressão arterial e alterações vasculares em machos, mas não em fêmeas, sugerindo que as anormalidades cardiovasculares induzidas pelo metal são sexo-dependentes.

Palavras chaves: reatividade vascular, diferenças sexuais e exposição ao cádmio.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Exposure to Cd is associated with several cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and arterial hypertension, probably by inducing oxidative stress and vascular dysfunction. Cardiovascular diseases are the major causes of death in the world and the higher prevalence in men increased the possibility of women of childbearing age to present a protection of the cardiovascular system, probably due to the action of female sex hormones. As studies of the effects of Cd on the vasculature were carried out in males, it is not known whether females would have vascular function affected by exposure to this metal.

**Objective:** To analyze the effects of chronic exposure to 100 ppm cadmium chloride on the vascular function of male and female Wistar conductance arteries.

**Material and Methods:** The experiments were performed on 3-month-old male and female Wistar who received cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$  100 mg/L in drinking water for 30 days) or vehicle (filtered water). Before the start of exposure and at

the end of it, data on systolic blood pressure and weight of the animals were recorded. After 30 days of exposure to the metal, the animals were euthanized and blood was collected for the dosage of cadmium and estrogen, and thoracic aorta, for the evaluation of vascular reactivity. Results: Wistar females exposed to Cd had a reduction in weight gain and systolic blood pressure did not change significantly after exposure to the metal. No difference was found in estrogen dosage between control and cadmium-exposed rats. In the analysis of myeloperoxidase (MPO) an increase in the activity of this enzyme was found in both groups exposed to the metal. Exposure to cadmium produced a concentration of the metal in the blood of 2.89 µg/L against 0.27 µg/L found in unexposed females, in males an increase in the concentration of the metal was observed in relation to females, exposed males had 4, 7 µg/L and unexposed 0.3 µg/L. There was no change in the vascular response to Phenylephrine (Fe), Acetylcholine (ACh) and Sodium Nitroprusside (NPS) in females, however males had changes in ACh and Fe curves. Incubation with L-NAME shifted the concentration-response curve to Fe in both groups, but this effect was smaller in males exposed to Cd, suggesting reduced nitric oxide bioavailability. In addition, incubation with apocynin and catalase reduced the response to Fe in males exposed to Cd, suggesting the release of superoxide anion and hydrogen peroxide, respectively. Conclusion: The results of the present study demonstrate that exposure for 30 days to Cd produces an increase in blood pressure and vascular changes in males, but not in females, suggesting that the cardiovascular abnormalities induced by the metal are sex-dependent.

Key words: vascular reactivity, sex differences and cadmium exposure.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ASPECTOS GERAIS SOBRE O CÁDMIO

O cádmio é um metal classificado na tabela periódica no grupo IIB, sendo identificado através do símbolo Cd, com peso molecular de 112.411 e número atômico 48. Na forma metálica, sua coloração é branco prateado e possui características como ductilidade, maleabilidade e resistência química e mecânica (DUFFUS, 2002).

Sendo considerado um dos metais tóxicos lançados no meio ambiente, sua liberação ocorre através de atividades vulcânicas, das profundidades oceânicas, remobilização de fontes antigas, como a poluição das águas subterrâneas causadas por drenagem de minas, derretimento das calotas polares e a queima de combustíveis fósseis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O Cd foi descoberto em 1817, quando o médico Johann Roloff encontrou irregularidades em um lote de óxido de zinco produzido na fábrica de produtos farmacêuticos de Karl Hermann. Karl Hermann preocupado com a situação que sua empresa estava enfrentando realizou experimentos e afim de descobrir qual seria a substância que estava causando os efeitos adversos, e descobriu que os lotes estavam contaminados por Cd (TARAKINA; VERBERCK, 2017).

Há relatos que foram encontradas partículas de Cd nas telas de Claude Monet, e com isso se associa possível intoxicação do pintor com o metal (ATSDR, 2012).

O cádmio começou a ser utilizado de forma industrial em tintas de pintura, mas com o passar dos anos ganhou novas utilidades e passou a ser empregado em materiais de policloreto de vinila (PVC) e em baterias recarregáveis de níquel-cádmio, que é sua maior utilização na indústria atualmente.

Sua extração ocorre através do refino de metais não ferrosos, visto que, é considerado um contaminante desses metais. A liberação na atmosfera ocorre através da queima de combustíveis fósseis e incineração e eliminação de resíduos. Através dessas fontes, o metal acumula-se em ambiente aquático e no solo (ATSDR, 2012).

Por não ser considerado um metal essencial ao organismo, como o ferro e zinco, a exposição ao Cd aumenta o risco de doenças em órgãos como os rins, fígado, ossos e no sistema cardiovascular; possui relação direta com câncer de pulmão e rins, além de estar associado a mortes prematuras (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O *National Health and Nutrition Examination Surveys* realizou um estudo entre 1999 a 2004 e associou o uso do tabaco à exposição ao Cd, devido a maiores concentrações desse metal no sangue e na urina dos indivíduos tabagistas que participaram da pesquisa. Além disso, estabeleceu uma associação entre as concentrações sanguíneas de Cd e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (TELLEZ-PLAZA et al., 2008).

## **1.2. EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO**

A população está exposta ao metal através da fumaça do tabaco, alimentos (especialmente frutos do mar, carnes, vegetais e grãos), água potável e ar atmosférico, especialmente nas áreas urbanas e industriais (ATSDR, 2012; SATARUG; MOORE, 2004).

Um dos motivos para a presença do Cd nos alimentos agrícolas é a adubação da terra com utilização de fertilizantes fosfatados, que apresentam Cd em sua constituição. As plantas, através de suas raízes, absorvem este metal presente no solo, que então, vai se concentrar nas folhas e nos frutos utilizados de alimentos para animais, se acumulando na cadeia alimentar. Ao consumir esses alimentos, o metal é absorvido, e depositado principalmente nos rins e no fígado (ATSDR, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O ar também apresenta partículas de Cd, que são transportadas e depositadas no solo e na água. As concentrações totais de Cd no ar dependem da proximidade com a fonte de emissão, e podem variar entre 0,1 ng/m<sup>3</sup> até 100 ng/m<sup>3</sup>, em áreas remotas e próximo a emissão, respectivamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Os oceanos apresentam quantidade de Cd que variam de <5 a 110 ng/L. Essa concentração deriva de fenômenos naturais de erosão e intemperismo e da precipitação atmosférica de emissões naturais e antrópicas (DE ANGELIS et al., 2017; OECD, 1995).

Os tabagistas são parte da população que é significativamente exposta ao Cd, visto que cada cigarro contém 0,5 a 2 ng/m<sup>3</sup> de Cd. Indivíduos que convivem com tabagistas, fumantes passivos, também estão expostos e podem inalar quantidades significativas de Cd (ELINDER et al., 1985). Em 2011, Viana e colaboradores realizaram análise de 20 diferentes marcas de cigarros comercializados no Brasil e encontraram uma média de 0,65 µg de Cd por grama de tabaco (DE SOUSA VIANA; GARCIA; MENEZES-FILHO, 2011). Esse acúmulo nas folhas de tabaco justifica o fato de fumantes apresentarem maiores concentrações sanguíneas de Cd (1,4 - 4 µg/L) do que indivíduos não-fumantes (0,4 - 1 µg/L). Já indivíduos que residem em regiões contaminadas apresentam concentrações sanguíneas de Cd maiores que 10 µg/L (DE ANGELIS et al., 2017).

A exposição ocupacional ocorre principalmente por inalação de vapores e poeiras que contém partículas de Cd, e ingestão do metal através das mãos contaminadas. A concentração sanguínea de Cd dos indivíduos expostos de forma ocupacional pode ser até 50 µg/L (DE ANGELIS et al., 2017).

Os níveis de exposição ao Cd podem ser mensurados tanto no sangue quanto na urina. Essas duas formas de medida trazem conclusões diferentes, visto que a exposição aguda é melhor investigada nos exames de sangue, e, como o cádmio é lentamente eliminado pela urina, a exposição crônica ao metal é melhor analisada por urinálise (JÄRUP, 2003).

### **1.3. ABSORÇÃO DO CÁDMIO PELO ORGANISMO**

As principais formas de absorção do metal são através do sistema respiratório e do sistema digestivo. O sistema respiratório absorve em torno de 50% do cádmio inalado, já o sistema digestório, cerca de 5%, podendo chegar de 20 a 30% em alguns indivíduos, dependendo do seu estado nutricional. Com isso, o uso do tabaco se torna muito prejudicial à saúde, pois além das folhas de tabaco acumularem grandes quantidades de Cd absorvido do solo, 50% do que está presente no cigarro pode ser absorvido pelo organismo (SATARUG; MOORE, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O Cd não é um metal essencial para os organismos, pois não apresenta função conhecida, com isso não apresenta mecanismos específicos conhecidos para regulação da sua absorção, transporte e entrada/saída das células. Então, sua passagem através das membranas celulares ocorre através de mecanismos utilizados para a absorção de metais essenciais, como o ferro e o cálcio, como por exemplo o transportador de metais divalentes 1 (DMT1). A quantidade desse transportador pode ser alterada conforme as condições de saúde do indivíduo, visto que, em indivíduos com anemia ferropriva, há aumento na expressão do DMT1. Nesse caso, o aumento da expressão de DMT1 promove aumento da absorção não só de ferro, mas de outros metais divalentes, à exemplo do cádmio, caso o indivíduo seja exposto a esse metal (KLASSEN et al., 2004).

Satarug e Moore (2004), demonstraram esse efeito em mulheres tailandesas, ao observarem que mulheres com depleção de ferro apresentavam conteúdo de Cd de 3 a 4 vezes maior que o observado em mulheres de mesma idade e com concentrações sanguíneas normais de ferro (SATARUG et al., 2004). As maiores consequências da exposição ao Cd podem ser devido a diferenças na absorção, uma vez que, mulheres absorvem via trato gastrointestinal 10% ou mais do metal enquanto os homens absorvem em torno de 5% (DE ANGELIS et al., 2017).

Após o Cd ser absorvido, ocorre ligação com as proteínas; albumina e a metalotioneína (MT), que possuem afinidade por metais e impedem a ação do Cd no organismo. Quando se liga à MT, forma o complexo MT-Cd<sup>2+</sup>, que ao passar pelos rins é filtrado, porém é reabsorvido pelas células dos túbulos proximais, onde a ligação desse complexo é rompida, fazendo que o Cd seja liberado para a circulação sanguínea, podendo então agir sobre os tecidos (KLASSEN et al., 2004).

Além desse mecanismo, o Cd livre pode se acumular nos tecidos através de células do sistema imune (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos T, linfócitos B, células NK, macrófagos, mastócitos e monócitos) que atravessam a parede vascular por meio de diapedese (STEFFENSEN et al., 1994). Com isso, pode atingir vários órgãos e se acumular nos tecidos causando efeitos deletérios.

Sua excreção renal é baixa, sendo calculada como 0,007% do conteúdo corporal de Cd, mas essa eliminação apresenta grande variação na população (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Essa lenta eliminação pela via urinária torna a concentração de cádmio na urina um marcador de exposição

crônica ao metal (JÄRUP, 2003), além de fazer com que sua meia-vida no organismo varie de 10-35 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Os principais órgãos de acúmulo de Cd são o fígado e rins, mas os vasos sanguíneos também acumulam esse metal em sua parede (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Broseguini-Filho et al. (2015), expôs ratos Wistar ao Cd de forma aguda e realizou a dosagem da deposição do metal na aorta abdominal, pulmão e rim, os autores demonstraram que ocorre uma grande deposição de Cd nesses tecidos mesmo em curto tempo de exposição (120 minutos) (BROSEGHINI-FILHO et al., 2015).

#### **1.4. EFEITOS DO CÁDMIO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR**

Estudos com populações expostas ao Cd demonstraram que indivíduos que tiveram baixa ou moderada exposição ao metal apresentaram hipertensão arterial sistêmica (HAS), aterosclerose em carótida, doença arterial periférica, doenças do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca (TELLEZ-PLAZA et al., 2008). Além disso, pesquisa realizada por Menke e cols (2009) encontrou associação entre exposição ao Cd e aumento de mortes por doenças cardiovasculares (DCV) na população americana (MENKE et al., 2009).

De fato, a HAS é reportada tanto em estudos experimentais quanto em humanos. Eum et al. (2008), estudou a concentração de Cd na população Coreana e concluiu que os indivíduos que tinham maior concentração de Cd na corrente sanguínea tinha a prevalência de HAS 1.51 vezes maior que o grupo com menor concentração (EUM; LEE; PAEK, 2008). Tellez-plaza et al. (2008), também encontrou correlação positiva entre níveis de Cd sanguíneos e o aumento da pressão arterial realizado na população norte-americana (TELLEZ-PLAZA et al., 2008).

Os mecanismos propostos para explicar como a exposição ao Cd podem causar aumento da pressão arterial incluem: dano tubular renal com retenção de sais, aumento da atividade do sistema nervoso simpático e estímulo ao tônus vascular devido ao desequilíbrio de agentes vasoconstrictores e vasodilatadores (DONPUNHA et al., 2011; FADLOUN, Z; LEACH, 1979; KOLLURU et al., 2006; MARTYNOWICZ et al., 2004; SATARUG et al., 2005; SKOCZYNSKA, A; MARTYNOWICZ, 2005).

Além disso, o Cd pode reduzir a atividade da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (TOKUSHIGE et al., [s.d.]; VASSALLO et al., 2017), o que leva ao aumento intracelular de  $\text{Na}^+$ , como consequência o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  tem sua atividade reduzida, com isso ocorre aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e aumento do tônus vascular. A inibição bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pode estar relacionada com a afinidade dos metais pesados com o grupo sulfidril (JACOBSON; TURNER, 1980).

