

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ELETROMECAÂNICA CARDÍACA E REATIVIDADE
VASCULAR

LORRAINE CHRISTINY COSTA SEPULCHRO MULHER

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO IN
VITRO AO CÁDMIO EM AORTA DE RATAS WISTAR

VITÓRIA
2023

LORRAINE CHRISTINY COSTA SEPULCHRO MULHER

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO IN
VITRO AO CÁDMIO EM AORTA DE RATAS WISTAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, na área de Fisiologia Cardiovascular.

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

VITÓRIA
2023

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

M954a Mulher, Lorraine Christiny Costa Sepulchro, 1996-
Avaliação da função vascular induzida pela exposição in vitro ao
cádmio em aorta de ratas wistar / Lorraine Christiny Costa
Sepulchro Mulher. - 2023.
87 f. : il.

Orientadora: Alessandra Padilha Simão.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Cádmio. 2. Vasos sanguíneos - Doenças. 3. Aorta. 4.
Endotélio. I. Simão, Alessandra Padilha. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III.
Título.

CDU: 612



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

Ata da sessão de defesa de dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **LORRAINE CHISTTINY COSTA SEPULCHRO**, candidata ao título de mestre em Ciências Fisiológicas, realizada às 14:00 do dia 01 de março do ano dois mil e vinte e três, na Universidade Federal do Espírito Santo. A presidente da Banca e orientadora, Prof^ª. Dr^ª Alessandra Simão Padilha, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), apresentou os demais membros da comissão examinadora, constituída pelos Doutores: Nazaré Souza Bissoli da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como examinador interno e Camila Almenara Cruz Pereira da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), como examinador externo, Marcelo Perim Baldo da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) como suplente externo, Ivanita Stefanon da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) como suplente interno. Em seguida, cedeu a palavra ao candidato que em 60 minutos apresentou sua dissertação intitulada **“AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CÁDMIO EM ARTÉRIAS DE CONDUTÂNCIA DE RATOS WISTAR FÊMEAS.”**. Terminada a apresentação da aluna, a presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. O presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a dissertação havia sido aprovada e que o aluno deve providenciar dentro do período de 60 dias, a versão final da dissertação. O Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e eu, Jéssica Ribeiro da Silva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, lavrei a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Vitória, 01 de março de 2023.

Prof. Dr^ª. Alessandra Simão Padilha
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Nazaré Souza Bissoli
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Titular interno

Prof. Dr^ª. Camila Almenara Cruz Pereira
Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) – Titular Externo



Campus Universitário de Maruípe – Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória – ES, 29043-900
Tel. (27)3335-7340 | cienciasfisiologicas.ufes.br | pos.cienciasfisiologicas@ufes.br



Documento assinado digitalmente

CAMILA ALMENARA CRUZ PEREIRA

Data: 09/03/2023 10:23:25-0300

Verifique em <https://verificador.itl.br>



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
NAZARE SOUZA BISSOLI - PROFESSOR VOLUNTÁRIO
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - PPGCFi/CCS
Em 09/03/2023 às 13:19

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/664838?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 09/03/2023 às 14:00

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/664893?tipoArquivo=O>

*“Porque dEle, por meio dEle e para Ele,
são todas as coisas.”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo. Graças a Ele, por suas promessas e por toda sua infinita misericórdia, consegui concluir mais essa etapa da minha jornada.

Aos meus pais, por todo ensinamento, por nunca terem medido esforços para que dentro da nossa realidade, eu pudesse me tornar aquilo que eu sempre sonhei. Sem vocês, eu não teria conseguido. Essa conquista é para vocês.

A minha irmã, que sempre acreditou em mim, que em todos os momentos difíceis da minha vida, esteve ao meu lado, segurando a minha mão e acreditando no meu potencial. Você também faz parte disso, Bru.

A minha avó Reinildes, que além de avó, sempre foi uma mãe para mim. Aquela que com palavras de afirmação e através de sua oração, sempre me lembrou do cuidado de Deus para comigo.

Ao amor da minha vida, Luan, que em toda minha jornada acadêmica esteve ao meu lado, me apoiado, me encorajando e sendo meu ombro para chorar. Aquele que sempre acreditou em mim, até mesmo quando eu não acreditei. Essa conquista é nossa.

Aos meus anjos, José Claudio, Zulma e Cival, que estiveram ao meu lado no início dessa caminhada, mas que infelizmente não estão comigo hoje para comemorar. Obrigada, por deixarem em mim a parte mais linda de vocês. Vovô Zé Claudio, estou no caminho de me tornar a “dotôra” que o senhor sempre sonhou.

A minha família, Zetinha, Karol e aos amigos que sempre me encorajaram a ser uma mulher forte e perseverante, e nunca deixaram de acreditar em mim.

À professora Alessandra, que me acolheu como filha científica, por todo suporte, carinho, empatia e disponibilidade. Tê-la como inspiração, é uma honra.

Ao professor Rueff, por ter sido meu encorajador no mundo da pesquisa e por ser minha referência acadêmica. O senhor também faz parte dessa jornada.

Ao professor Pablo Gava, que acreditou em meu potencial e que me apresentou ao LEMC, muito obrigada.

Às minhas amigas de laboratório, Rakel, Karol, Camilla e Ingridy, que tornaram os dias intensos em momentos leves e divertidos. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui. Obrigada por serem meu braço direito e esquerdo.

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

Ao Laboratório Multiusuário de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) e ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) - CCS/UFES.

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 HISTÓRIA E PROPRIEDADES DO CÁDMIO	23
1.2 ROTAS DE EXPOSIÇÃO	23
1.3 MECANISMOS DE ABSORÇÃO E TRANSPORTE DE CÁDMIO	27
1.4 AÇÕES DO CÁDMIO SOBRE OS DIVERSOS SISTEMAS	28
1.5 AÇÕES DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	29
1.6 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E FUNÇÃO VASCULAR.....	34
1.7 O CÁDMIO COMO LIGANTE DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO	35
1.8 JUSTIFICATIVA.....	36
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	38
3.2 OBTENÇÃO DA AORTA	38
3.2.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular	40
3.2.2 Avaliação do endotélio vascular.....	41
3.2.3 Protocolos experimentais	41
3.2.4 Quantificação “in situ” de óxido nítrico.....	42
3.2.5 Quantificação de ânion superóxido “in situ”.....	43
3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44

3.3 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS.....	46
4.1 REATIVIDADE VASCULAR.....	46
4.1.1 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente (ACh) do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica	46
4.1.2 Avaliação da resposta vasodilatadora independente (NPS) do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica	46
4.1.3 Participação da enzima guanilato ciclase solúvel no relaxamento independente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica	47
4.1.4 Contração do músculo liso vascular ao Cloreto de Potássio (KCl)	49
4.1.5 Reatividade à fenilefrina de segmentos isolados de aorta.....	49
4.1.6 Participação do tecido adiposo perivascular (TAP) na resposta à fenilefrina de segmentos isolados de aorta.....	50
4.1.7 Efeitos da exposição in vitro ao Cádmio sobre a modulação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	51
4.1.8 Efeitos da exposição in vitro ao Cádmio sobre vias vasoativas endoteliais na resposta vasoconstritora à fenilefrina	53
4.2 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ERA DE ESTROGÊNIO NA RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA	64
4.3 ANÁLISE DA ARQUITETURA ENDOTELIAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	65

6 DISCUSSÃO	66
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
8 REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais rotas de exposição ao Cádmiio e seus efeitos tóxicos nas diferentes partes do corpo.

Figura 2: Esquema ilustrativa do processo de obtenção da aorta torácica de rato e montagem dos anéis isolados para avaliação da reatividade vascular “in vitro”.

Figura 3: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems.

Figura 4: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 1g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Précontração com fenilefrina (Fe) 10^{-4} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-3} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.

Figura 5: Esquema representativo da ordem e tempo de exposição ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e aos fármacos.