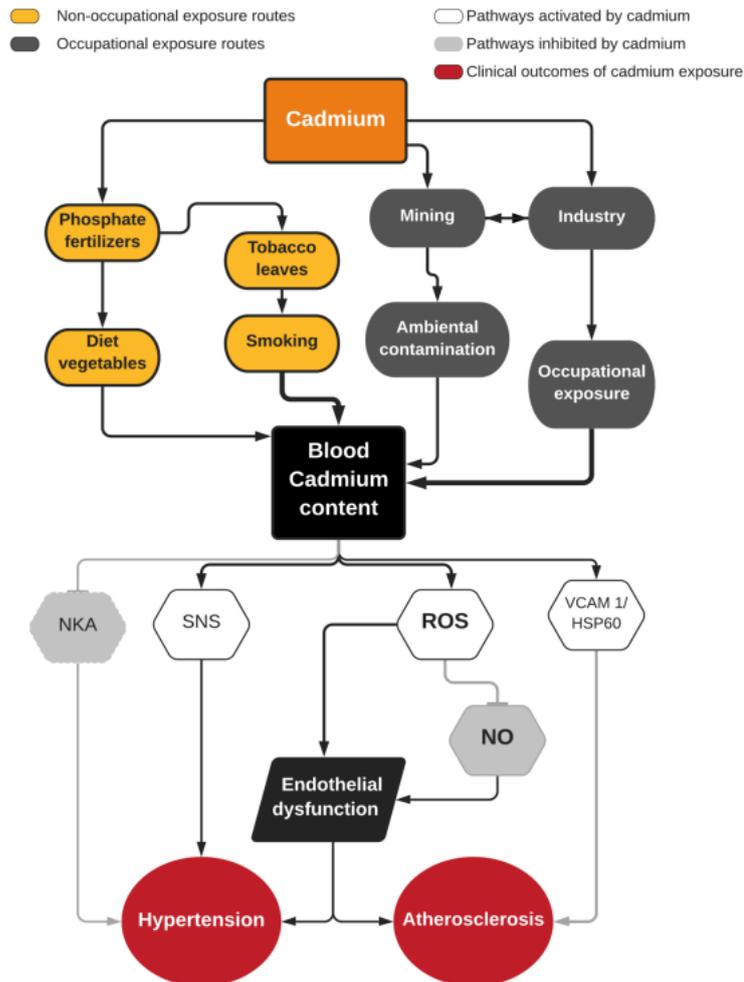


Figura 1: Formas de exposição ao Cd e supostos mecanismos que estão associados ao desenvolvimento da hipertensão arterial. Com o aumento da concentração de Cd na corrente sanguínea ocorre; 1- 2- aumento da atividade do sistema nervoso simpático, 3- aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), 4- redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e 5- aumento da proteína 1 de adesão celular vascular (VCAM1) e chaperonina 60 (HSP60). O aumento das ERO e a redução do NO induz disfunção endotelial. Almenara et al. (2020).

Além das DCV citadas acima, o Cd pode causar alterações metabólicas como diabetes, dislipidemia e doença renal crônica (EDWARDS; PROZIALECK, 2009). Esses fatores são de suma importância, visto que aumentam o risco das DCV, e

em pacientes diabéticos aumentam a taxa de mortalidade e morbidade (OZTURK et al., 2009).

Essa ação do cádmio sobre o sistema cardiovascular pode ocorrer em decorrência de sua deposição nos vasos sanguíneos. Abu-Hayyeh et al. (2001) demonstraram que tabagistas apresentaram concentração média de 7  $\mu\text{mol/L}$  Cd na túnica média da aorta (ABU-HAYYEH et al., 2001). Além disso, estudos apontam que a exposição ao Cd também é tóxica ao endotélio vascular, com isso, favorecendo o desenvolvimento das DCV (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; FUJIWARA; WATANABE; KAJI, 1998; KAJI et al., 1996; KISHIMOTO et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2018).

Estudos de reatividade vascular realizados em nosso laboratório encontraram disfunção endotelial na aorta de ratos Wistar (ALMENARA et al., 2013) e de camundongos ApoE<sup>-/-</sup> (OLIVEIRA et al., 2018), tanto em exposição crônica (30 dias), como em exposição *in vitro* (ANGELI et al., 2013) ao Cd.

## 1.5 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E CÁDMIO

Os vasos sanguíneos são constituídos de três túnicas, a mais interna é formada por uma monocamada denominada endotélio (Moncada et al. 1977). O endotélio tem importante função para o equilíbrio da função vascular, visto que suas células são responsáveis pela produção e liberação de substâncias que são vasoativas e ajudam no controle do tônus vascular, manutenção da fluidez do sangue, regulação da inflamação, resposta imune e a neovascularização (MONCADA; PALMER; HIGGES, 1991; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987).

As substâncias produzidas pelo endotélio exercem função vasoconstritora ou vasodilatadora. Dentre as substâncias vasodilatadoras podemos citar o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fator hiperpolarizante do endotélio (EDHF) (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011). Já as substâncias que atuam promovendo a contração do músculo liso vascular citamos, o tromboxano (TXA<sub>2</sub>), angiotensina 2, endotelina e algumas substâncias derivadas do metabolismo do oxigênio (CAHILL; REDMOND, 2016).

O NO é um dos principais vasodilatadores liberados pelo endotélio e tem função fundamental na regulação do tônus basal, resistência vascular, inibição da agregação plaquetária e adesão à parede vascular (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986; VANHOUTTE; EBER, 1991). Por essas funções o NO é considerado o principal produto derivado do endotélio responsável pelo controle da homeostase vascular (SNYDER; BREDT, 1992). Sua biodisponibilidade pode ser reduzida por reação com espécies reativas de oxigênio (EROs) (FÖRSTERMANN, 2008).

A disfunção endotelial é definida como desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio vascular, estando relacionada ao aumento da produção de EROs ou nitrogênio e diminuição da capacidade antioxidante (SILVA, B. R.; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012).

As EROs são geradas pelo metabolismo do oxigênio e possuem importantes funções fisiológicas como segundo mensageiro e sinalização intracelular. Nos vasos sanguíneos as principais fontes geradoras de EROs são: xantina oxidase, mieloperoxidase, o desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a NADPH oxidase e enzimas mitocondriais (FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006).

O ânion superóxido possui um papel muito importante na disfunção vascular, visto que, ao reagir com o NO, forma o peroxinitrito, que é uma potente espécie reativa de nitrogênio, que pode causar peroxidação lipídica. Assim, grandes concentrações de ânion superóxido associada à redução da biodisponibilidade de NO, são frequentemente encontrados em diversas doenças que cursam com vasculopatias (FÖRSTERMANN, 2008). De fato, diversos trabalhos na literatura associam a exposição ao Cd com disfunção endotelial, pois a exposição ao metal aumenta a produção de EROs (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; DONPUNHA et al., 2011; KUKONGVIRIYAPAN; APAIJIT; KUKONGVIRIYAPAN, 2016; OLIVEIRA et al., 2018).

Em nosso laboratório o efeito do cádmio sobre a reatividade de segmentos de aorta de ratos Wistar e em camundongos ApoE<sup>-/-</sup> já foi estudado em um contexto de exposição ao Cd *in vitro* durante 40 minutos e *in vivo* durante 30 dias via água de beber (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2018).

O estudo de Angeli et al (2013), demonstrou que a exposição ao Cd *in vitro* aumentou as EROs e reduziu a biodisponibilidade do NO em anéis de aorta de ratos Wistar (ANGELI et al., 2013). Almenara et al. (2013) também utilizou Wistar machos, porém estes expostos por 30 dias na água de beber, e também observou aumento da liberação de EROs, e redução da biodisponibilidade de agentes vasodilatadores, intensificando as respostas vasoconstritoras induzidas pela fenilefrina (ALMENARA et al., 2013). Oliveira et al. (2018), observou redução do relaxamento vascular à ACh em aorta de camundongos ApoE<sup>-/-</sup> expostos por 30 dias ao cádmio e tal alteração também foi explicada pela redução da biodisponibilidade do NO (OLIVEIRA et al., 2018).

## **1.6 RELAÇÃO ENTRE ESTROGÊNIO E CÁDMIO**

O Cd pode se ligar e ativar os receptores de estrogênio (E2), sendo então classificado como metaloestrógeno (SILVA, N. et al., 2013). Metaloestrógeno é um grupo de íons metálicos que possuem “atividade estrogênica” (JURKOWSKA et al., 2019). Como consequências, o Cd tem sido associado a patogenia de doenças que são dependentes de E2, mioma uterino e endometriose (SILVA, N. et al., 2013).

A exposição ao Cd e a redução dos níveis de E2 em fêmeas é controversa. Estudos demonstram que o Cd promove redução de E2 (BARON; VECCHIA; LEVI, 1990; CHEDRESE, 2004; MASSÁNYI et al., 2000) e pode contribuir para o desenvolvimento de cânceres relacionados ao E2, como o de ovário, o câncer mais letal em mulheres (ATAEI; AGHAEI; PANJEHPOUR, 2018). Entretanto, Da Costa et al. (2021), expuseram ratas Wistar a 100 ppm de ClCd<sub>2</sub> por 30 dias e não observaram diferença na concentração plasmática de E2 entre ratas expostas ou não ao metal (DA COSTA et al., 2020).

Cabe destacar que o E2, nas mulheres, exerce efeito cardioprotetor. No sistema cardiovascular, o E2 aumenta o relaxamento vascular por aumentar a atividade e expressão da eNOS (MACRITCHIE et al., 1997; KLEINERT et al., 1998). O E2, através de seus receptores acoplados a proteína G (GPER) expressos na membrana das células endoteliais, estimula agudamente a atividade da eNOS, através do mecanismo clássico dependente de

cálcio/calmodulina que envolve fosfatidilinositol 3-quinase / fosforilação mediada por AKT na Ser1177 (FLORIAN; FREIMAN; MAGDER, 2004; HAYNES et al., 2000). Assim, a atividade do E2 sobre eNOS possui efeito imediato no tônus vascular (CHAMBLISS; SHAUL, 2002; HAYNES et al., 2003).

O E2 também estimula o aumento da biodisponibilidade de NO, pela redução da produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (GUETTA et al., 1997; WASSMANN et al., 2001). Essa redução da produção de ânion superóxido se dá pela redução da NAD(P)H-oxidase nas células endoteliais (WAGNER; SCHROETER; HECKER, 2001). Justamente por essas propriedades protetoras do estrogênio sobre a função vascular, a maioria dos modelos experimentais usados em investigações vasculares excluem as fêmeas dos estudos.

## **1.7 RELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO E CÁDMIO**

A exposição ao Cd também está associada ao aumento dos níveis inflamatórios no organismo, tanto em machos quanto em fêmeas (SAPMAZ-METIN et al., 2017).

O estudo de Kataranovski *et al.* (2009), analisou a exposição aguda ao Cd em roedores fêmeas e machos com aproximadamente 12 semanas de idade. Os autores do trabalho dividiram os animais em 3 grupos, com doses de 0,5, 1 e 2 mg de ClCd<sub>2</sub> por kg de peso corporal, e demonstraram que a resposta inflamatória sistêmica foi maior em machos do que em fêmeas. Um dos mecanismos propostos para que as fêmeas tenham menor resposta inflamatória é que o estrogênio pode suprimir a produção de interleucina 6, um importante fator pró-inflamatório (KATARANOVSKI et al., 2009).

O estudo de Angeli et al. (2013), demonstrou que a exposição *in vitro* de segmentos de aorta ao ClCd<sub>2</sub> promoveu aumento da reatividade vascular, mas na presença da indometacina, inibidor inespecífico da enzima cicloxigenase (COX), houve redução da contratilidade sugerindo que, agudamente, o cádmio pode ativar esse sistema, induzindo inflamação (ANGELI et al., 2013).

Ainda, Knoflach et al. (2011), estudaram a exposição ao Cd em aorta de fêmeas ApoE<sup>-/-</sup> e observaram maior expressão de VCAM-1 e HSP60 nas fêmeas

que foram expostas ao Cd, sugerindo aumento da atividade inflamatória (KNOFLACH et al., 2011).

## **2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

Um grande número de evidências indicam que o Cd é um metal altamente tóxico que predispõem à diversas doenças cardiovasculares. Como mencionado anteriormente, o cádmio pode se acumular nos vasos sanguíneos e isso pode estar relacionado às vasculopatias induzidas pelo metal. De fato, o cádmio promove aumento de pressão arterial e disfunção vascular em ratos machos, como evidenciado por estudos conduzidos pelo nosso laboratório (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2018). No entanto, os efeitos do metal sobre a função vascular de fêmeas não foram elucidados. Além disso, os estudos a respeito do efeito da exposição ao cádmio sobre os níveis de estrogênio, que possui efeito vasculoprotetor, são controversos.

A hipótese do presente estudo é que a exposição ao cádmio interfere de forma distinta nas respostas vasculares da aorta de ratos machos e fêmeas, devido a ação protetora do estrogênio sobre a função vascular.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Comparar os efeitos da exposição crônica ao cloreto de cádmio 100 ppm sobre a pressão arterial e reatividade vascular em aorta isolada de ratos Wistar machos e fêmeas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar o nível de cádmio no plasma de ratos Wistar machos e fêmeas após a exposição por 30 dias ao metal;
- Determinar a influência do cádmio sobre a pressão arterial de ratos Wistar machos e fêmeas;
- Descrever os efeitos da exposição crônica ao cádmio sobre as respostas vasculares de ratos Wistar fêmeas e machos e as vias de agentes vasoativas envolvidas nas possíveis alterações encontradas nessas respostas.
- Definir os efeitos da exposição ao cádmio sobre o conteúdo plasmático de estrogênio em fêmeas;
- Determinar o nível inflamatório sanguíneo dos animais machos e fêmeas expostos ao metal.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) tanto machos como fêmeas, com idade aproximada de três meses com peso entre 200 a 300g. 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 coletivas (com no máximo quatro indivíduos por gaiola) sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água tratada e à ração especial para roedores.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos, denominados: Controle fêmeas (CtF), Cádmio fêmeas (CdF), Controle machos (CtM) e Cádmio machos (CdM). Os grupos Ct ingeriram água potável e aos grupos Cd foi fornecida apenas solução de Cloreto de Cádmio ( $\text{ClCd}_2$ ) 100 ppm como água de beber, por período de 30 dias. Utilizamos este modelo de exposição pois os efeitos vasculares e pressóricos do cádmio nestas condições em ratos machos já tinham sido descritos em estudo anterior de nosso laboratório (ALMENARA et al., 2013).

O uso e cuidado desses animais experimentais estiveram de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pela Diretriz Brasileira para Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pelo CEUA-UFES, número 33/2018.

### **4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **4.2.1 Peso dos animais antes e após a exposição ao Cádmio**

Os animais foram pesados e tiveram sua pressão arterial sistólica aferida antes de iniciar o tratamento (Ct ou Cd) e ao final dos 30 dias de exposição. Após 30 dias, sob anestesia com quetamina e xilazina (91 e 9,1 mg/kg,

respectivamente, via intraperitoneal), o sangue foi coletado e os animais foram eutanasiados por exsanguinação. As aortas foram coletadas para as análises de reatividade vascular e expressão proteica.

#### **4.2.2 Dosagem do Cádmio e do estrogênio**

O sangue coletado foi armazenado em tubo heparinizado e centrifugado por 10 minutos, 6000 rpm a 4°C. Em seguida, o plasma foi retirado e armazenado em eppendorf a -80°C, para posterior determinação dos níveis de Cd e de estrogênio. A determinação de Cd foi realizada por um espectrofotômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), modelo NexION 300 (PerkinElmer, Estados Unidos), pelo Departamento de Química da UFES no Centro de Ciências Exatas, em parceria com a Profa Dra Maria Tereza W D Carneiro e com a mestrandia Maiara Krause.

A concentração plasmática de estrogênio foi determinada apenas nas ratas Wistar fêmeas utilizando-se o kit E2 ELISA (EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Germany).

#### **4.2.3 Verificação da pressão arterial sistólica**

A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada pelo método de pletismografia de cauda, de acordo com Grizzo et al., (2008) (GRIZZO; CORDELLINI, 2008). As medidas foram realizadas nos animais antes e após 30 dias de protocolos, através de um pletismógrafo de cauda (Modelo v 1.2 – monocanal, Bonther). Os animais foram previamente climatizados ao aparelho, nos três dias anteriores à mensuração da PAS para adaptarem-se e, desta forma, prevenir estresse do animal frente ao procedimento. No dia da aferição foram obtidas 4 a 5 medidas e realizado a média dessas medidas.

#### **4.2.4 Obtenção dos anéis isolados de aorta torácica**

Após a eutanásia dos animais, a aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri

contendo solução de Krebs-Henseleit, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,17;  $\text{NaHCO}_3$  24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$  conferindo o pH em 7,4. Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento.

Cada anel vascular foi colocado em uma cuba contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a  $36 \pm 0,5$  °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que ficassem paralelos à luz do vaso. Um fio foi fixado à parede inferior do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do tônus do vaso foi captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA - USA) e este a um computador.

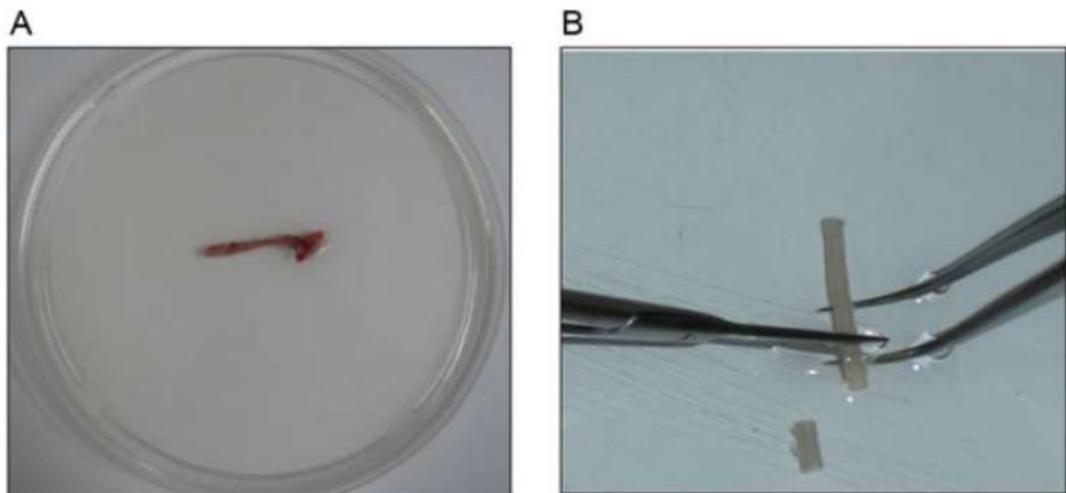


Figura 2: (A) Aorta torácica imersa na placa de petri, banhada com solução de Krebs, momentos antes da remoção do tecido adiposo perivascular (TAP). (B) Após a extração do TAP o segmento de aorta sendo cortado em anéis de 4 mm aproximadamente (Angeli, 2009).

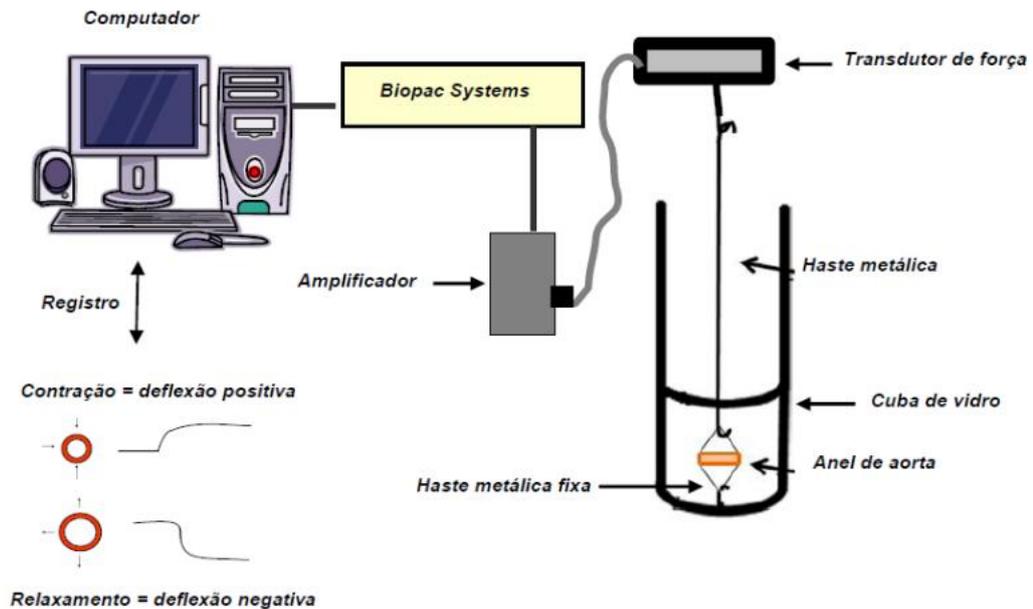


Figura 3: Esquema ilustrativo de preparação dos segmentos isolados de aorta para análise da reatividade vascular "in vitro". Sistema de aquisição de dados Biopac System (Angeli, 2013).

Para testar a viabilidade do músculo liso vascular, os segmentos de aorta foram expostos por 30 minutos ao KCl (75 mM) e os anéis que tiveram sua tensão dobrada após a incubação do KCl foram atestados com o músculo liso íntegro. A variação de tensão obtida por esta incubação com KCl foi usada para normalizar os resultados das curvas de contração posteriores.

A integridade funcional do endotélio foi testada por meio do relaxamento à acetilcolina (ACh) após pré-contração com fenilefrina (Fe). Uma vez atingido o platô de contração à Fe, uma dose única de ACh foi adicionada ao banho e o relaxamento de 85% em relação à pré-contração com fenilefrina foi o limite mínimo estabelecido para atestar a integridade endotelial. Apesar de todos os anéis de aorta serem submetidos ao teste da integridade funcional muscular e endotelial, nenhum anel foi descartado caso não passasse nos testes. Essa decisão foi tomada uma vez que essa possível alteração na função dos vasos poderia ocorrer em decorrência da exposição ao cádmio e não à manipulação do operador.

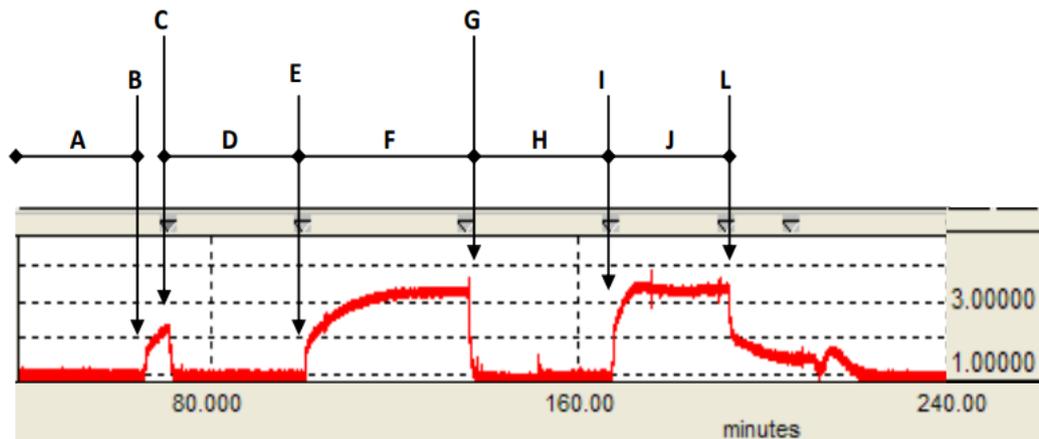


Figura 4: Registro gráfico com curvas representando os testes realizados para avaliação do músculo liso vascular e a integridade funcional do endotélio vascular. (A) período inicial de 30 min de estabilização, com tensão próxima a 1g. (B) 1° dose de KCl (75 mM). (C) Troca de solução de Krebs- Henseleit para remover o KCl. (D) Período de estabilização após o 1° KCl. (E) 2° KCl. (F) Período de 30 min onde ocorre a contração máxima ao KCl. (G) Troca de solução de Krebs-Henseleit para remover o KCl. (H) Período de 30 min de estabilização (I) Pré contração do anel de aorta com Fe ( $10^{-6}$  M). (J) Período onde ocorre estabilização a contração a Fe. (L) Adição da ACh ( $10^{-5}$  M). No eixo das abscissas observamos o tempo e no eixo das ordenadas a tensão em g que os anéis estavam expostos (Dias, 2011).

Após 30 minutos do teste do endotélio e trocada a solução de Krebs, foi realizada a curva concentração-resposta à Fe ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) de maneira cumulativa nos quatro grupos estudados. As tensões obtidas após o platô de cada incubação de nova concentração Fe, foram subtraídas pela tensão basal e normalizadas pela contração obtida pela incubação com KCl.

Nos anéis que foram realizadas as curvas concentração resposta à ACh e NPS, não foi realizada a curva de Fe. Para a realização da curva de relaxamento vascular foi realizada uma pré-contração com Fe após a formação de um platô estável, foi realizada a curva de ACh ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) para avaliar o relaxamento dependente do endotélio. Outro segmento foi submetidos à curva de relaxamento ao nitroprussiato de sódio (NPS) em concentrações de  $10^{-11}$  a  $3 \cdot 10^{-5}$  M, para avaliar a vasodilatação independente do endotélio. Nestas curvas, a tensão após estabilização de cada concentração de vasodilatador, foi subtraída da tensão do final da curva de Fe e normalizada pela variação de tensão induzida pela Fe ao final da curva.

Para avaliação da participação de vias de agentes moduladores da função vascular, alguns segmentos foram expostos a fármacos inibidores destas vias durante 30 minutos, antes da realização das curvas concentração-resposta à Fe.

#### **4.2.5 Efeitos da exposição por trinta dias ao CICd<sub>2</sub> sobre a via do NO**

Com o intuito de verificar a participação do NO na resposta contrátil à Fe, segmentos de aorta foram incubados com o inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N G -nitro-L-arginina metil éster (LNAME, 100 µM, Sigma).

#### **4.2.6 Participação das espécies reativas de oxigênio na exposição por trinta dias ao CICd<sub>2</sub> sobre a resposta contrátil à Fe**

Para analisar a participação das EROs na resposta contrátil à Fe de segmentos de aorta expostos ao CICd<sub>2</sub>, foram utilizadas: a apocinina (30 µM, Sigma), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase e a catalase (1000 U/ml, Sigma), um varredor enzimático de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **4.3 Dosagem do mieloperoxidase (MPO)**

Com objetivo de avaliar os níveis inflamatórios foi realizado o estudo da atividade da MPO. Aproximadamente 100 microlitros de *serum* sanguíneo foram misturados em buffer 1 (NaCl 0,1 M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M e Na<sub>2</sub>EDTA 0,015 M), centrifugados a 9000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e foi realizada nova suspensão do pallet com soluções geladas de NaCl 0,2 % e NaCl 1,6 % + 5 % de glicose. Foi realizada nova homogeneização da amostra para que novamente fossem centrifugadas a 9000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pallet foi suspenso com buffer 2, contendo Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e Brometo de Hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio 0,5 % p/v) (HETAB, importante detergente iônico que ajuda na solubilização e extração da MPO).

Após o processamento da amostra, em uma placa de microtitulação de 96 poços foi pipetada amostra em duplicata e 25 µL do substrato TMB (tetrametilbenzidina) diluído em DMSO (dimetil sulfóxido; Sigma-Aldrich, St Louis, USA), seguido de incubação por 5 minutos a 37°C. Por seguinte adicionou-se 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,002 % e incubou-se novamente a 37 °C por 5

minutos. Após a incubação, paralisou-se a reação com 100  $\mu$ L de  $H_2SO_4$ . Após a interrupção da reação, foi feita a leitura da absorbância em 450 nm. A média dos valores da duplicata foi usada para determinação da atividade da enzima.

#### **4.4 Análise proteica através do Western Blotting**

Amostras de segmentos da aorta de ratas Wistar fêmeas, expostas ou não ao cádmio, foram congeladas a  $-80^\circ$ . No dia da análise pelo método de Western Blotting, essas amostras foram trituradas e sonificadas em tampão RIPA (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e, em seguida, centrifugadas a 1200g. O sobrenadante foi coletado para a determinação da concentração de proteína através do método de Bradford (1976).

A solução de Laemmli foi acrescentada a alíquotas contendo 40  $\mu$ g de proteína de cada amostra e foram carregadas em géis de 7,5, 10 ou 12% acrilamida (TGX Stain-Free Gels, Bio-Rad). As proteínas foram separadas por eletroforese por um sistema de células MiniPROTEAN Tetra (Bio-Rad) por 2 h a 100 V em tampão contendo 140 mM de glicina, 37 mM Tris base e 1% de dodecil sulfato de sódio (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). As membranas foram ativadas através de radiação ultravioleta (Sistema de Imagiologia ChemiDoc XRS +, Bio-Rad) pelo período de 1 minuto. Essa radiação, produziu sinal fluorescente devido aos resíduos de triptofano presentes nas proteínas e foi registrada uma imagem do gel emitindo essa fluorescência.

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) durante 18 h a 40 V, numa solução de transferência contendo glicina 140 mM, base Tris 37 mM e 20% de metanol em banho de gelo. O total de proteína de cada amostra foi definido pela emissão de fluorescência pelos resíduos de triptofano das proteínas separadas (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé) em solução Tris-tamponada (25 mM, NaCl 137 mM) com Tween 20 (0,2%, TBST) por 1 h sob agitação à temperatura ambiente e, então, incubadas com anticorpo primário diluído em TBST anti-eNOS fosforilada (anti-peNOS (Ser1177, 1:200, Millipore, San Francisco, EUA).

Posteriormente, foram cuidadosamente lavadas e incubadas com conjugado de StrepTactin-HRP (1:5000) e anticorpo secundário anti-

camundongo (1:5000, SigmaAldrich, St. Louis, EUA) diluídos em albumina de soro bovino a 3% (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) em TBST durante 1 h com agitação antes de serem novamente lavadas com TBST. Um substrato quimioluminescente (ácido cumárico 0,2 mM, luminol 1,25 mM, Tris-HCl 0,1 M e peróxido de hidrogênio a 0,06%) foi acrescentado às membranas e as imagens foram obtidas com um sistema ChemiDoc XRS+. A intensidade da luminescência foi quantificada e normalizada pelo conteúdo total de proteínas da amostra usando o Image Lab 6.0.1 Software (Bio-Rad).

#### **4.5 Expressão dos resultados e análise estatística**

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

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e as diferenças entre os grupos experimentais e tratamentos foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

Para testar diferenças foi realizado teste t de Student não pareado. Análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizadas foram utilizadas quando foi necessário comparar três ou mais médias. Quando o teste ANOVA duas vias detectou significância, foi realizado o pós-teste (pos-hoc) de Tukey.