Figura 6: Resposta dilatadora induzida pela ACh em segmentos de aorta de ratas dos grupos Ct e Cd. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração à Fe. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) $P > 0,05$.

Figura 7: Resposta dilatadora induzida pelo NPS em segmentos de aorta de ratas dos grupos Ct e Cd. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração à Fe. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) $*P < 0,05$.

Figura 8: (A-B) Resposta dilatadora induzida pelo NPS na presença ou não de azul de metileno em segmentos de aorta de ratas dos grupos Ct e Cd. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração à Fe. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) *P < 0,05. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, P > 0,05.

Figura 9: Avaliação da função muscular lisa dos segmentos de aorta (Δ Contração ao KCL). Valores expressos em média e EPM; p > 0,05, Teste t de Student não pareado.

Figura 10: Curvas concentração-resposta a Fe em segmentos aórticos dos grupos Ct e Cd após exposição in vitro ao CICd2. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. P > 0,05.

Figura 11: (A-C) Curvas concentração-resposta a Fe em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct TAP e Cd TAP. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05 vs contração do Controle à mesma concentração de Fe.

Figura 12: (A-C) Curvas concentração-resposta a Fe em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct E- e Cd E- após a remoção do endotélio. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. *P > 0,05 vs contração do Controle à mesma concentração de Fe. (D) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, p > 0,05.

Figura 13: (A, B e C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não do L-NAME em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct L-name e Cd L-name. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. *P < 0,05 vs contração do Controle à mesma concentração de Fe. (D) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, P > 0,05.

Figura 14: Detecção de NO “in situ” em secções de aorta. (A) Imagens representam os segmentos de aorta marcados com a sonda fluorescente DAF-2 no grupo Controle e Cádmio na presença e ausência de L-NAME. (B) Gráfico demonstrando a análise semi-quantitativa dos níveis de fluorescência. Dados expressos em média \pm EPM da densidade de fluorescência. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. $P > 0,05$.

Figura 15: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Indometacina em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct indometacina e Cd indometacina. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. $*P < 0,05$ vs contração do Controle à mesma concentração de Fe.

Figura 16: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Enalapril em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct Enalapril e Cd enalapril. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. $*P < 0,05$ vs contração do Controle à mesma concentração de Fe. $\#P < 0.05$ CtT Enalapril vs Cd Enalapril. (D) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, $*P < 0,05$.

Figura 17: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de TEA em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct TEA e Cd TEA. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. $*P < 0,05$ vs contração do Controle à mesma concentração de Fe. $\#P < 0.05$ Ct TEA vs Cd TEA. (D) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, $*P < 0,05$.

Figura 18: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de SOD em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct SOD e Cd SOD. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. $*P < 0,05$ vs contração do Controle à mesma concentração de Fe.

Figura 19: Detecção “in situ” da produção de ânion superóxido em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência representando secções transversais

de aorta torácica na presença de DHE de animais do grupo Controle (Ct) e Cádmio (Cd). A especificidade do método foi avaliada pela incubação das aortas com o Tiron (1mM). Gráfico de barras demonstrando a análise semiquantitativa. Os dados estão expressos em média \pm EPM da densidade de fluorescência. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. *P < 0,05 vs Cd.

Figura 20: Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Apocinina em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct apocinina e Cd apocinina. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni P > 0,05

Figura 21: Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Catalase em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct catalase e Cd catalase. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni P > 0,05.

Figura 22: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Fulvestrant em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct fulvestrant e Cd fulvestrant. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni *P < 0,05.

Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura mostrando fotomicrografia representativa da estrutura endotelial de aorta de ratas Controle (Ct) e Cádmio (Cd). Barra de escala 10 μ m (ampliação de x1000). Asterisco: superfície endotelial; seta branca: célula endotelial.

Figura 24: Resumo gráfico dos achados do presente estudo com sugestão de mecanismos pelos quais a exposição in vitro ao Cádmio leva à disfunção vascular em ratas. Fonte própria a partir dos servidores Canva e Server Medical Art.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

17beta-estradiol (E2)

4,5-diaminofluoresceína (DAF-2)

Acetilcolina (Ach)

Angiotensina II (Ang II)

Ânion superóxido (O^{2-})

Área abaixo da curva (AUC)

Azul de metileno (AM)

Barreira Hematoencefálica (BHE)

Cádmio (Cd)

Cálcio (Ca^{+2})

Canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC),

Canais para K^{+} ativados por cálcio – KCa

Canais para K^{+} voltagem dependentes (K_v)

Canais para K^{+} ativados por cálcio (K_{Ca})

Canais para K^{+} sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Canais para potássio retificadores (K_{IR})

Células do músculo liso vascular (CMLV)

Chumbo (Pb)

Ciclooxigenase (COX)

Ciclo-oxigenase 1 (COX1)

Ciclo-oxigenase 2 (COX2)

Cloreto de cádmio (ClCd2)

Cloreto de polivinil (PVC)

Cloreto de Potássio (KCl)

Cobre (Cu)

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

Dihidroetídeo (DHE)

Doenças cardiovasculares (DCV)

Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG)

eNOS fosforilada (peNOS)

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Erro padrão da média (EPM)

Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

Esclerose Múltipla (EM)

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF)

Fenilefrina (FE)

Guanilato ciclase solúvel (GCs)

Glutathione peroxidase (GPx)

Hiperpolarização derivada do endotélio (HDE)

Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP)

Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS)

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

Mercúrio (Hg)

Metalotioneína (MT)

Micromolar (μM)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Monócito de carbono (CO)

Músculo liso vascular (MLV)

NADPH Oxidase 2 (NOX-2)

Níquel (Ni)

Nitroprussiato de sódio (NPS)

Norma Regulamentadora 7 (NR 7)

NOS constitutiva (c-NOS)

NOS induzível (i-NOS)

NOS endotelial (e-NOS)

NOS neuronal (n-NOS)

Organização Mundial de Saúde (OMS)

Osteoartrose (AO)

Óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico sintase (NOS)

Oxigênio molecular (O₂)

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Peroxinitrito (ONOO⁻)

Potássio (K⁺)

Prostaciclina (PGI₂)

Prostaglandina (PGE₂)

Radical hidroxila (*OH)

Receptor alfa de estrogênio (ER α)

Receptor beta de estrogênio (ER β)

Receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER)

Síndrome do ovário policístico (SOP)

Sistema Nervoso Central (SNC)

Tecido adiposo perivascular (TAP)

Tetraetilamônio (TEA)

Tromboxano (TXA₂)

Xantina oxidase (XO)

Zinco (Zn)

RESUMO

A exposição ao cádmio tem sido associada à diversas doenças cardiovasculares. Estudos experimentais, desenvolvidos em machos, demonstram que esse metal induz importante disfunção vascular. Já em fêmeas, um estudo recente verificou que a exposição subcrônica ao CdCl₂ não modifica pressão arterial e a reatividade vascular à fenilefrina em aorta isolada. No entanto, efeitos induzidos pela exposição *in vitro* ao Cd em fêmeas não foram descritos até o momento. Portanto, objetivamos investigar os efeitos *in vitro* do cloreto de cádmio (ClCd₂, 5 µM) na reatividade vascular em aorta isolada de ratas Wistar. As ratas foram anestesiadas, eutanasiadas e a aorta torácica foi removida para avaliação da reatividade vascular. Anéis controle e anéis previamente incubados com 5µM de Cd foram submetidos à diferentes protocolos experimentais. Nossos resultados demonstram que a exposição *in vitro* ao ClCd₂ em baixa concentração foi capaz de danificar a arquitetura do endotélio vascular e reduzir a modulação anticonstrítil do tecido adiposo perivascular (TAP) sobre a reatividade vascular à fenilefrina. Na ausência do TAP, embora o Cd não tenha modificado a reatividade à fenilefrina, foi observado aumento da produção e da liberação basal de O₂⁻, redução da participação dos canais para K⁺, aumento da participação da via da Ang II e aumento da liberação de PGI₂ e/ou redução de prostanóides constritores. Além disso, foi possível observar que na presença de Cd, os receptores ERα modulam negativamente a reatividade vascular à fenilefrina. Em conjunto, esses resultados demonstram que a exposição *in vitro* ao Cd, promove importante disfunção vascular em aorta isolada associada a alteração de sua arquitetura e de vias vasoativas endoteliais, o que poderia contribuir para as vasculopatias associadas à exposição por esse metal.

Palavras-chave: cádmio, reatividade vascular, disfunção endotelial, wistar fêmeas.

ABSTRACT

Cadmium exposure has been linked to several cardiovascular diseases. Experimental studies, carried out in males, demonstrate that this metal induces important vascular dysfunction. In females, a recent study found that subchronic exposure to CdCl₂ does not modify blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in isolated aorta. However, effects induced by *in vitro* exposure to Cd in females have not been described so far. Therefore, we aimed to investigate the *in vitro* effects of cadmium chloride (CdCl₂, 5 μM) on vascular reactivity in isolated aorta of Wistar rats. The rats were anesthetized, euthanized and the thoracic aorta was removed to assess vascular reactivity. Control rings and rings previously incubated with 5μM of Cd were submitted to different experimental protocols. Our results demonstrate that *in vitro* exposure to CdCl₂ at low concentrations was able to damage the vascular endothelium architecture and reduce the anticontractile modulation of perivascular adipose tissue (PVAT) on vascular reactivity to phenylephrine. In the absence of PVAT, although Cd did not modify the reactivity to phenylephrine, an increase in the production and basal release of O₂^{•-}, a reduction in the participation of K⁺ channels, an increase in the participation of the Ang II pathway and an increase in the release of PGI₂ and/or reduction of constricting prostanoids. Furthermore, it was possible to observe that in the presence of Cd, ERα receptors negatively modulate vascular reactivity to phenylephrine. Taken together, these results demonstrate that *in vitro* exposure to Cd promotes important vascular dysfunction in isolated aorta associated with changes in its architecture and endothelial vasoactive pathways, which could contribute to vasculopathies associated with exposure to this metal.

Keywords: Cadmium, vascular reactivity, endothelial dysfunction, female wistar.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA E PROPRIEDADES DO CÁDMIO

No início do século XIX no Reino da Prússia, um médico chamado Johann Roloff, um dos responsáveis pelo controle de qualidade de produtos farmacêuticos, encontrou irregularidades em um lote de óxido de zinco. As análises preliminares do material, indicaram que as amostras continham arsênico, mas logo verificaram que na realidade, se tratava de um outro metal ainda não identificado (TARAKINA; VERBERCK, 2016).

Ainda em 1817, Friedrich Stromeyer, um professor da universidade de Göttingen no reino de Hanover, analisava que ao aquecer algumas amostras de carbonato de zinco, uma cor amarelada surgia. Após isso, outros pesquisadores publicaram relatórios sobre o novo elemento. Se tratava então, da descoberta de um novo metal, hoje conhecido como Cádmio (Cd) (TARAKINA; VERBERCK, 2016).

O Cd é um metal não essencial, sendo considerado tóxico para muitas plantas e animais. Na classificação periódica está localizado no grupo IIB e é um metal que possui como características: maleabilidade, ductilidade, resistência química e mecânica, além disso, possui coloração branco prateado (DUFFUS, 2002).

1.2 ROTAS DE EXPOSIÇÃO

O Cd é obtido principalmente como subproduto dos minérios de Zinco (Zn), Cobre (Cu) e Chumbo (Pb). As fontes naturais de contaminação de Cd nos solos, ar e água, ocorrem pela atividade vulcânica, pela erosão de rochas sedimentares e por incêndios florestais. Já as fontes antropogênicas de contaminação por Cd, incluem a contaminação do solo pela mineração e refino de metais não ferrosos, pela queima de combustíveis fósseis e de lixo eletrônico, e também da fabricação de fertilizantes fosfatados (FAROON O, ASHIZAWA A, WRIGHT S, 2012; JACOBSON; TURNER, 1980; SRIPADA; LAGER, 2022).

Em todo o mundo é estimado que cerca de 15.000 toneladas de Cd são produzidas por ano. Em relação a liberação de Cd do meio ambiente, cerca de 25.000 toneladas de Cd são liberadas anualmente, o que somado a produção industrial do metal, tornam o Cd um contaminante ambiental de alta relevância. O Cd é utilizado principalmente na produção de baterias de níquel-cádmio, em pigmentos, na produção de cloreto de polivinil (PVC) e é um contaminante de fertilizantes fosfatados (FATIMA et al., 2019; HENGSTLER et al., 2003).

O Cd é também comumente utilizado na fabricação de joias e brinquedos de baixo custo, fabricados em países de baixa e média renda, como a Nigéria e a China (ADIE et al., 2020; CUI et al., 2015). Devido a utilização do Cd na produção de baterias de níquel-cádmio por exemplo, sabe-se que o lixo eletrônico pode ser um potencial contaminante para o solo a depender da infraestrutura do gerenciamento do lixo eletrônico, que frequentemente acabam em aterros. A queima desse material ao ar livre é um potencial contaminante do solo devido a sua toxicidade, sendo o Cd então considerado um metal de alto risco ambiental (SRIPADA; LAGER, 2022).

As fontes antropogênicas são as principais fontes de contaminação da população ao Cd. As indústrias são as principais responsáveis pela contaminação da população ao seu entorno. Em 1910, no acidente ocorrido nas margens do rio Jintsu na região de FunchuMachi, no Japão, plantadores de arroz e pescadores foram acometidos por mialgias que acometiam principalmente a região lombar. Esses trabalhadores foram vítimas dos despejos industriais de jazida de zinco e chumbo denominada de Kamioka e da usina de processamento de chumbo e zinco, que atingiram o rio Jintsu. A doença, causada pelo Cd, ficou conhecida como Itai-Itai e tem como características: dores súbitas na região lombar e nas articulações. A doença de Itai-Itai inclui danos renais graves, osteomalácia, osteoporose, podendo levar a múltiplas fraturas ósseas (FRIBERG. L.; PISCATOR. M.; NORDBERG. M.B, 1974; SATARUG, 2018).

No Sudeste do Brasil, o rompimento da barragem de Fundão, fez com que cerca de 50 milhões de m³ de rejeitos de minério de ferro fossem despejados no Rio Doce, percorrendo cerca de 650 km até atingir o oceano atlântico. Dados apontam que os teores de Cd nos sedimentos avaliados aumentaram para níveis

acima dos limites permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (DUARTE et al., 2021).

Devido à alta toxicidade do Cd, a Norma Regulamentadora 7 (NR 7), criada com o objetivo de proteger e preservar a saúde de empregados em relação aos riscos ocupacionais, estabelece alguns parâmetros de controle da exposição ocupacional ao Cd. Segundo a NR 7, a dosagem de Cádmio na urina é indicador biológico e o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) é de 5 µg/g de creatinina (NR 7, 2022).

Os principais marcadores de exposição ao cádmio são as concentrações de cádmio na urina e no sangue total. A concentração de cádmio na urina de 24 horas é utilizada como marcador para a exposição crônica ao Cd. Já a concentração sanguínea de cádmio reflete exposição mais recente (aguda), decorrentes dos últimos meses (Handbook on the toxicology of metals, 1981).

O Cd, em sua forma iônica (Cd^{2+}) é considerado um elemento altamente tóxico ao ambiente, por ser um metal que possui altas taxas de transferência do solo para os vegetais, quando comparado a outros metais pesados tóxicos, como Pb e o mercúrio (Hg), o que torna a intoxicação ao Cd via cadeia alimentar uma preocupação de saúde pública (ATSDR, 2012; SATARUG, 2018). Quando se trata do ambiente aquático, os crustáceos, os caranguejos, os moluscos e as ostras são os seres mais acumuladores de Cd (SATARUG; VESEY; GOBE, 2017).