Para a determinar a resposta máxima ( $R_{max}$ ) e  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ), foi realizada análise de regressão não-linear, obtida por meio da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Concentração plasmática de cádmio e estrogênio

Ratas que foram expostas ao cádmio tiveram concentração plasmática do metal de  $2,89 \pm 0,74 \mu\text{g/L}$  ( $n=4$ ), enquanto as fêmeas do grupo controle apresentaram concentração de cádmio de  $0,27 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$  ( $n=4$ ),  $p < 0,05$ , por ANOVA 1 via. Já os ratos machos expostos ao metal apresentaram concentração sanguínea de  $4,7 \pm 1,3 \mu\text{g/L}$ , enquanto os não expostos ao metal apresentaram  $0,3 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ , ( $p < 0,05$ , ANOVA 1 via). Ao comparar fêmeas e machos expostos ao metal foi possível observar que os machos apresentaram menor concentração de Cd no sangue que as fêmeas ( $p < 0,05$ , por ANOVA 1 via).

A dosagem plasmática de estrogênio das fêmeas expostas ao cádmio foi de  $33,20 \pm 1,59 \text{ pg/ml}$  ( $n=5$ ), enquanto as fêmeas do grupo controle tiveram a dosagem  $33,00 \pm 6,69 \text{ pg/ml}$  ( $n=5$ ) ( $p > 0,05$ ).

### 5.2 Peso dos animais

Antes do início da exposição ao cádmio, o peso das ratas (tabela 1) do grupo Controle e Cádmio foram similares. Após os 30 dias de exposição ao metal, as fêmeas do grupo Cádmio apresentaram menor peso corporal quando comparados ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ), indicando que a exposição ao metal pode reduzir o ganho de peso (Tabela 1). O mesmo resultado também foi observado em machos expostos ao metal (Tabela 1). Os ratos machos que foram expostos ao Cd durante 30 dias tiveram menor ganho de peso que os animais do grupo controle.

Tabela 1: Peso corporal no início e no término dos trinta dias de exposição ao  $\text{ClCd}_2$

	Peso (g)			
	CtF(4)	CdF(5)	CtM(4)	CdM(5)
Dia 0	215,25 ± 5,8	212,2 ± 3,0	192,2 ± 4,6	193,9 ± 4,2
Dia 30	250 ± 5,2	234 ± 3*	333,4 ± 8,5	301 ± 9,3#

Tabela 1: Os valores estão expressos em média e EPM. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey\* $p < 0,05$  comparação do dia 30 entre o grupo controle fêmeas e grupo cádmio fêmeas. # $p < 0,05$  comparação do dia 30 entre o grupo controle machos e grupo cádmio machos. Entre parêntese a amostra de cada grupo.

### 5.3 Mieloperoxidase

Ao final da exposição ao Cd foi coletado o sangue e fracionado em soro para análise da atividade da MPO. Os grupos experimentais que foram expostos ao Cd por 30 dias tiveram aumento da atividade da MPO ( $p < 0,05$ ), independente do sexo do animal. Esse aumento foi similar em machos e em fêmeas (figura 5).

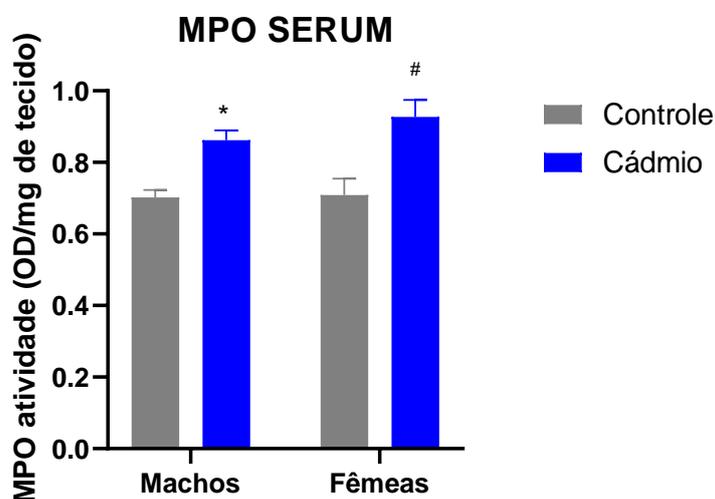


Figura 5: Média (e EPM) das atividade da MPO no sangue de Wistar machos e fêmeas do grupo Ct e do grupo Cd após 30 dias de exposição ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey. \* $P < 0.05$  Controle macho. # $P < 0.05$  Controle fêmeas. Amostra: CdM (13); CtM (14); CdF (17) e CtF (10).

### 5.4 Avaliação da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS), foi avaliada em ratos machos e fêmeas, antes e após 30 dias de exposição ao cádmio. Para efeito de comparação realizamos a diferença da PAS no início e ao final dos 30 dias de exposição ao Cd. Como podemos observar na figura 6, não foram observadas diferenças na PAS ( $p>0,05$ ) em ratas expostas ao cádmio quando comparadas ao grupo controle. Já em ratos machos, é possível observar que a exposição ao metal promoveu aumento da PAS quando comparado ao grupo controle ( $p<0,05$ )

Quando analisamos a diferença da PAS comparando o início da exposição ao Cd e o final do período de 30 dias em Wistar machos, podemos observar que houve aumento significativo da PAS ( $P<0,05$ ).

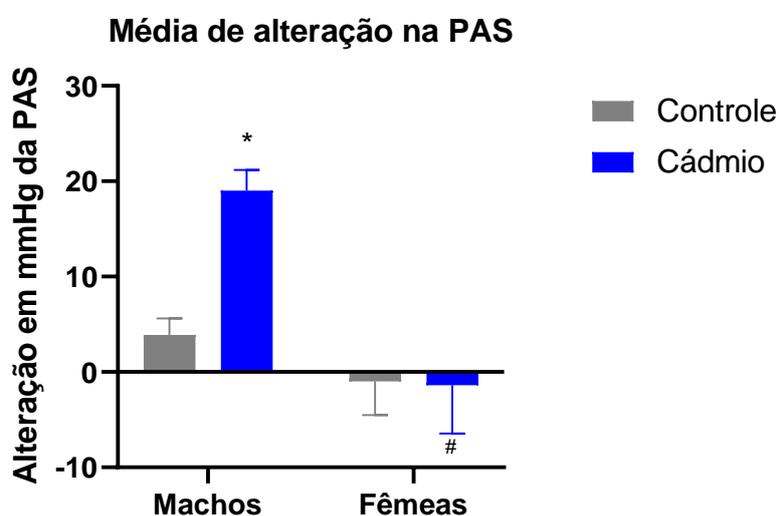


Figura 6: Valores expressos em média e EPM; ANOVA 2 Vias.  $n=9$  para controle e  $n=6$  para cádmio. \* $p<0,05$  comparação do dia 30 entre o grupo controle machos e grupo cádmio machos, # $p<0,05$  comparação do dia 30 entre o grupo cádmio macho e grupo cádmio fêmea. Valores em mmHg.

## 5.5 REATIVIDADE VASCULAR

### 5.5.1 Resposta Vascular ao KCl

Não foi observada diferença nas respostas contráteis ao KCl (75 mM) entre os grupos CtF e CdF, bem como CtM e CdM, quando comparado por Teste t Student (tabela 2). Portanto, uma vez que essas contrações foram similares, as respostas produzidas por concentrações crescentes de fenilefrina foram normalizadas pela contração máxima induzida pelo respectivo KCl do segmento aórtico.

Tabela 2: Contração ao KCl de segmentos de aorta de ratos e ratas expostas ou não ao cádmio

Contração ao KCl (g)			
Fêmeas		Machos	
CtF (32)	CdF (32)	CtM (8)	CdM (8)
1,74 ± 0,06	1,86 ± 0,07	2,24 ± 0,29	2,33 ± 0,22

Valores expressos em média ± EPM, com o número de amostra entre parênteses; Teste t Student não pareado, entre as contrações das artérias dos grupos.  $p > 0,05$  para todas as comparações.

### 5.5.2 Efeito da exposição crônica ao $\text{ClCd}_2$ por 30 dias sobre o relaxamento dependente do endotélio em anéis isolados de aorta

O relaxamento dependente do endotélio foi estudado através de curva concentração-resposta à ACh. Não foi encontrada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) na  $\text{pD}_2$  ou resposta máxima entre as curvas de ACh nos segmentos de aorta de ratas expostas ou não ao Cd por 30 dias (Figura 7A, Tabela 3). Entretanto, foi possível observar alteração tanto na resposta máxima como na sensibilidade dos segmentos de aorta de ratos machos expostos ao Cd em comparação com os que não foram expostos ao metal ( $p < 0,05$ ). (Figura 7B, Tabela 3)

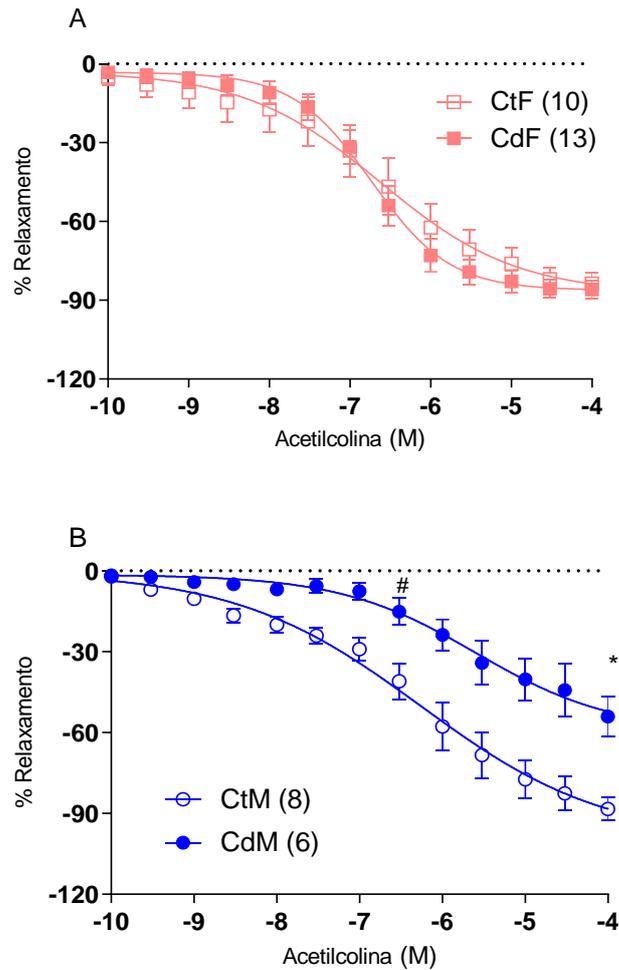


Figura 7: Os símbolos representam média  $\pm$  EPM, e o número de medidas está representado entre parênteses. A curva de ACh foi iniciada após contração máxima à fenilefrina. Não há diferença estatística entre as curvas ( $p > 0,05$ ). O número de animais está representado entre parênteses. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. Molar (M)

Tabela 3: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD2) à ACh de aorta de animais expostos ou não ao cádmio

		Rmax (%)	pD2
Fêmeas	CtF (10)	86,1 $\pm$ 4,3	6,9 $\pm$ 0,4
	CdF (13)	86,8 $\pm$ 3,7	6,8 $\pm$ 0,2
Machos	CtM (8)	96,8 $\pm$ 7,2	7,2 $\pm$ 0,2
	CdM (6)	58,2 $\pm$ 7,6*	6,6 $\pm$ 0,3*

Valores expressos em média  $\pm$  EPM; ANOVA 2 vias com poshoc de Tukey Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD2:  $-\log EC_{50}$ . O número de animais está representado entre parênteses.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através de curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico

(NO), em anéis previamente contraídos com Fe. Não foi encontrada diferença estatística nas respostas máximas e sensibilidade do relaxamento independente do endotélio entre o grupo Controle e o grupo Cádmio, tanto em machos quanto nas fêmeas (Figura 8, Tabela 4).

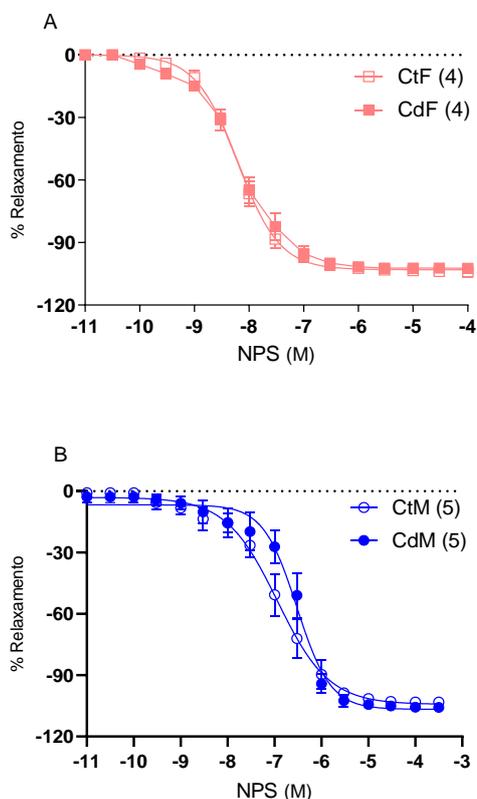


Figura 8: Os símbolos representam media +/- EPM, expressos como percentual de relaxamento ao NPS após a pré-contracção com fenilefrina. O número de animais está representado entre parênteses. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. Molar (M)

Tabela 4: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD2) das curvas de concentração-resposta ao NPS em segmentos isolados de aorta

	Rmax (%)	pD2
Fêmeas		
CtF (4)	103,1 ± 2,3	8,2 ± 0,1
CdF (4)	102,6 ± 1,1	8,1 ± 0,1
Machos		
CtM (5)	103,9 ± 2,7	7,9 ± 0,1
CdM (5)	106,4 ± 2,6	7,5 ± 0,1

Valores expressos em média e EPM; Teste t-Student não-pareado. Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD2: -log EC50. O número de animais está representado entre parênteses.

### 5.5.3 Efeito da exposição ao $\text{ClCd}_2$ por 30 dias sobre a reatividade à fenilefrina em anéis isolados de Wistar

Ao realizar a curva contração-resposta à Fe, agonista dos receptores  $\alpha$ -1 adrenérgico, observamos que nos segmentos de aorta de ratas expostas ao Cd não houve alteração da resposta máxima e/ou da sensibilidade quando comparado às ratas controle (Figura 9A, Tabela 5). Nos segmentos de aorta ratos machos expostos ao Cd foi possível observar que houve aumento da resposta máxima à Fe, mas sem alteração na sensibilidade (Figura 9B, Tabela 5).

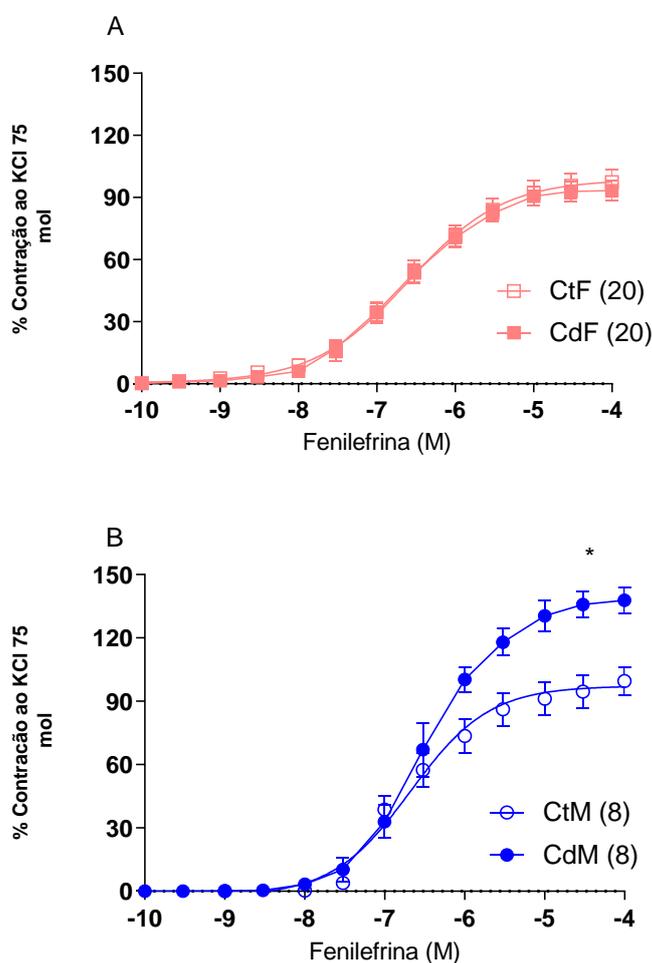


Figura 9: Os símbolos representam media  $\pm$  EPM expressos como percentual de contração após a pré-contração com fenilefrina. O número de animais está representado entre parênteses. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de  $R_{max}$  e  $pD_2$ . Molar (M)

Tabela 5: Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina

	Rmax (%)	pD2
Fêmeas		
CtF (20)	98,8 ± 3	6,6 ± 0,1
CdF (20)	94,4 ± 2,2	6,6 ± 0,1
Machos		
CtM (8)	97,3 ± 3,1	6,7 ± 0,1
CdM (8)	137,4 ± 3,8*	6,5 ± 0,1

Valores expressos em média e EPM; Teste t Student. Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD2: -log EC50. O número de animais está representado entre parênteses. P<0,05 CtM vs CdM

#### 5.5.4 Participação da via do óxido nítrico na exposição por 30 dias com ClCd<sub>2</sub> sobre a resposta vasoconstritora em aorta torácica

Para estudar a participação da via do NO nas respostas contráteis à Fe, utilizamos o inibidor não-seletivo da NOS, L-NAME (100 µM). Os segmentos de aorta de ratas incubados com o inibidor responderam aumentando a resposta à Fe, de maneira semelhante entre expostas e não-expostas ao Cd (Figura 10A, B, C e Tabela 6), sugerindo que esta via não foi afetada pela exposição ao metal.

Quando analisado o efeito da incubação do L-NAME em ratos machos, podemos observar aumento da reatividade à Fe em ambos os grupos Ct e Cd (Figura 10 D e E). No entanto, quando analisado a porcentagem da diferença da área abaixo da curva, foi observado que os animais expostos ao Cd tiveram redução da resposta à Fe, após incubação com L-NAME, sugere a redução da participação da via do NO em comparação com os animais controles (Figura 10 F e Tabela 6).

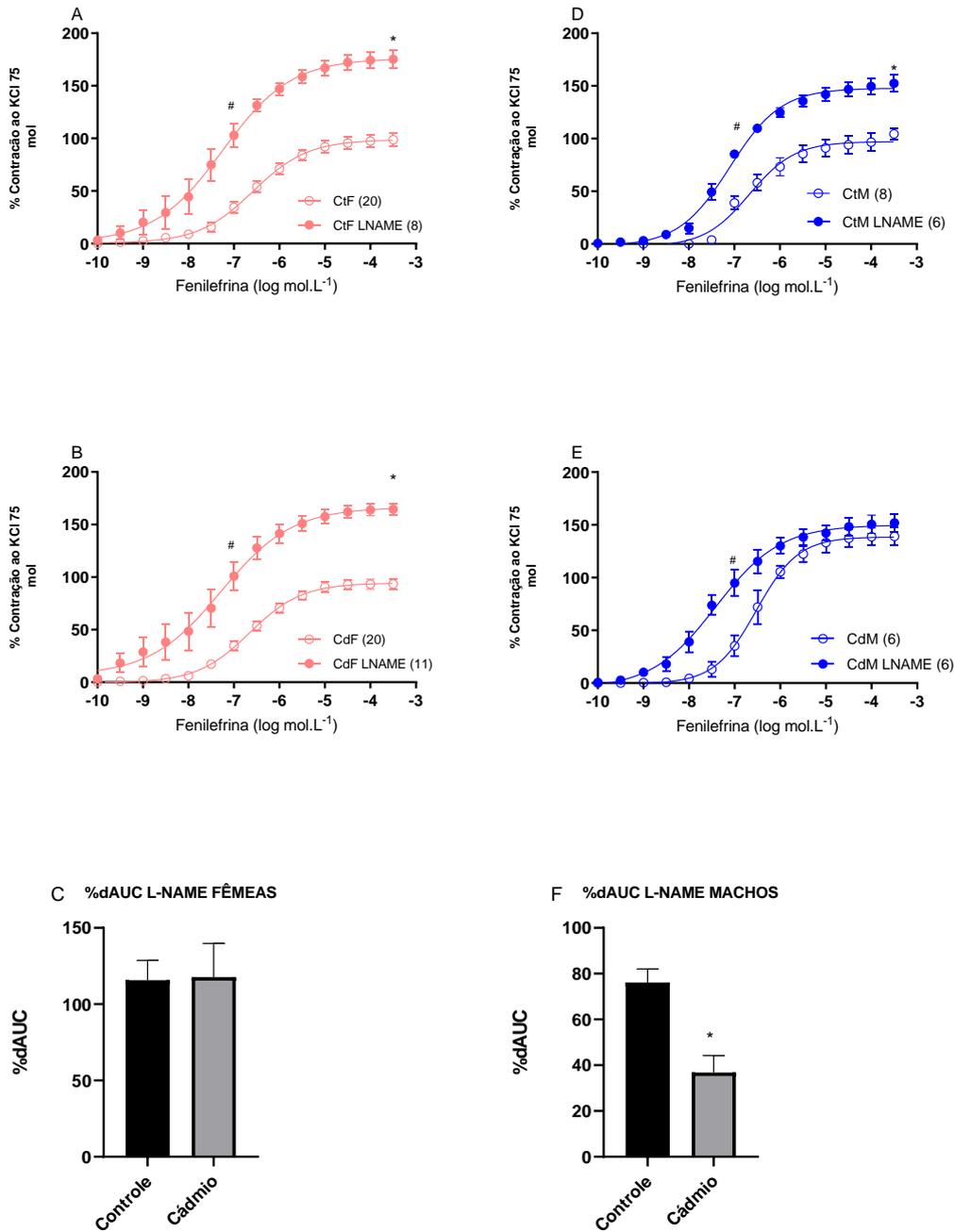


Figura 10: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em segmentos de aorta de ratas dos grupos Controle e Cádmi. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM; ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2.

Tabela 6: Sensibilidade (pD2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em segmentos da aorta obtidos dos grupos Controle e Cádmio.

		Rmax (%)		pD2	
		Sem L-NAME	L-NAME	Sem L-NAME	L-NAME
Fêmeas	CtF	98,8 ± 3,0	176 ± 6,2	6,6 ± 0,1	7,2 ± 0,1
	CdF	94,4 ± 2,2	166,4 ± 7,4	6,6 ± 0,1	7,3 ± 0,2
Machos	CtM	97,3 ± 3,1	147,8 ± 2,8*	6,7 ± 0,1	7,1 ± 0,1
	CdM	137,4 ± 3,4	150 ± 4,5	6,5 ± 0,1	7,4 ± 0,1

Valores expressos em média e EPM; Teste t Student não pareado. Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD2: -log EC50. P>0,05

### 5.5.5 Participação de espécies reativas de oxigênio na exposição por 30 dias com ClCd<sub>2</sub> sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é uma ERO que pode atuar em vias moduladoras do tônus vascular (HAMILTON et al. 2001). Com isso, investigamos a participação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na reatividade vascular à Fe de aorta de Wistar machos e fêmeas expostos ou não ao cádmio. Os anéis foram incubados com enzima catalase (1000 U/ml), que promove a degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formando H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>.

A incubação com a catalase não alterou de forma significativa a resposta contrátil dos anéis das ratas expostas ou não ao Cd (Figura 11). Porém, quando analisada a incubação com catalase em segmentos de aorta de ratos machos expostos ao Cd por 30 dias, é possível observar uma redução da resposta induzida pela Fe, sugerindo que o Cd aumenta a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 11D). Este resultado sugere que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está atuando como um fator contrátil em resposta à Fe em artérias de Wistar machos que foram expostos ao Cd (Figura 11, Tabela 7).

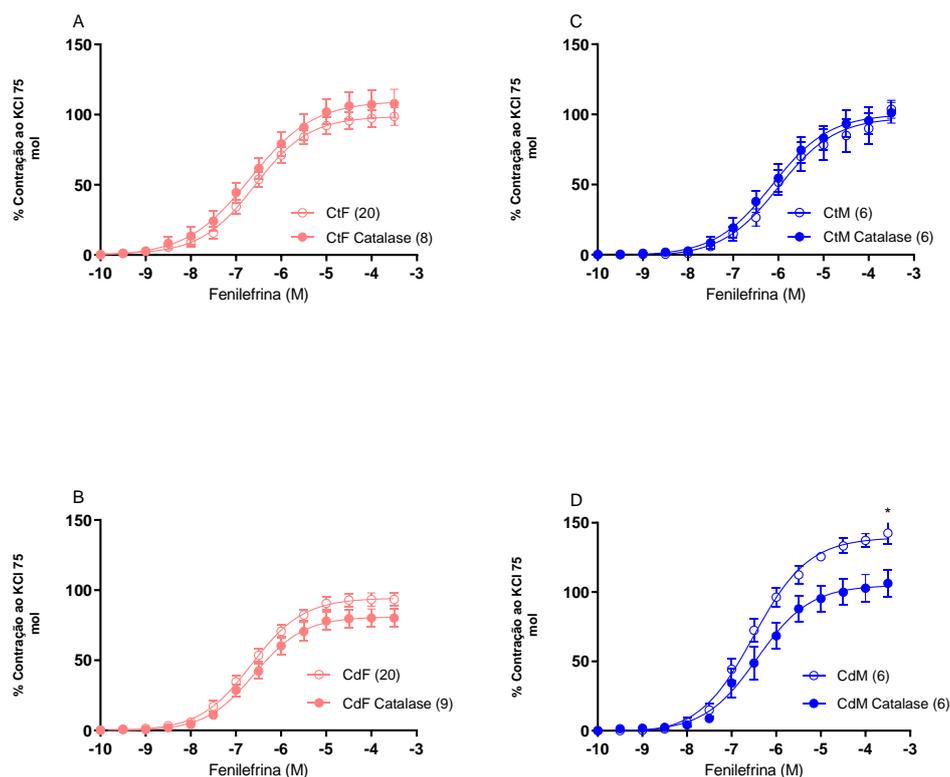


Figura 11: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença da enzima catalase em segmentos de aorta de Wistar machos e fêmeas dos grupos Controle e Cádmio. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. ANOVA 2 vias e poshoc de Tukey e Teste t de Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. \* $p < 0,05$ . Molar (M)

Tabela 7: Sensibilidade (pD2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da catalase em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Cádmio.

		Rmax (%)		pD2	
		Sem Catalase	Catalase	Sem Catalase	Calatase
Fêmeas	CtF	98,8 $\pm$ 3,0	93,4 $\pm$ 4,8	6,6 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,1
	CdF	94,8 $\pm$ 2,2	80,1 $\pm$ 6,4*	6,6 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1
Machos	CtM	97,3 $\pm$ 3,1	97,8 $\pm$ 5,9	6,7 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 0,1
	CdM	137,4 $\pm$ 3,4	104,9 $\pm$ 5	6,5 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,1

Valores expressos em média e EPM; ANOVA 2 vias com poshoc de Tukey Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD2:  $-\log EC_{50}$ . Entre parêntese o número da amostra. \* $p < 0,05$ .

A NADPH oxidase é um complexo enzimático e uma das mais importantes fontes de geração de EROs no organismo. Para o estudo de sua participação na resposta contrátil à Fe, foi utilizada a apocinina (30  $\mu$ M), um inibidor não-seletivo

da NADPH oxidase. Após incubação com apocinina, os anéis dos grupos fêmeas responderam de maneira semelhante à Fe (Figura 12A e B, Tabela 8).

No entanto, ao analisar a reatividade vascular à Fe após incubação com apocinina em aorta de ratos machos expostos ou não ao cádmio, foi possível observar uma redução da reatividade à Fe em ambos grupos, sendo que este efeito foi maior em ratos expostos ao metal (Figura 12 C e D, Tabela 8).

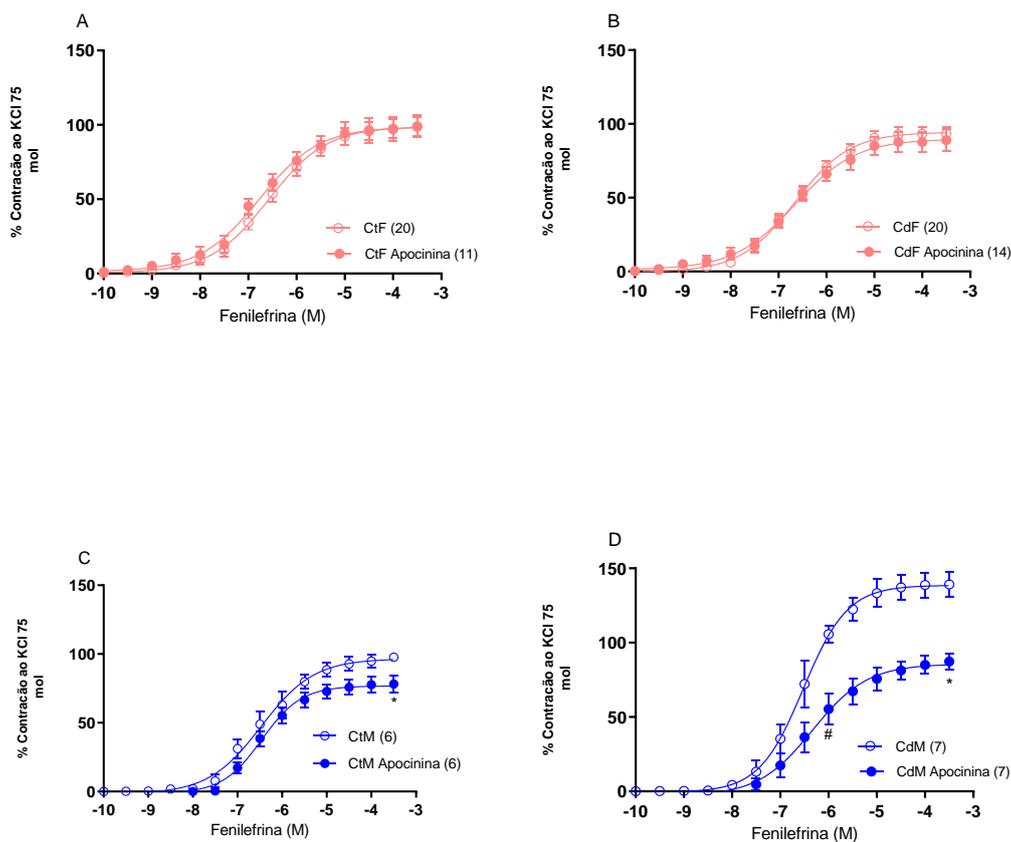


Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da apocinina em segmentos de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Cádmio. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média  $\pm$  EPM. ANOVA 2 vias com poshoc de Tukey e Teste t Student não-pareado para comparação de Rmax e pD2. Molar (M)

Tabela 8: Sensibilidade (pD2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de apocinina em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Cádmio.