Sendo assim, a exposição populacional ao Cd ocorre principalmente por contaminação do solo e de fontes de alimentos. Os vegetais e as folhas de tabaco acumulam altos níveis de Cd do solo, sendo fontes de contaminação por ingestão de alimentos contaminados e pela inalação da fumaça do tabaco (ATSDR, 2012; HENGSTLER et al., 2003; SATARUG et al., 2003). Fumantes apresentam aproximadamente o triplo da concentração sanguínea de cádmio encontrada na população não-fumante, 1.58 µg/L para fumantes vs 0.47 µg/L para não-fumantes (ATSDR, 2012). O teor de cádmio quantificado em aortas de humanos aumenta em proporção direta aos anos/maço de cigarros fumados, com o acúmulo seletivo na camada média da aorta. Essa concentração de Cd

aumentada tem sido associada ao aumento do risco de hipertensão e doenças relacionadas (ABU-HAYYEH et al., 2001; AFRIDI et al., 2010).

Assim como o tabaco, espinafre e a alface romana (devido a características filogenéticas) acumulam Cd de forma mais eficiente que outras hortaliças. Sabe-se que grãos como o arroz e sementes de girassol, assim como diferentes tipos de batatas, são acumuladores de Cd do solo (SCOTT et al., 2019). Em 1989, a Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou como limite de segurança, a ingestão semanal tolerável de Cd para $7 \mu\text{g}/\text{semana}/\text{kg}$ de peso corporal, correspondendo a $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/dia, ou $70 \mu\text{g}/\text{dia}$ (SATARUG; MOORE, 2004; World Health Organization, 1992). Já em 2010, com base na meia vida longa do Cd, a OMS passa a considerar que um valor mensal para limite de ingestão seria mais adequado. Sendo assim, o nível de ingestão mensal tolerável para Cd foi alterado para $25 \mu\text{g}/\text{mês}/\text{kg}$ de peso corporal. Este nível de ingestão é equivalente a $0,83 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dia (WHO, 2010).

Devido a sua baixa taxa de excreção renal e sua meia vida biológica longa (décadas), o Cd pode sofrer bioacumulação em vários tecidos e com isso, ocasionar várias doenças (FRIBERG, LARS; KJELLSTROM, 1992). Estudos correlacionam a exposição crônica ao Cd com diversas disfunções, sendo elas principalmente acometendo o sistema cardiovascular, os rins, pulmões, fígado, ossos, o sistema reprodutivo, o sistema nervoso central e ao surgimento de câncer em diversos tecidos (Figura 1) (BRANCA et al., 2020; HENGSTLER et al., 2003; JACOBSON; TURNER, 1980; KUMAR; SHARMA, 2019; THOMPSON; BANNIGAN, 2008).

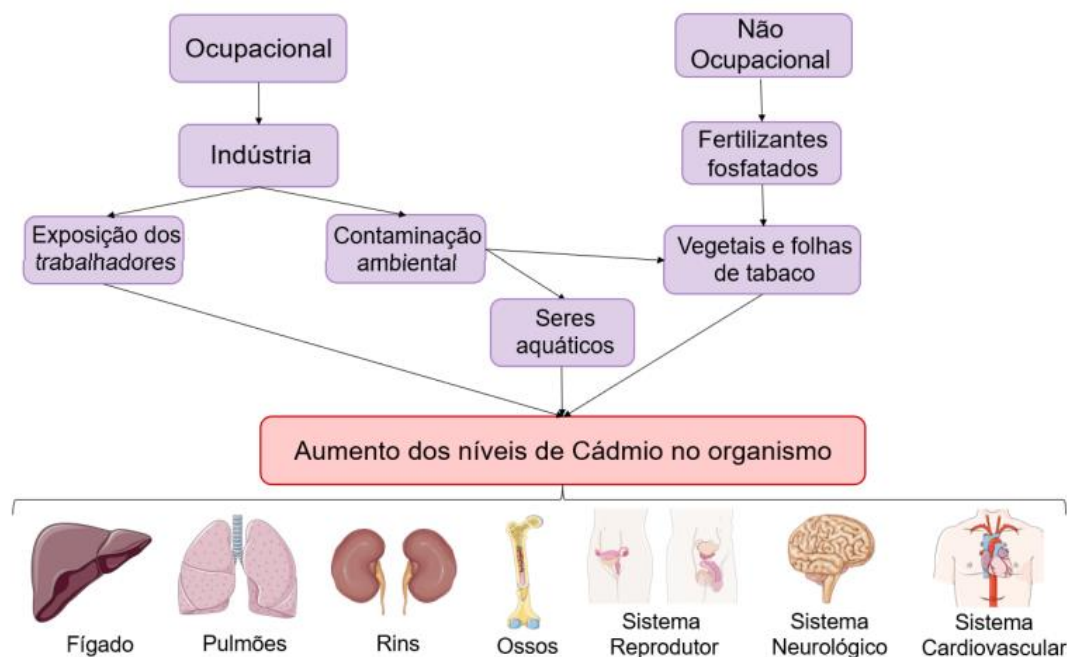


Figura 1: Principais rotas de exposição ao Cádmio e seus efeitos tóxicos nas diferentes partes do corpo (ROSSI, 2022)

1.3 MECANISMOS DE ABSORÇÃO E TRANSPORTE DE CÁDMIO

Em humanos, as principais vias de exposição ao cádmio são a via respiratória e em menor proporção, o trato gastrointestinal. O sistema respiratório é considerado uma via de alta taxa de absorção (25-50% do total de Cd inalado), quando comparada a absorção pelo trato gastrointestinal (5% da ingestão total de Cd) (FRIBERG, LARS; KJELLSTROM, 1992).

Após absorvido, o Cd se liga à metalotioneína (MT), uma proteína de baixo peso molecular, rica em cisteína, com grande afinidade por metais, formando o complexo MT-Cd²⁺. Esse complexo funciona como um quelante do metal, impedindo seus efeitos deletérios sobre as células (KLAASSEN; LIU; DIWAN, 2009; NORDBERG, 2004). No entanto, quando o complexo MT-Cd²⁺ chega aos rins, é filtrado e reabsorvido pelas células dos túbulos contorcidos proximais, onde essa ligação é quebrada, liberando o cádmio bivalente para a circulação. A quantidade aumentada de Cd livre na circulação passa a ser a causa seus efeitos deletérios sobre diversos tecidos (FRIBERG et al., 1985).

O Cd livre na circulação pode afetar imediatamente as funções celulares. Na toxicidade aguda ao Cd, o fígado é o órgão alvo primário, já em casos de toxicidade crônica, os rins são os órgãos mais acometidos pelo Cd, pois são órgãos capazes de conter até 50% da carga corporal total desse metal (Handbook on the toxicology of metals, 1981; SABOLIĆ et al., 2010).

1.4 AÇÕES DO CÁDMIO SOBRE OS DIVERSOS SISTEMAS

Estudos correlacionam a exposição crônica ao Cd com diversas disfunções, sendo elas principalmente nos rins, pulmão, fígado, ossos e ao surgimento de câncer em diversos tecidos (HENGSTLER et al., 2003; JACOBSON; TURNER, 1980).

O Cd é um metal de potencial nefrotoxicidade. Sabe-se que exposições crônicas ao metal e sua deposição nos rins, levam a disfunção dos mecanismos de filtração glomerular. Podem levar a disfunção tubular proximal, caracterizada por poliúria, glicosúria e proteinúria (BERNARD, 2004; SATARUG; MOORE, 2004).

Devido a sua meia vida biológica longa, o Cd também pode se depositar no fígado. Estudos em modelos animais relatam que a exposição ao Cd pode levar a lesões hepáticas, agudas e crônicas. O nível sérico de Cd também foi associado a fibrose e a esteatose hepática (HAN, S. et al., 2022; YAMANO; DECICCO; RIKANS, 2000).