Rmax (%)	pD2
----------	-----

		Sem Apocinina	Apocinina	Sem Apocinina	Apocinina
Fêmeas	CtF	98,8 ± 3	98,6 ± 3,7	6,6 ± 0,1	6,77 ± 0,1
	CdF	94,4 ± 2,2	89,7 ± 3,3	6,6 ± 0,1	6,65 ± 0,1
Machos	CtM	97,3 ± 3,1	77 ± 5,4	6,7 ± 0,1	6,48 ± 0,1
	CdM	137,4 ± 3,4	85,7 ± 4,1	6,5 ± 0,1	6,34 ± 0,1

Valores expressos em média e EPM; ANOVA 2 vias com poshoc de Tukey. Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD2: -log EC50.

## 5.6 Expressão proteica

### 5.6.1 Expressão proteica da eNOS

A fosforilação da eNOS no resíduo de SER 1177 ativa a enzima e a análise semi-quantificação desta na aorta foi analisada pela técnica de Western Blot. Não foi possível observar diferença significativa na expressão da peNOS (Ser1177) nos segmentos de aorta dos grupos de fêmeas analisados ( $p > 0,05$ ).

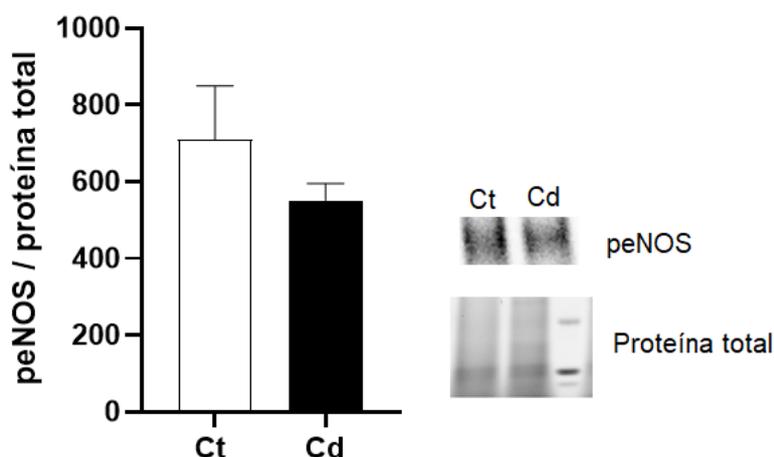


Figura 13: Expressão proteica da eNOS, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta abdominal de fêmeas dos grupos Controle (n=5) e Cádmio (n=3). Os resultados estão expressos pela média ± EPM, como relação entre a densidade das bandas da eNOS e da proteína total. Teste-t Student não pareado,  $p > 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

Esse estudo demonstra pela primeira vez que a exposição crônica ao cádmio afetou as respostas vasculares e a pressão arterial de forma dependente do sexo. Além disso, a concentração plasmática de cádmio foi duas vezes maior

em ratos machos que em fêmeas que foram expostas ao metal. Em ratos machos a exposição ao cádmio aumentou a pressão arterial e as respostas contráteis em segmentos de aorta, além de reduzir a vasodilatação mediada pelo endotélio. A disfunção endotelial induzida pela exposição ao cádmio em ratos machos parece estar envolvida no aumento do ânion superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que provavelmente reduziu a biodisponibilidade do óxido nítrico. Por outro lado, não houve alteração na pressão arterial e na resposta contrátil e vasodilatadora em ratas.

Ademais a exposição ao cádmio em machos e fêmeas reduziu o ganho de peso, mas não alterou a concentração de estrogênio no sangue das fêmeas. Tanto machos quanto fêmeas expostas ao metal tiveram aumento similar da MPO, que é uma enzima pró-inflamatória e pró-oxidativa.

## **6.1 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CÁDMIO**

Nesse estudo ratos machos e fêmeas foram expostos por 30 dias a uma solução de ClCd<sub>2</sub> na concentração de 100 ppm na água de beber. De fato, os 30 dias de exposição são suficientes para aumentar a concentração de Cd plasmático em roedores machos e fêmeas para níveis observados em estudos clínicos que variam de 2,74 a 4,72 µg/L (SADEGHI et al., 2014).

A ATDRS preconiza concentrações sanguíneas de até 5 µg/L de cádmio como seguras (ATSDR, 2012). Nosso estudo encontrou, em média, 2,89 µg/L no plasma em Wistar fêmeas após exposição por 30 dias ao cádmio. Já em machos, observou-se que a exposição por 30 dias ao metal, alcançou um valor médio de 4,7 ± 1,3 µg/L. A concentração plasmática de Cd reflete o quanto o indivíduo foi exposto ao metal de forma recente e pode ser afetada pela quantidade de Cd ingerida, sua taxa de absorção e distribuição aos órgãos (ADAMS; NEWCOMB, 2014).

Em humanos, a absorção de Cd via trato gastrointestinal é influenciada por alguns nutrientes essenciais, incluindo metais como o ferro, e o sexo feminino tende a ter maior absorção de Cd do que o masculino, conforme estudos anteriores (BERGIUND et al., 1994; WHANGER, 1979). No entanto, ratas fêmeas expostas de forma oral ao Cd parecem ter maior distribuição do

metal nos órgãos, principalmente rins e fígado, que ratos machos, o que justifica a maior concentração plasmática de Cd nos machos em nosso estudo (NWOKOCHA; OWU; STEPHEN UFEARO, 2011).

Outra forma de absorção é através do sistema respiratório, e a principal fonte é o tabagismo (DE SOUSA VIANA; GARCIA; MENEZES-FILHO, 2011) . Satarug et al. (2018), estudaram a concentração de Cd no sangue de 200 indivíduos, 100 homens e 100 mulheres, e encontraram uma concentração de 0.79 µg/L no plasma de homens e em mulheres foi de 0.47 µg/L (SATARUG et al., 2018). Importante ressaltar que esses indivíduos não tinham histórico de exposição a metais no local de trabalho e que a prevalência de tabagista entre os homens era de 30% e que nenhuma das 100 mulheres que participaram eram tabagistas (SATARUG et al., 2018).

Uma vez absorvido, o Cd se liga à metalotioneína e se acumula em órgãos e tecidos (Huang et al., 2006). Alguns trabalhos demonstram o papel do complexo cádmio-metalotioneína na deposição e eliminação do metal do organismo (THIRUMOORTHY et al., 2011). Portanto as diferenças sexuais na expressão da metalotioneína podem explicar as diferenças entre a concentração de Cd em órgãos, tecidos e no sangue entre ratos fêmeas e machos, observados em diversos estudos. No entanto, o progresso no conhecimento da fisiopatologia específica ao sexo sobre os efeitos dos metais pesados, incluindo o Cd, ainda é escasso. A maior parte dos estudos experimentais e clínicos foram realizados em apenas um sexo (principalmente em machos), e os autores extrapolam os resultados encontrados ao sexo oposto.

## **6.2 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO $Cd_2$ NO GANHO PONDERAL**

Ao final dos 30 dias, as ratas que foram expostas ao Cd apresentam menor ganho de peso em comparação as ratas do grupo Controle. O menor ganho de peso pela exposição ao Cd em machos é bem estabelecida na literatura e também foi observado no presente estudo. O trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa por Almenara e cols (2013), também encontrou menor ganho de peso, porém em ratos Wistar machos expostos ao  $Cd_2$  por 30 dias (ALMENARA et al., 2013). Além disso, Oliveira e cols (2018), encontraram menor

ganho de peso em animais ApoE<sup>-/-</sup> machos expostos ao metal por 28 dias, e associaram esse resultado à redução do consumo de ração (OLIVEIRA et al., 2018). Sompamit e colaboradores (2010), também encontraram restrição no ganho ponderal de camundongos machos ICR expostos por 8 semanas ao Cd, mas não houve diferença entre a ingestão de água e alimentos entre os grupos (SOMPAMIT et al., 2010). Os trabalhos citados acima utilizaram o mesmo modo de exposição e a mesma concentração de CdCl<sub>2</sub> que o nosso trabalho. Porém, essa redução do peso corporal também foi associada a outros modelos de exposição ao cádmio. Wang et al (2017), também expôs ratos Wistar machos ao ClCd<sub>2</sub> (0.4 mg/kg), entretanto, via intraperitoneal, cinco vezes na semana, durante cinco semanas e encontraram redução do peso nos animais expostos ao Cd quando comparados ao grupo controle (WANG, Y.-J. et al., 2017).

Nossos resultados e os trabalhos citados acima demonstram que a exposição ao Cd está associada à restrição do ganho ponderal, entretanto ainda não se sabe qual(ais) o(s) possível(eis) mecanismos induzidos pela exposição ao cádmio. O trabalho de Oliveira *et al.* (2018), associou a redução do consumo de ração com a redução do ganho de peso pelos animais, mas nem todos os trabalhos encontram resultado similar, com isso, são necessários mais estudos.

### **6.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO NA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA**

O presente estudo não encontrou mudança significativo da PAS de fêmeas Wistar expostas ao CdCl<sub>2</sub> por 30 dias. Entretanto, os machos expostos ao metal tiveram aumento em comparação ao grupo controle. Seguindo o mesmo modelo de exposição do presente estudo, Almenara e cols (2013), ao realizarem avaliação da PAS de Wistar machos por pletismografia de cauda encontraram aumento desde a primeira semana de exposição ao ClCd<sub>2</sub> (100 ppm via água de beber), sendo sustentada durante o restante da exposição ao metal por 30 dias (ALMENARA et al., 2013). O estudo de Donpunha e cols (2010) demonstrou que camundongos machos IRC (Institute Cancer Research) expostos a solução oral de 100 ppm de CdCl<sub>2</sub>, por 8 semanas, apresentaram aumento da PAS e PAD em comparação ao grupo controle. Essa mensuração foi realizada através de medida direta (DONPUNHA et al., 2011).

Perry e Erlanger (1981), demonstraram através de mensuração direta de pressão, que ratas da espécie Long-Evans desenvolveram hipertensão arterial sistólica e diastólica após exposição ao acetato de cádmio na água de beber (1 ppm de acetato de Cd) e através da dieta a base de centeio com 0,014 mg de Cd (PERRY; ERLANGER, 1981). Em 1979, Perry, Erlanger e Perry, expuseram fêmeas roedoras de espécies diferentes a várias concentrações de Cd e observaram que independente do sexo ou da linhagem do animal ocorreu aumento da pressão arterial sistólica de forma significativa, que chegavam a 50 mmHg de aumento em comparação ao animal controle. Importante salientar que esse estudo foi realizado durante um longo período de tempo, com exposição com duração de 18 meses.

Quando analisados humanos expostos ao Cd, Tellez-Plaza e cols (2008) encontraram associação entre os níveis de Cd sanguíneo com elevação dos níveis da pressão arterial, não atingindo, no entanto, valores de pressão que caracterizam hipertensão arterial sistêmica, ou seja, PAS igual/acima de 140 mmHg e PAD igual/acima de 90 mmHg (TELLEZ-PLAZA et al., 2008).

Gallagher and Meliker (2010), concluíram que havia evidências de uma associação positiva entre o Cd sanguíneo e a hipertensão entre mulheres, mas não entre homens (GALLAGHER; MELIKER, 2010). Já Garner e Levallois (2017), estudaram os níveis de Cd na urina e no sangue na população canadense com hipertensão. Os autores observaram uma correlação positiva entre os níveis de Cd sanguíneo e valores de pressão arterial (PAS e PAD), e maior possibilidade de hipertensão em indivíduos com níveis aumentados de cádmio no sangue. A mesma associação não foi encontrada para os níveis de Cd na urina. Além disso, ao analisarem as mulheres fumantes, não encontraram associação entre aumento de pressão e os níveis de Cd na urina (GARNER; LEVALLOIS, 2017).

A metanálise realizada por Caciari e cols (2013), também encontrou maior prevalência de hipertensão nos indivíduos expostos ocupacionalmente ao Cd do que os não expostos ao metal (CACIARI et al., 2013).

Assim, os resultados da literatura demonstram que, em roedores machos, a exposição ao Cd induz aumento de pressão arterial, resultado similar encontrado em nosso trabalho, porém Wistar fêmeas expostas ao Cd não demonstraram aumento da PAS. Uma das possíveis causas para o não aumento

da pressão pode ser o efeito cardioprotetor do estrogênio, uma vez que não foi observado alteração de seus níveis no presente trabalho, além do nível plasmático do Cd ser quase a metade em fêmeas do que foi encontrado nos machos. Os efeitos cardioprotetores do estrogênio incluem: regulação da expressão e atividade de enzimas antioxidantes, inibição da expressão da NADPH oxidase, aumento da produção de PGI<sub>2</sub>, aumento da biodisponibilidade de NO e diminuição da produção de substâncias como endotelina e angiotensina II (STREHLOW et al., 2003; WAGNER; SCHROETER; HECKER, 2001; WHITE, 2002).

#### **6.4 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE**

A MPO é uma enzima pró-inflamatória e pró-oxidativa, e sua atividade é uma medida da infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) (ZHAO et al., 2006). Em nosso estudo, a exposição ao Cd por 30 dias aumentou a atividade da mieloperoxidase, tanto em fêmeas quanto em machos, em semelhante magnitude.

Kataranovski et al., (2009), classificaram roedores machos e fêmeas em 4 grupos, onde 3 grupos foram expostos ao Cd em concentrações diferentes e concluíram que a exposição ao metal induziu maior inflamação sistêmica em machos do que em fêmeas (KATARANOVSKI et al., 2009).

Kataranovski, et al., (2010), mensuraram a atividade da MPO em tecido pulmonar de roedores após exposição ao ClCd<sub>2</sub>. Nesse estudo não foi observado diferença na atividade da MPO em relação a quantidade de tecido pulmonar de fêmeas após a exposição Cd, porém machos tiveram aumento significativo (KATARANOVSKI et al., 2010). Entretanto, também foi analisado a atividade da MPO nas células pulmonares, onde foi observado aumento da enzima em ambos os sexos, sendo que machos expostos ao Cd apresentam maiores níveis da atividade da MPO intracelular do que as fêmeas (KATARANOVSKI et al., 2010). Uma das possíveis explicações para que tenha ocorrido aumento da atividade da MPO é que metais pesados são estimuladores da atividade de neutrófilos (MUSHTAKOVA; FOMINA; ROGOVIN, 2005).