Como citado anteriormente, após a doença de Itai-itai, onde o arroz contaminado por Cd foi ingerido pelos agricultores locais, os agricultores locais apresentaram osteoporose, osteomalácia e conseqüentemente, um aumento no risco de fraturas. Ao nível ósseo, o Cd afeta a densidade mineral óssea que associado a depleção de cálcio (Ca^{+2}) ósseo e de vitamina D ativada pelos rins, favorece o processo de reabsorção óssea. A inflamação causada pelo Cd também está correlacionada com o desenvolvimento de Osteoartrose (AO), por desencadear estresse oxidativo e a inflamação, favorecendo a descontinuidade da cartilagem articular (FATIMA et al., 2019; FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2022; FRIBERG. L.; PISCATOR. M.; NORDBERG. M.B, 1974). Já é sabido que o Cd

pode alterar a homeostase intracelular do Ca^{+2} , pois um dos mecanismos de captação do Cd é via canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC), sendo um metal capaz de competir com a entrada de Cálcio nesses canais (BLAZKA; SHAIKH, 1991).

A exposição ao Cd também pode induzir a lesão das células do Sistema Nervoso Central (SNC). O metal é capaz de aumentar a permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE), facilitando a sua entrada e desencadeando uma cascata pró-inflamatória nas células neuronais, podendo levar a danos celulares irreversíveis. A exposição ao metal está relacionada ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a Esclerose Múltipla (EM), a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e a doença de Parkinson (BRANCA et al., 2020).

Em mulheres, a exposição do Cd pode afetar o ciclo menstrual, atraso na puberdade e na menarca, o equilíbrio hormonal e afetar a gestação (HENSON, MICHAEL C; CHEDRESE, 2004). Estudo realizado em ratas Wistar expostas de forma subaguda a 100 ppm de Cd através da água de beber, verificaram que o metal foi capaz de causar alterações no eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG), levando à Síndrome do ovário policístico (SOP) e a falência ovariana (DA COSTA et al., 2021). O Cd também é capaz de promover a proliferação aumentada de células cancerosas de mama dependentes de estrogênio, dano ao DNA e aumento do peso uterino devido a proliferação do endométrio (GAUDET et al., 2018; SIEWIT et al., 2010; ZANG; ODWIN-DACOSTA; YAGER, 2009). Além disso, a exposição ao metal durante a gestação está associada ao parto prematuro e ao baixo peso ao nascer (FRÉRY et al., 1993; SHIVERICK; SALAFIA, 1999). Quanto ao sistema reprodutor masculino, a exposição ao Cd mesmo em baixas doses, pode afetar a qualidade do sêmen, a motilidade espermática e prejudicar a espermatogênese. (HENSON, MICHAEL C; CHEDRESE, 2004; KUMAR; SHARMA, 2019; THOMPSON; BANNIGAN, 2008).

1.5 AÇÕES DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Diversos trabalhos tem associado exposição ao Cd e doenças cardiovasculares. No sistema cardiovascular, o principal alvo do Cd parece ser

o endotélio. De fato, diversos estudos experimentais realizados em machos, evidenciaram importante disfunção vascular após exposição aguda e crônica ao metal (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013; OLIVEIRA, T. F. et al., 2022; DONPUNHA et al., 2011; OLIVEIRA, T. F. et al., 2019; SOMPAMIT et al., 2010; TZOTZES et al., 2007). Outro estudo anterior realizado em machos, demonstrou que a exposição *in vitro* de cloreto de cádmio (10 μ M) em anéis aórticos isolados aumentou a resposta máxima à fenilefrina através de efeitos deletérios sobre o endotélio vascular (ANGELI et al., 2013). É importante ressaltar que Angeli e colaboradores, utilizaram a concentração de 10 μ M baseados no estudo de Abu-Hayyeh e colaboradores, que encontraram aproximadamente 7 μ M de Cd na camada média da aorta de fumantes (ABU-HAYYEH et al., 2001).

O endotélio vascular é formado por um conjunto de células localizadas na camada íntima dos vasos, que participam ativa e reativamente da homeostasia e das reações inflamatórias (CARVALHO et al., 2001; GALLEY; WEBSTER, 2004). Em condições fisiológicas, a principal função do endotélio é a regulação do tônus vascular, que se dá pelo equilíbrio da liberação de fatores vasorrelaxantes e vasoconstrictores. Dentre as substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio podemos citar óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Já a endotelina, as espécies reativas de oxigênio (EROs), o tromboxano, a angiotensina II (Ang II) e os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) são as substâncias derivadas do endotélio, que promovem a vasoconstrição (CARVALHO et al., 2001; GALLEY; WEBSTER, 2004; SANDOO et al., 2015; VANHOUTTE, 2009). A disfunção endotelial se dá pelo desequilíbrio da produção e da liberação dessas substâncias pelo endotélio (VANHOUTTE, 2009).

O NO é um importante regulador homeostático da vasculatura. Sua biodisponibilidade está associada à redução na sua produção ou a sua maior degradação (MONCADA; HIGGS, 2006). As enzimas responsáveis pela produção de NO a partir da L-arginina no organismo são as Óxido Nítrico Sintases (NOSs) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; NATHAN; XIE, 1994). São descritas pela literatura três isoformas da NOS e estas são agrupadas em duas categorias: NOS constitutiva (c-NOS) e a NOS induzível (i-NOS). Há dois tipos de c-NOS, a NOS endotelial (e-NOS) e a NOS neuronal (n-NOS) sendo ativadas

em condições saudáveis (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; MARLETTA, 1994; MONCADA; HIGGS, 2006; XIA; M. VANHOUTTE, 2011). Já a i-NOS, é induzida por estímulos inflamatórios (DIPAK K. GHOSH; J.C. SALERNO, 2003).

Um dos mecanismos envolvidos na toxicidade do Cd em machos sobre o endotélio vascular estão relacionados a redução da biodisponibilidade de NO (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA, T. F. et al., 2019; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2022) e a redução da expressão da eNOS e do seu estado de fosforilação (KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014; MAJUMDER et al., 2008; YOOPAN et al., 2008). Além do redução do NO, na disfunção vascular induzida pela exposição ao Cd em modelos experimentais em machos observa-se aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA, T. F. et al., 2019; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2022), aumento da liberação de Ang II tecidual e de prostanoídes COX (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013; ANGELI et al., 2013) e diminuição da atividade da Na⁺/K⁺ ATPase (VASSALLO et al., 2018).

As EROs são átomos ou moléculas reativas que possuem número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Em condições normais, baixos níveis de EROs estão presentes nas células e desempenham funções na ativação de vias de sinalização celular (LASSEGUE; SAN MARTIN; GRIENGLING, KATHY K, 2012; PARAVICINI; TOUYZ, 2008; VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006). Normalmente o equilíbrio entre a liberação das EROs e sua degradação pelo sistema antioxidante são suficientes para a manutenção do equilíbrio oxidativo. As principais defesas enzimáticas envolvidas nesse processo são a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (HE et al., 2017). O estresse oxidativo se dá pelo desequilíbrio entre a formação de EROs e a sua eliminação por esses sistemas (KUNSCH; MEDFORD, 1999). As EROs incluem moléculas e radicais livres derivados do oxigênio molecular (O₂). O O₂⁻, é o precursor da maioria das EROs, como o H₂O₂, que ao reagir com o NO podem formar o radical hidroxila ([•]OH). A interação do O₂⁻ com o NO provoca a formação de peroxinitrito (ONOO⁻), que promove degradação oxidativa do cofator BH₄ (tetrahydrobiopterina) da NOS tornando-a desacoplada, o que induz a produção de mais espécies reativas de oxigênio (EROs) (APEL; HIRT, 2004; MILSTIEN; KATUSIC, 1999).