Da Costa et al. (2020), expuseram Wistar fêmeas por 30 dias ao  $\text{ClCd}_2$  na mesma concentração que nosso estudo e observaram que a MPO estava em maior concentração no tecido ovariano, devido a presença de neutrófilos. No tecido uterino não foi observada alteração na atividade da MPO (DA COSTA et al., 2020). Portanto, o presente trabalho reforça que a exposição ao cádmio possui ação pró-inflamatória.

## 6.5 CONCENTRAÇÃO DE ESTROGÊNIO

O cádmio é considerado um metaloestrógeno devido sua capacidade de se ligar e ativar os receptores alfa e beta de E2 e, simultaneamente, pode estimular a expressão de receptores de progesterona (JOHNSON et al., 2003; SILVA, N. et al., 2013).

Nasiadek *et al.* (2011), demonstraram que baixos níveis de Cd no sangue (0.33–3,5  $\mu\text{g/L}$ ) reduziram significativamente a concentração de estradiol no plasma (NASIADEK et al., 2011). Já Fittipaldi *et al.* (2019), demonstram que células endoteliais de veias umbilicais humanas expostas *in vitro* ao Cd apresentaram alteração na função e na expressão dos receptores de estrogênio. Isso resulta em aumento da sinalização dos receptores estrogênicos, que estão ligados ao estado pró-inflamatório, o que pode levar a lesão endotelial e disfunção vascular (FITTIPALDI et al., 2019).

Um estudo recente de da Costa et al. (2020), demonstrou que ratas Wistar exposta ao Cd por 30 dias também não tiveram alteração da concentração de estrogênio sanguíneo em relação ao grupo não exposto ao metal. No entanto, as fêmeas expostas ao Cd tiveram alteração no ciclo estral (DA COSTA et al., 2020).

Nesse estudo não foi observada alterações nos níveis do estrogênio em ratas expostas ao Cd, mesmo com a suposta atuação do Cd sobre os receptores de estrogênio e como consequência induzir inflamação e estresse oxidativo. Isso sugere que o papel cardioprotetor de estrogênio pode não ser alterado em ratas expostas ao Cd e pode ajudar a prevenir alterações no sistema cardiovascular.

## 6.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA E AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO

Nosso estudo demonstrou que a exposição ao CdCl<sub>2</sub> por 30 dias em ratas não alterou a resposta vasodilatadora tanto à ACh como ao NPS, porém quando analisamos os machos Wistar, reportamos redução da resposta dilatadora vascular à ACh e não houve alteração significativa na resposta ao NPS. Resultados contraditórios são encontrados na literatura sobre o efeito do cádmio na vasodilatação.

Tzotzes et al. (2007), também encontraram diferença na resposta vasodilatadora da aorta à ACh em machos Wistar expostos ao Cd através de injeções com Cd (0.5 mg/kg/i.m.) por 120 dias (TZOTZES et al., 2007). Sompamit et al. (2010) e Donpunha et al. (2011), quando expuseram camundongos machos IRC ao ClCd<sub>2</sub> (100 mg/L), encontraram redução da resposta vasodilatadora, tanto pela via dependente do endotélio como pela independente do endotélio na reatividade pressórica (DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010). Oliveira e cols. (2018), encontraram redução da resposta vasodilatadora à ACh em camundongos machos ApoE<sup>-/-</sup> expostos por 30 dias a 100 ppm de ClCd<sub>2</sub>, entretanto a resposta ao NPS não foi alterada (OLIVEIRA et al., 2018). Almenara et al. (2013), encontraram redução da resposta máxima à ACh, sem modificação da resposta ao NPS, em ratos machos expostos a 100 ppm por 30 dias na água de beber, resultado muito similar ao que foi encontrado em nosso estudo (ALMENARA et al., 2013).

Ronco et al. (2011), expuseram roedoras grávidas ao Cd e analisaram a reatividade vascular e a morfologia cardíaca da prole adulta. Observaram redução da reatividade vascular à ACh na prole de ambos os sexos (RONCO et al., 2011). O mesmo estudo também avaliou a reatividade vascular ao NPS e verificou um prejuízo da resposta vasodilatadora somente em machos (RONCO et al., 2011).

Observamos, portanto, que os dados da literatura divergem quanto ao efeito da exposição ao cádmio sobre a vasodilatação mediada ou não pelo endotélio, principalmente em ratos machos. Uma das possíveis explicações para tal divergência pode ser pelo modelo de exposição e o tempo de exposição que

os animais estão em contato com o metal e o nível da concentração de exposição.

Porém, os estudos com fêmeas expostas ao cádmio ainda não foram descritos. Assim, sugere-se que a ausência de alterações nas ratas expostas ao cádmio possa, pelo menos em parte, dever-se ao papel protetor do estrogênio no sistema cardiovascular. Cabe ressaltar que além do papel do estrogênio como protetor, a concentração de Cd encontrada em machos foi quase o dobro em comparação com a fêmeas. Essa diferença na concentração pode ser um dos motivos pelos quais as fêmeas não apresentaram nem redução de resposta à ACh, nem aumento da reatividade à Fe.

## **6.7 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA**

Nosso estudo demonstrou que a resposta contrátil à Fe em aorta de ratas expostas ao Cd por 30 dias foi semelhante quando comparadas as ratas não expostas ao metal. Resultado diferente foi observado em aorta de ratos machos, onde a exposição ao cádmio promoveu aumento da contração induzida pela Fe quando comparado ao grupo controle.

A influência da exposição ao Cd nas respostas vasculares aos agonistas adrenérgicos em ratas ainda não foi relatada. Porém, quando analisados estudos realizados com ratos machos, Almenara e cols (2013) obtiveram aumento da resposta contrátil à Fe pelo mesmo período de tempo e concentração do metal utilizado nesse trabalho (ALMENARA et al., 2013). Sompamit et al. (2010) e Donpunha et al. (2011) analisaram a reatividade pressórica de camundongos machos IRC expostos ao Cd e encontraram redução da resposta contrátil quando comparado aos do grupo controle (DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010). Oliveira et al (2018), também expuseram camundongos a 100 ppm CdCl<sub>2</sub> via água de beber, porém por 28 dias e camundongos das espécies C57BL/6 e ApoE<sup>-/-</sup> e não obtiveram alteração na resposta contrátil à Fe entre os animais que foram expostos ao metal e os que não foram expostos (OLIVEIRA et al., 2013). Tzotzes et al. (2007), analisou a reatividade vascular de aorta de Wistar machos expostos ao Cd (0,5 mg/kg/dia) por 120 dias e encontraram aumento na resposta contrátil ao KCl nos animais expostos ao metal quando

comparados aos animais não expostos. Quando analisada a resposta contrátil à Fe, não foi observada diferença entre os grupos (TZOTZES et al., 2007).

Já em um estudo agudo, quando analisada a reatividade dos segmentos da aorta após exposição *in vitro* ao  $\text{Cd}$  ( $10 \mu\text{M}$ ), foi observado aumento da contração à Fe em anéis de aorta de ratos machos (ANGELI et al., 2013).

Como podemos observar nos parágrafos acima, todos os estudos foram realizados em machos e nenhum em fêmeas. Esse é o primeiro trabalho a verificar que a exposição ao Cd pode trazer alterações aos vasos sanguíneos dependente do sexo. Provavelmente, a diferença das respostas entre os sexos pode ser explicada pela função protetora que o estrogênio exerce no sistema cardiovascular. As diferenças de concentração de Cd no sangue dos animais também pode interferir na resposta vascular. Com isso, a diferença das respostas entre os estudos apresentados sugere que a forma de exposição, o modelo experimental e sexo utilizado para a realização do estudo podem interferir nas respostas vasculares à Fe.

O E2 tem um papel cardioprotetor, devido ao aumento da capacidade antioxidante, estímulo do NO e entre outros (STREHLOW et al., 2003; WAGNER; SCHROETER; HECKER, 2001; WHITE, 2002), uma das possíveis explicações para o nosso resultado é que o E2 não foi alterado de forma significativa nas ratas, com isso ele impediria prejuízo a função vascular de fêmeas expostas ao Cd.

## **6.8 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE A VIA DO NO**

O estrogênio, principal hormônio sexual das fêmeas, atuando em seus receptores específicos, pode estimular a produção do NO. O estrogênio possui três principais receptores,  $\text{ER}\alpha$ ,  $\text{ER}\beta$ , and G-protein-coupled estrogen receptor (GPER). Algumas das funções conhecidas do receptor  $\text{ER}\alpha$  incluem a ativação da eNOS, prevenção da proliferação de células do músculo liso vascular e inibição da espessura da camada média vascular, contribuindo para uma redução do tônus vascular. O  $\text{ER}\beta$  reduz a hipertrofia cardíaca e inibe a fibrose cardíaca (DOS SANTOS et al., 2014).

Apesar de não termos encontrado alteração na reatividade à Fe em fêmeas, o papel modulatório do NO poderia ter sido modificado, uma vez que,

em machos houve redução do NO em resposta à Fe, como observamos nos gráficos, além do estudo de Almenara e cols., que corroboram com nossos resultados (ALMENARA et al., 2013). Com isso, avaliamos a participação do NO na curva concentração-resposta à Fe, por meio da incubação do L-NAME (100 µM), inibidor não-seletivo da NOS. O fármaco não alterou a similaridade das respostas entre as fêmeas Wistar. Esses dados sugerem que a exposição ao cádmio não alterou a modulação da resposta à fenilefrina mediada pelo NO nas fêmeas Wistar. Entretanto, quando realizado o bloqueio da NOS nos segmentos de aorta dos machos foi possível observar uma redução da modulação do NO na resposta à Fe após exposição ao cádmio.

Angeli e cols (2013) e Almenara e cols (2013), observaram redução dessa participação do NO na resposta contrátil à Fe após exposição ao Cd *in vitro* e 30 dias de exposição, respectivamente (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013). Além disso, Oliveira et al (2018), encontrou redução da modulação do NO no relaxamento induzido pela ACh em aorta de camundongos expostos ao Cd (OLIVEIRA et al., 2018). Esses três estudos realizados por nosso grupo de pesquisa sugerem que a exposição do Cd reduz a biodisponibilidade de NO e sua participação nas respostas vasculares em machos.

No trabalho desenvolvido por Almenara e cols (2013), a redução da biodisponibilidade de NO foi acompanhada de aumento da expressão proteica da eNOS em aorta de ratos expostos ao cádmio. Os autores sugeriram que o NO, nessa situação, poderia estar atuando como um agente antioxidante, uma vez que os autores também evidenciaram aumento do estresse oxidativo após exposição ao cádmio.

Kukongviriyapan et al. (2014) expuseram ratos IRC machos ao ClCd<sub>2</sub> por 8 semanas e demonstraram redução de 70% da expressão na eNOS em aortas dos machos que foram expostos ao metal (KUKONGVIRIYAPAN; APAIJIT; KUKONGVIRIYAPAN, 2016). Embora o presente trabalho e outros apontados na literatura tenham demonstrado que a exposição ao cádmio reduz a biodisponibilidade de NO, o mesmo não foi possível observar em fêmeas. Os resultados do nosso estudo não evidenciaram alterações na modulação do NO nem na expressão da eNOS em aorta de ratas expostas ao cádmio, quando comparadas ao grupo controle.

## 6.9 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE A VIA DOS RADICAIS LIVRES

No presente estudo, foi utilizada apocinina para avaliação da participação da NADPH oxidase na resposta contrátil à Fe. Em segmentos de aorta de machos foi observado que a droga reduziu a resposta contrátil vascular em ambos os grupos, controle e cádmio, entretanto em maior magnitude nas aortas de animais expostos ao Cd por 30 dias, o que sugere aumento da atividade da NADPH. O aumento da participação da NADPH oxidase e, portanto, aumento da liberação de ânion superóxido, pode estar associado à redução da biodisponibilidade de NO, contribuindo para o aumento da reatividade à Fe e redução do relaxamento à ACh observado na aorta de ratos expostos ao metal.

Em fêmeas, no entanto, a incubação com apocinina não modificou a reatividade à Fe em nenhum dos grupos estudados. Esses dados sugerem que a exposição ao Cd não afeta a participação da NADPH oxidase na contratilidade à fenilefrina de anéis isolados de aorta de ratas. Isso poderia ser explicado pelo fato de que o estrogênio pode atuar como um *scavenger* de espécies reativas de oxigênio produzidos pela NADPH oxidase, pois tem a capacidade de doar o íon hidrogênio da sua estrutura molecular (DOS SANTOS et al., 2014). Além disso, é importante destacar que os níveis plasmáticos de Cd observados nas fêmeas foi menor do que àquela evidenciada em machos, e isso também poderia resultar na diferença das respostas do Cd em relação ao estresse oxidativo quando comparados animais machos e fêmeas.

Três estudos do nosso laboratório (Angeli et al, 2013, Almenara et al, 2013 e Oliveira et al, 2018) demonstraram que a exposição ao Cd foi capaz de aumentar a produção de EROs em segmentos de aorta isolados de ratos machos (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013). Além dessas pesquisas, Sompamit et al. (2010) e Donpunha et al. (2011) também encontraram aumento da produção EROs em camundongos machos expostos ao metal (DONPUNHA et al., 2011; SOMPAMIT et al., 2010).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que há uma exacerbação da participação da NADPH oxidase na geração de ânion superóxido em aorta isolada de ratos e camundongos machos expostos ao cádmio quando comparados aos respectivos grupos controle

(Almenara et al., 2013; Oliveira et al., 2018). A NADPH oxidase é uma das principais geradoras de ânion superóxido em nível vascular (Griendling et al, 2000). No estudo realizado por Almenara e cols (2013), os autores verificaram um aumento da expressão proteica da NOX2 e maior liberação de EROs derivadas desta enzima em aorta de ratos machos expostos ao Cd.

Para avaliar a participação do peróxido de hidrogênio foi utilizada a enzima catalase (1000 U/ml), que catalisa a degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando oxigênio e água. A incubação com catalase não alterou a resposta contrátil à FE nas fêmeas expostas ao Cd quando comparadas ao grupo controle. No entanto, em machos, foi encontrado redução na resposta constritora nos animais que foram expostos ao metal, sugerindo que o cádmio aumenta a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultado similar foi observado por Almenara et al. (2013).

Almenara e cols (2013), demonstraram que a incubação com o catalase reduziu a resposta à Fe nos segmentos de aorta de ratos machos expostos ao CdCl<sub>2</sub>, alcançando os valores obtidos pelo grupo controle (ALMENARA et al., 2013), sugerindo que a exposição ao metal aumenta a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A NADPH oxidase é um complexo enzimático que produz espécies reativas, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (GRIENGLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de modular o tônus vascular, visto que é capaz de aumentar a expressão e a atividade NOS, assim, favorece a vasodilatação (HAMILTON et al. 2001). Entretanto, Satoh et al. (2014), analisou que altas concentrações do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode causar disfunção endotelial e aumentar a resposta contrátil (SATO et al., 2014), demonstrando assim um efeito duplo do peróxido de hidrogênio sobre a função vascular.