No que tange ao sistema vascular, ainda dentro do contexto do estresse oxidativo, já é sabido que a angiotensina II local desempenha um importante papel no tônus do músculo liso vascular, não só pela via vasoconstritora direta, mas também por meio da produção de EROs devido ao aumento da atividade e/ou expressão de NADPH oxidase (NGUYEN DINH CAT et al., 2013). A Ang II também possui ações mitogênicas, pró-inflamatórias e pró-fibróticas. Esses efeitos são provocados vias de sinalização que envolvem EROs, particularmente o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 . Em um cenário de estresse oxidativo, a sinalização da Ang II é alterada, levando a um ciclo vicioso de disfunção endotelial e inflamação (HORIUCHI; MOGI; IWAI, 2010; MEHTA; GRIENGLING, 2007). Além do estresse oxidativo, a angiotensina-II também regula as respostas inflamatórias que contribuem para a lesão arterial e afetam a função vasomotora (LOPES et al., 2022). A Ang II regula a expressão de COX-2 e a produção de prostaglandinas em células do músculo liso vascular (CMLV) de ratos. A ativação de COX-2 induzida por Ang II pode desempenhar um papel significativo na mediação do crescimento celular e na proliferação dessas células (HU et al., 2002; OHNAKA et al., 2000). Estudos tem associado exposição ao cádmio a alterações no sistema renina angiotensina aldosterona local (ANGELI et al., 2013; BROSEGHINI-FILHO et al., 2015). Um estudo anterior demonstrou que a exposição aguda ao Cd (0.32 mg/kg^{-1} i.v., em um volume de $5 \mu\text{L}/100\text{g}$ de peso) exerce efeitos inibitórios (dependentes da concentração) na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) na aorta, no pulmão e no plasma de ratos Wistar machos. Esses efeitos parecem ser parcialmente revertidos por suplementações com zinco (BROSEGHINI-FILHO et al., 2015).

Quanto aos prostanoides, são eicosanoides derivados da catalização da via COX pela conversão do ácido araquidônico, conhecidos por se tratarem de importantes mediadores da resposta inflamatória. A produção endotelial de prostanoides contribui para a manutenção do tônus vascular (PECANHA et al., 2010; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). A COX possui duas isoformas: COX-1 (isoforma constitutiva e expressada em condições basais) e a COX-2 (isoforma induzida relacionada principalmente aos processos inflamatórios) (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). A ativação da via da COX resulta do equilíbrio na produção de prostanóides vasoconstritores e vasodilatadores através do

metabolismo do ácido araquidônico. As substâncias mais comuns são a prostaglandina (PGE_2) e o tromboxano (TXA_2), substâncias que levam ao aumento da expressão da NADPH oxidase e a PGI_2 que se opondo as substâncias anteriores, leva a redução da expressão da NADPH oxidase, reduzindo a produção de EROs (ALVAREZ et al., 2005; DAVIDGE, 2001). A via da COX apresentou-se comprometida em aorta de machos após exposição ao Cádmiio *in vitro* (ANGELI et al., 2013), assim como em artérias de resistência (EUDES et al., 2020), resultando em uma maior participação dos prostanoides constrictores derivados da COX.

O Cd também é capaz de levar a disfunção vascular, por alterar a estrutura e a função dos vasos promovendo a formação de lacunas entre as células endoteliais, contribuindo para a ocorrência das vasculopatias. Ao atingir o músculo liso vascular (MLV), a exposição ao Cd promove remodelamento vascular, enrijecimento arterial, podendo também levar a reorganização da matriz extracelular, através da síntese e degradação de proteínas (PROZIALECK; EDWARDS; WOODS, 2006; SANGARTIT et al., 2014). Tais alterações podem ocasionar injúria vascular e predispor a formação de aterosclerose.

Em um estudo realizado em camundongos ApoE $-/-$, onde os animais foram expostos de forma crônica ao cádmio através da água de beber (100 mg/L), demonstraram que o aumento do estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO após a exposição ao cádmio está intimamente associado a aterosclerose (OLIVEIRA, T. F. et al., 2019). Já se sabe que os mecanismos envolvidos com a formação da placa aterosclerose após exposição do Cd podem envolver inflamação, disfunção endotelial, estresse oxidativo, síntese aumentada de lipídios, regulação positiva de moléculas de adesão e desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasorrelaxantes (KNOFLACH et al., 2011; TINKOV et al., 2018).

Tanto os achados do estudo *in vitro*, quanto da exposição crônica ao cádmio supracitados, foram encontrados em ratos ou camundongos machos. Um estudo do nosso grupo observou, no entanto, que a exposição subcrônica ao cádmio não modifica a pressão arterial em ratas. Além disso, não se observou alterações de reatividade vascular à fenilefrina em aorta isolada (OLIVEIRA, T.

F. et al., 2022). Embora não se tenha observado alterações na reatividade vascular de ratas expostas subcronicamente ao Cd, efeitos agudos induzidos pelo metal não foram descritos em fêmeas até o momento. Ademais, é descrito que o cádmio pode atuar como um metaloestrógeno.

1.6 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E FUNÇÃO VASCULAR

As doenças cardiovasculares (DCV) ainda têm sido uma das principais causas de morte em ambos os sexos, e já existem estudos que apontam que mulheres na pré-menopausa estão mais protegidas de doenças cardiovasculares do que os homens da mesma idade. Tal proteção se deve ao efeito cardioprotetor do estrogênio no sistema cardiovascular, dentre eles: produção de NO endotelial, redução do estresse oxidativo, redução da produção de citocinas pró-inflamatórias miocárdicas, melhora da função mitocondrial, atenuação da hipertrofia cardíaca e estimulação da angiogênese (ARYAN et al., 2020; KIM; YOUNG; BENDER, 2014; PÉREZ-CREMADES et al., 2018).

O 17beta-estradiol (E_2) é o principal hormônio feminino e é a forma mais comum de estrogênio circulante. Estudos demonstraram que os níveis de E_2 circulantes são inversamente proporcionais ao número de eventos cardiovasculares em mulheres na pós menopausa (ARYAN et al., 2020).

A modulação vascular ocorre por ação do estrogênio em seus receptores, exercendo seus efeitos por meio de ações genômicas e não genômicas. O E_2 se liga aos receptores clássicos de estrogênio: receptor alfa de estrogênio ($ER\alpha$) e receptor beta de estrogênio ($ER\beta$) no citosol, que estão ligados aos efeitos de transcrição de longo prazo. Tais receptores são distribuídos amplamente pelo sistema cardiovascular, sendo expressos no endotélio, CMLV e na camada adventícia dos vasos sanguíneos (BOLEGO et al., 2006; ROSS; SEROCK; KHALIL, 2008). O E_2 também se liga ao receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) no retículo endoplasmático e na membrana plasmática, que medeia os efeitos agudos do estrogênio.

Tradicionalmente, E_2 é conhecido por exercer seus efeitos cardioprotetores ligando-se aos receptores nucleares $ER\alpha$ e $ER\beta$ (ARYAN et al.,

2020; LINDSEY et al., 2013). Tal proteção, é atribuída principalmente pelas ações diretas do E₂ sobre os vasos sanguíneos, estimulando a liberação de substâncias vasoativas, regulação dos canais iônicos nas CMLV e por seu efeito antiproliferativo (HAN, G. et al., 2007; MENDELSON; KARAS, 2005; ODENLUND; EKBLAD; NILSSON, 2008). Já se sabe que o E₂ previne disfunção endotelial pelo aumento da expressão de enzimas antioxidantes e pelo aumento da biodisponibilidade de NO, o que leva a uma redução na liberação de EROS (MEYER; HAAS; BARTON, 2006; STREHLOW et al., 2003). O E₂ também age no leito vascular estimulando a síntese de substâncias vasodilatadoras, como a PGI₂ e diminuindo a síntese de Ang II (TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2003; WANG et al., 2013). Além disso, exerce efeito benéfico sobre a função endotelial por estimular hiperpolarização derivada do endotélio (HDE) (HAYNES et al., 2000).

1.7 O CÁDMIO COMO LIGANTE DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO

Alguns metais pesados, como o Cd e o Níquel (Ni) podem se ligar aos receptores de estrogênio e agir como desreguladores endócrinos. Os xenoestrógenos ou metaestrógenos, como são conhecidos, são então pequenos metais iônicos que ativam os receptores de estrogênio na ausência de estrogênio. Esses metais podem ser encontrados em pesticidas, fumaça de cigarro, em plantas e em pílulas anticoncepcionais (AQUINO et al., 2012; BYRNE et al., 2013; GAUDET et al., 2018).

Os xenoestrógenos podem ser classificados em duas categorias: oxiânions e cátions bivalentes. Os oxiânions incluem o nitrito, o arsenito, o selenito, enquanto os cátions bivalentes incluem o cádmio, o cobre, o níquel, o chumbo e o mercúrio (GAUDET et al., 2018).

Os estudos sobre a ação metaloestrógena do Cd são ambíguos. Alguns deles indicam atividade estrogênica (BRAMA et al., 2007; JOHNSON et al., 2003; STOICA; KATZENELLENBOGEN; MARTIN, 2000), outros que tal atividade seria dose e/ou tempo-dependente (DENIER et al., 2009; NASIADEK et al., 2019), já outros estudos demonstram uma atividade antiestrogênica (DIPAK K. GHOSH AND J.C. SALERNO, 2003; HÖFER et al., 2009). Estudos demonstram que o Cd

pode ativar os ER α por meio de interações de alta afinidade com o domínio de ligação do receptor ao hormônio, podendo mudar a conformação do receptor (FECHNER; DAMDIMOPOULOU; GAUGLITZ, 2011; STOICA; KATZENELLENBOGEN; MARTIN, 2000).

1.8 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos encontraram alterações importantes na função vascular de ratos machos expostos ao CICd2 tanto de forma aguda (10 μ M), como de forma subcrônica através da água de beber (100 mg/L) (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA, T. F. et al., 2019). No entanto, estudo realizado por nosso grupo em ratas Wistar, verificou que a exposição subcrônica ao Cd não modifica pressão arterial; além disso, não se observaram alterações de reatividade vascular à fenilefrina em aorta isolada (OLIVEIRA, T. F. et al., 2022).

Embora não se tenha observado alterações na reatividade vascular de ratas expostas subcronicamente ao Cd, efeitos agudos induzidos pelo metal não foram descritos até o momento. Ademais, sabe-se que esse metal pode atuar como um metaloestrógeno, o que poderia, em exposições *in vitro*, modificar a função vascular (BRAMA et al., 2007; GAUDET et al., 2018; JOHNSON et al., 2003; NASIADEK et al., 2019). Portanto, a hipótese desse estudo é que baixa concentração de Cd (5 μ M), próximo aquela encontrada na camada média de indivíduos fumantes (ABU-HAYYEH et al., 2001), pode causar disfunção vascular em aorta isolada de ratas. Sendo assim, para verificar nossa hipótese, anéis aórticos de ratas Wistar foram expostos ao CICd2 *in vitro* (5 μ M) e a reatividade vascular foi avaliada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição *in vitro* ao ClCd₂ 5 µM, na reatividade vascular em aorta isolada de ratas Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a exposição *in vitro* ao cádmio afeta o relaxamento dependente e independente do endotélio em ratas;
- Verificar as possíveis vias de agentes vasoativos afetadas pela exposição *in vitro* ao cádmio, em especial do NO, Ang II, de EROs, dos prostanoídes derivados da COX e do ER α na reatividade vascular em segmentos de aorta isolados de ratas;
- Determinar o efeito da exposição *in vitro* ao cádmio sobre a ação do tecido adiposo perivascular (TAP) e do endotélio na modulação das respostas contráteis de aorta de ratas;
- Avaliar se a incubação com baixa concentração de cádmio altera a produção “*in situ*” de ânion superóxido e de NO;
- Verificar se a incubação com baixa concentração de cádmio altera a arquitetura da superfície endotelial da aorta de ratas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade aproximada de 12 semanas (200-300 g). Esses animais foram fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Tais animais foram mantidos em gaiolas (três indivíduos por gaiola) sob condições controladas de temperatura 23°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água potável e à ração padrão para roedores. O manejo dos animais foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES - CEUA 10/2020).

O estudo foi desenvolvido em ratas e os anéis de aorta isolada foram definidos em: controle (Ct) e cádmio (Cd). Os animais foram anestesiados com ketamina (50mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) administrada por via intraperitoneal e eutanasiados. As artérias aorta foram então coletadas para avaliação da reatividade vascular e amostras de tecido foram armazenadas para posteriores análises histoquímicas.

3.2 OBTENÇÃO DA AORTA

As ratas foram anestesiadas, e em seguida, eutanasiadas. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em solução de Krebs modificada, composta por (mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, em uma placa de Petri. Esta solução foi mantida a pH 7,4. Após a coleta do anel aórtico com TAP, o tecido conectivo e adiposo foi removido. A aorta torácica foi então dividida em mais cinco segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento (Figura 2). Alguns anéis tiveram seu endotélio removido mecanicamente através da fricção do lúmen com uma haste metálica.

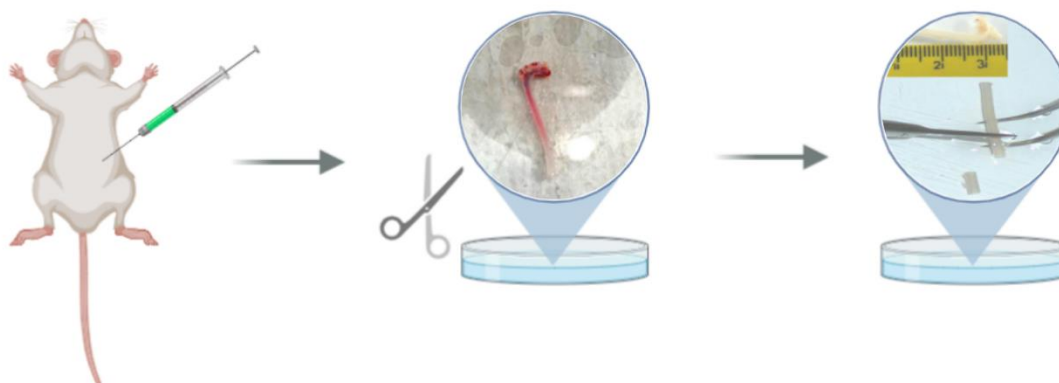


Figura 2: Esquema ilustrativo do processo de obtenção da aorta torácica de rato e montagem dos anéis isolados para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Modificado de (NASCIMENTO, 2022)

Cada anel foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 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 do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era 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 3). A tensão dos anéis era ajustada para 1g após as lavagens com a solução de Krebs modificada.