Já em aorta isolada de ratas expostas ou não ao cádmio, não foi possível observar diferenças na resposta à Fe após incubação com catalase, sugerindo que o Cd não altera a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

É importante reforçar que a exposição ao cádmio não alterou os níveis plasmáticos de estrogênio nas fêmeas. Os alvos de ação vasculoprotetora do estrogênio em nível vascular são similares aos alvos pelos quais o cádmio induz injúria vascular (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; STOCKAND et al., 1993), levantando a questão se as fêmeas são menos suscetíveis à disfunção vascular induzida pelo Cd.

## **7 CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que a exposição ao cádmio por 30 dias promove alterações na função cardiovascular de maneira sexo-dependente, embora o estado inflamatório tenha ocorrido de forma similar nos dois sexos. Em machos, observou-se aumento da pressão arterial e da resposta contrátil com redução do relaxamento dependente do endotélio em aorta isolada. A disfunção vascular observada em machos após exposição ao cádmio, está relacionada à redução do NO e aumento do estresse oxidativo.

Já em fêmeas, tanto a pressão arterial como as respostas contráteis e vasodilatadoras da aorta foram similares às encontradas em fêmeas não expostas.

As diferenças sexo-dependentes em relação aos efeitos vasculares induzidos pelo cádmio parecem ser devido ao efeito vasculoprotetor do estrogênio, uma vez que o nível hormonal não foi alterado pela exposição ao metal, bem como a menor concentração plasmática de cádmio observada nas fêmeas.

## 8 REFERÊNCIAS

ABU-HAYYEH, S. et al. Cadmium accumulation in aortas of smokers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 5, p. 863–867, 2001. Disponível em: <<http://pubget.com/paper/11348888/cadmium-accumulation-in-aortas-of-smokers>>.

ADAMS, S. v.; NEWCOMB, P. A. **Cadmium blood and urine concentrations as measures of exposure: NHANES 1999-2010. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**. [S.l: s.n.], mar. 2014

ALMENARA, C. C. P. et al. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013.

ANGELI, J. K. et al. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. **Free radical biology & medicine**, v. 65, p. 838–48, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.167>>.

ATAEI, N.; AGHAEI, M.; PANJEHPOUR, M. The protective role of melatonin in cadmium-induced proliferation of ovarian cancer cells. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 159–167, 2018.

ATSDR. Toxicological Profile for Cadmium. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service- U.S. Department of Health and Human Services**, n. September, p. 1–487, 2012. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158845/>>.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARON, J. A.; VECCHIA, C. Ia; LEVI, F. Current Development The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 162, n. 2, p. 502–514, 1990. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(90\)90420-C](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(90)90420-C)>.

BERGIUND, M. et al. **Intestinal Absorption of Dietary Cadmium in Women Depends on Body Iron Stores and Fiber Intake**. . [S.l.: s.n.], dez. 1994.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1549–1559, 2006.

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

BROSEGHINI-FILHO, G. B. et al. Acute cadmium exposure reduces the local angiotensin I converting enzyme activity and increases the tissue metal content. **Biological Trace Element Research**, v. 166, n. 2, p. 149–156, 1 ago. 2015.

CACIARI, T. et al. Cadmium and hypertension in exposed workers: A meta-analysis. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 26, n. 3, p. 440–456, 2013.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. **Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. Atherosclerosis**. [S.l.]: Elsevier Ireland Ltd. , 1 maio 2016

CHAMBLISS, K. L.; SHAUL, P. W. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 665–686, 2002.

CHEGRESE, H. e. Endocrine Disruption by Cadmium, a Common Environmental Toxicant with Paradoxical Effects on Reproduction. n. 3, p. 383–92, 2004.

- CLINE, M. J.; LEHRER, R. I. D-amino acid oxidase in leukocytes: A possible D-amino-acid-linked antimicrobial system. **Microbiology**, v. 62, p. 756–63, 1969.
- 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, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116154>>.
- DE ANGELIS, C. et al. The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive functions and its implication in fertility. **Reproductive Toxicology**, v. 73, p. 105–127, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.021>>.
- DE SOUSA VIANA, G. F.; GARCIA, K. S.; MENEZES-FILHO, J. A. Assessment of carcinogenic heavy metal levels in Brazilian cigarettes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 181, n. 1–4, p. 255–265, 2011.
- DEL RIO, D.; SERAFINI, M.; PELLEGRINI, N. Selected Methodologies to Assess Oxidative/Antioxidant Status in Vivo: A Critical Review. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD**, v. 12, n. 6, p. 343–351, dez. 2002.
- 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.
- DOS SANTOS, R. L. et al. Sex hormones in the cardiovascular system. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 18, n. 2, p. 89–103, 2014.
- 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.
- EDWARDS, J. R.; PROZIALECK, W. C. **Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. Toxicology and Applied Pharmacology**. [S.l: s.n.]. , 1 ago. 2009
- ELINDER, C. G. et al. Assessment of renal function in workers previously exposed to cadmium. **British journal of industrial medicine**, v. 42, n. 11, p. 754–60, 1985. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1007572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- EUM, K. D.; LEE, M. S.; PAEK, D. Cadmium in blood and hypertension. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 1, p. 147–153, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.037>>.
- FADLOUN, Z; LEACH, G. D. H. The effects of Cd<sup>2+</sup> on the myogenic activity and the responsiveness of the rat portal. **Pulmonary Circulation**, p. 181–182, 1979.
- FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.
- FITTIPALDI, S. et al. Cadmium exposure alters steroid receptors and proinflammatory cytokine levels in endothelial cells in vitro: a potential

mechanism of endocrine disruptor atherogenic effect. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 42, n. 6, p. 727–739, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40618-018-0982-1>>.

FLORIAN, M.; FREIMAN, A.; MAGDER, S. Treatment with 17- $\beta$ -estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. **Steroids**, v. 69, n. 13–14, p. 779–787, 2004.

FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease: Causes, defense mechanisms and potential therapies. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 6, p. 338–349, 2008.

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

GALLAGHER, C. M.; MELIKER, J. R. Blood and urine cadmium, blood pressure, and hypertension: A systematic review and meta-analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 12, p. 1676–1684, 2010.

GARNER, R. E.; LEVALLOIS, P. Associations between cadmium levels in blood and urine, blood pressure and hypertension among Canadian adults. **Environmental Research**, v. 155, n. October 2016, p. 64–72, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.040>>.

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. **NAD(P)H Oxidase Role in Cardiovascular Biology and Disease**. . [S.l: s.n.], 2000. Disponível em: <<http://www.circresaha.org>>.

GRIZZO, L. T.; CORDELLINI, S. Perinatal lead exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. **Toxicological Sciences**, v. 103, n. 1, p. 207–214, 2008.

GUETTA, V. et al. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. **Circulation**, v. 96, n. 9, p. 2795–2801, 1997.

HAYNES, M. P. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase via the PI3-Kinase – Akt. p. 677–682, 2000.

HAYNES, M. P. et al. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2118–2123, 2003.

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

JACOBSON, K. B.; TURNER, J. E. **THE INTERACTION OF CADMIUM AND CERTAIN OTHER METAL IONS WITH PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS\***. **Toxicology**. [S.l: s.n.], 1980.

JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, v. 68, p. 167–182, 2003.

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

JOHNSON, M. D. et al. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. **Nature Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1081–1084, 2003.

JURKOWSKA, K. et al. **The impact of metalloestrogens on the physiology of male reproductive health as a current problem of the XXI century.** **Journal of Physiology and Pharmacology**. [S.l.]: Polish Physiological Society. , 1 jun. 2019

KATARANOVSKI, M. et al. Gender differences in acute cadmium-induced systemic inflammation in rats. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–7, 2009.

\_\_\_\_\_. **Gender Differences in Pulmonary Inflammation Following Systemic Cadmium Administration in Rats.** **BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES**. [S.l: s.n.], 2010. Disponível em: <[www.besjournal.com](http://www.besjournal.com)>.

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

KLASSEN, R. B. et al. Megalin mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 287, n. 3 56-3, p. 393–403, 2004.

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

KOLLURU, G. K. et al. Cadmium induced endothelial dysfunction: Consequence of defective migratory pattern of endothelial cells in association with poor nitric oxide availability under cadmium challenge. **Cell Biology International**, v. 30, n. 5, p. 427–438, maio 2006.

KUKONGVIRIYAPAN, U.; APAJIT, K.; KUKONGVIRIYAPAN, V. Oxidative Stress and Cardiovascular Dysfunction Associated with Cadmium Exposure : Beneficial Effects of Curcumin and Tetrahydrocurcumin. **Tohoku J Exp Med.**, p. 25–38, 2016.

MARTYNOWICZ, H. et al. **Serum vasoactive agents in rats poisoned with cadmium Evaluation of sleep quality, vascular endothelial function, cardiovascular risk, thyroid function, masticatory muscles function and psycho-emotional status in patients with bruxism.** View project **Effect of PUFA on cardiovascular system.** View project. **Article in International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**. [S.l: s.n.], 2004. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/7884685>>.

MASSÁNYI, P. et al. Effects of cadmium on ultrastructure and steroidogenesis in cultured porcine ovarian granulosa cells. **Acta Veterinaria Brno**, v. 69, n. 2, p. 101–106, 2000.

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

- MENKE, A. et al. Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 2, p. 190–196, 2009.
- MONCADA, M.; PALMER, R.; HIGGES, EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews.**, v. 43, p. 109–142, 1991.
- MUSHTAKOVA, V. M.; FOMINA, V. A.; ROGOVIN, V. v. **Toxic Effect of Heavy Metals on Human Blood Neutrophils. Translated from Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Biologicheskaya.** [S.l: s.n.], 2005.
- NASIADEK, M. et al. The effect of cadmium on steroid hormones and their receptors in women with uterine myomas. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 734–741, 2011.
- NISHINO, T. et al. Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. **FEBS Journal**, v. 275, n. 13, p. 3278–3289, 2008.
- NWOKOCHA, C. R.; OWU, D. U.; STEPHEN UFEARO, C. **Estimation Of Absorbed Cadmium In Tissues Of Male And Female Albino Rats Through Different Routes Of Administration Effect of chronic consumption of thermoxidized palm oil on the renal Na/K ATPases View project Effect of Quercetin on Cadmium Chloride-Induced Reproductive Toxicity in Male and Female Rats View project.** . [S.l: s.n.], 2011. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/221815175>>.
- OECD. Risk Reduction Monograph N° 5 : Cadmium. Background and national experience with reducing risk. n. December, p. 1–6, 1995.
- OLIVEIRA, T. F. et al. Chronic Cadmium Exposure Accelerates the Development of Atherosclerosis and Induces Vascular Dysfunction in the Aorta of ApoE –/– Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 187, n. 1, p. 163–171, 2018.
- OZTURK, I. M. et al. Determination of acute and chronic effects of cadmium on the cardiovascular system of rats. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 19, n. 4, p. 308–17, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19778222>>.
- PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/327524a0>>.
- PERRY, H. M.; ERLANGER, M. W. Sodium retention in rats with cadmium-induced hypertension. **Science of the Total Environment, The**, v. 22, n. 1, p. 31–38, 1981.
- RATTMANN, Y. D. MECANISMOS ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NOS EFEITOS VASCULARES DA *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. **Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.**, v. 145f, p. 167, 2009.
- RONCO, A. M. et al. Maternal exposure to cadmium during gestation perturbs the vascular system of the adult rat offspring. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 251, n. 2, p. 137–145, 1 mar. 2011.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. **Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle**. . [S.l: s.n.], 1986. Disponível em: <[www.physiology.org/journal/ajpheart](http://www.physiology.org/journal/ajpheart)>.

SADEGHI, N. 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, 2014.

SAPMAZ-METIN, M. et al. A morphological study of uterine alterations in mice due to exposure to cadmium. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 92, n. 4, p. 264–273, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10520295.2017.1305500>>.

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

\_\_\_\_\_. Chronic exposure to low-level cadmium induced zinc-copper dysregulation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 46, n. October 2017, p. 32–38, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.11.008>>.

\_\_\_\_\_. Influence of body iron store status and cigarette smoking on cadmium body burden of healthy Thai women and men. **Toxicology Letters**, v. 148, n. 3, p. 177–185, 2004.

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

SATOH, K. et al. Dual roles of vascular-derived reactive oxygen species-With a special reference to hydrogen peroxide and cyclophilin A-. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 73, p. 50–56, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.12.022>>.

SERAFINI, M.; DEL RIO, D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? **Redox Report**, v. 9, n. 3, p. 145–152, 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/135100004225004814>>.

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

SILVA, N. et al. Metalloestrogen cadmium stimulates proliferation of stromal cells derived from the eutopic endometrium of women with endometriosis. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 52, n. 4, p. 540–545, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tjog.2013.10.015>>.

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

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**, v. 266, n. 5, p. 68–71, 74–7, maio 1992.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.04.007>>.

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

STOCKAND, J. et al. Interactions of Cadmium and Nickel with K Channels of Vascular Smooth Muscle. **Toxicology and Applied Pharmacology**, p. 30–35, 1993.

STREHLOW, K. et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circulation Research**, v. 93, n. 2, p. 170–177, 2003.

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

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075–1081, 2003.

TELLEZ-PLAZA, M. et al. Cadmium exposure and hypertension in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). **Environmental health perspectives**, v. 116, n. 1, p. 51–56, 2008.

THIRUMOORTHY, N. et al. **A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology.** **World Journal of Surgical Oncology**. [S.l.: s.n.], 20 maio 2011

TOKUSHIGE, A. et al. **Cadmium Effect on the Na,K-ATPase System in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells.** . [S.l.: s.n.], 1984. Disponível em: <<http://ahajournals.org>>.

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.

URAKAMI-HARASAWA, L. et al. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2793–2799, 1997.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272506002196>>.

VANHOUTTE, P. M.; EBER, B. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 103, n. 14, p. 405–11, 1991.

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**, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-017-1150-8>>.

WAGNER, A. H.; SCHROETER, M. R.; HECKER, M. 17 $\beta$ -Estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2121–2130, 2001.

WANG, Y.-J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells repair cadmium-induced rat testis injury by inhibiting mitochondrial apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 271, p. 39–47, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279717300741>>.

WASSMANN, S. et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 103, n. 3, p. 435–441, 2001.

WHANGER, P. D. **Cadmium Effects in Rats on Tissue Iron, Selenium, and Blood Pressure; Blood and Hair Cadmium in Some Oregon Residents. Environmental Health Perspectives**. [S.l: s.n.], 1979.

WHITE, R. E. Estrogen and vascular function. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 73–80, 2002.

WOOLFSON, R. G.; POSTON, L. Effect of N(G)-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxation of human subcutaneous resistance arteries. **Clinical Science**, v. 79, n. 3, p. 273–278, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Exposure to cadmium: a major public health concern. **Preventing Disease Through Healthy Environments**, p. 3–6, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf>>.

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

ZHAO, Z. et al. Oral exposure to cadmium chloride triggers an acute inflammatory response in the intestines of mice, initiated by the over-expression of tissue macrophage inflammatory protein-2 mRNA. **Toxicology Letters**, v. 164, n. 2, p. 144–154, 1 jul. 2006.