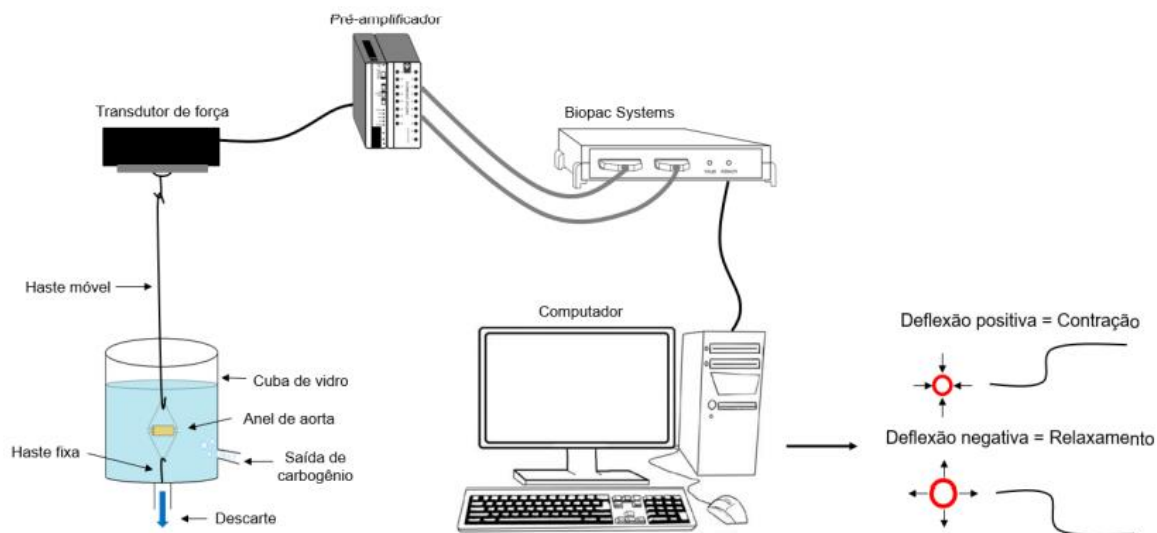


Figura 3: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems (ROSSI, 2022)

3.2.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular

Após montagem e a estabilização da tensão das artérias, os anéis foram incubados com 75 mM de KCl até que sua tensão fosse dobrada. Após a lavagem dos anéis e sua estabilização, foi avaliada a capacidade contrátil dos segmentos de aorta através de uma segunda incubação com solução de Cloreto de Potássio 75 mM (KCl), para obtenção da contração máxima exercida pelo anel (Figura 4).

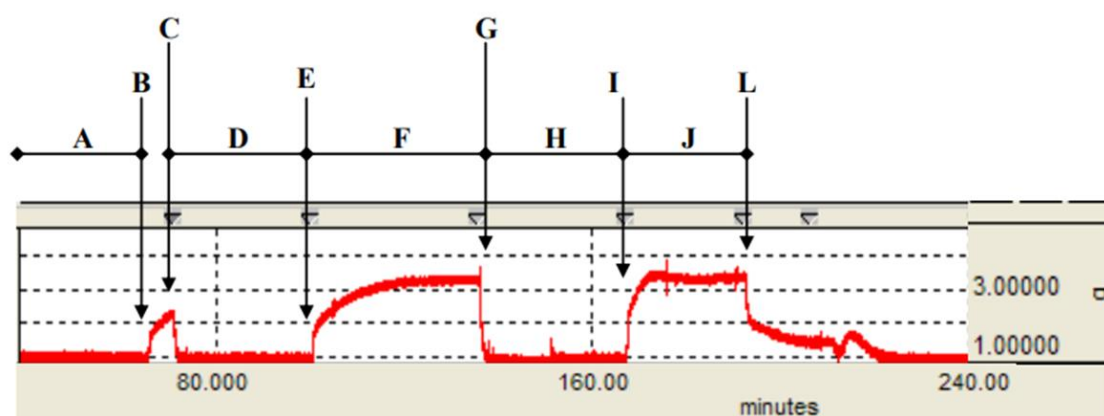


Figura 4: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de

1g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Précontração com fenilefrina (Fe) 10^{-4} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-3} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (MOURA et al., 2011).

3.2.2 Avaliação do endotélio vascular

Após a lavagem e estabilização, foi testada a integridade funcional do endotélio, com a avaliação da vasodilatação em resposta à Acetilcolina $10 \mu\text{M}$ (ACh) após contração com Fenilefrina 100 nM (Fe). A integridade funcional do endotélio foi considerada apenas nos anéis onde a ACh foi capaz de induzir relaxamento igual ou superior a 85% de relaxamento à Fe. Em alguns anéis, o endotélio foi removido mecanicamente e foi considerado hábil para realização dos protocolos experimentais àqueles que não relaxaram, ou relaxaram no máximo 10% à $10 \mu\text{M}$ de ACh, após pré-contração com 100 nM de Fe.

3.2.3 Protocolos experimentais

Após a realização do teste de integridade do endotélio os anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit para que retornassem à tensão basal. Posteriormente, esses anéis foram submetidos aos diferentes protocolos experimentais, objetivando o estudo dos efeitos à exposição *in vitro* ao cádmio ($5 \mu\text{M}$) na reatividade vascular.

Após o período de lavagem e estabilização, os segmentos foram expostos aos fármacos: L-NAME $100 \mu\text{M}$ (inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase – NOS), Enalapril $10 \mu\text{M}$ (inibidor da enzima conversora da angiotensina – ECA), Indometacina $10 \mu\text{M}$ (inibidor não específico da ciclooxigenase – COX), SOD 150 U.MI^{-1} (“scavenger” do ânion superóxido – $\text{O}_2^{\cdot -}$), Catalase 1000 U/ml (“scavenger” do peróxido de hidrogênio – H_2O_2), Apocinina $30 \mu\text{M}$ (inibidor da NADPH oxidase), Tetraetilamônio (TEA) 1 mM (inibidor não específico dos canais para potássio ativados por cálcio – KCa), Fulvestrant $1 \mu\text{M}$ (degradador do receptor α de estrogênio) e Azul de metileno (AM) $10 \mu\text{M}$ (inibidor da guanilato ciclase solúvel – GCs). Um anel com endotélio e um sem endotélio não foram

incubados com qualquer droga, de modo a servir de referência de resposta para cada um dos grupos experimentais. Após a incubação, foi realizada a curva concentração-resposta à Fe (10^{-10} a 10^{-4} M) na presença ou ausência do Cd. O tempo de incubação/exposição para este metal foi 45 minutos antes do início da curva de concentração-resposta (Figura 5). Também foram avaliadas as respostas vasodilatadoras dependente de endotélio através de curvas concentração-resposta à Ach (10^{-11} a 10^{-5} M) e independente do endotélio através do Nitroprussiato de sódio (NPS) (10^{-11} a 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica pré-contraídas com Fe.

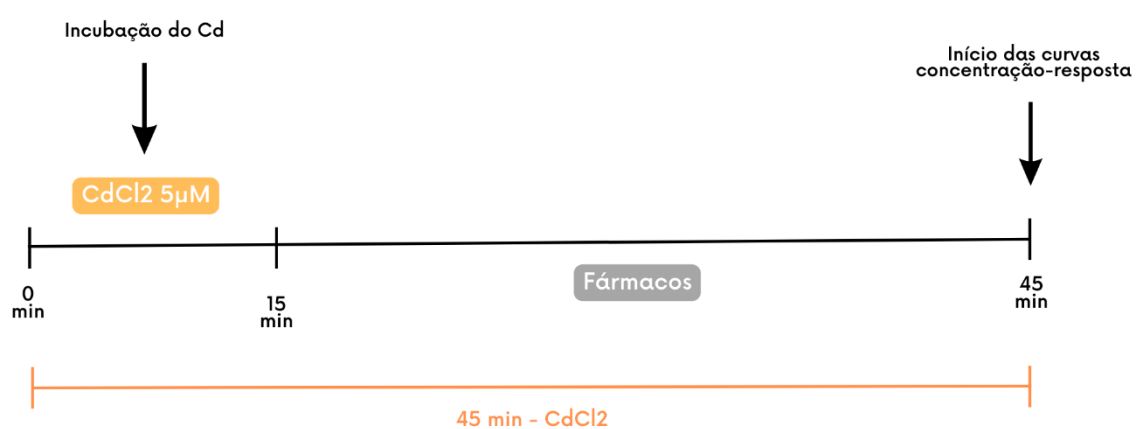


Figura 5: Esquema representativo da ordem e tempo de exposição ao cloreto de cádmio (CdCl₂) e aos fármacos. Fonte própria a partir do servidor Canva.

3.2.4 Quantificação “in situ” de óxido nítrico

Para a detecção de óxido nítrico “in situ” foi utilizado 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), através de método descrito previamente por Lobato e colaboradores (LOBATO et al., 2011). Após dissecação as aortas foram imersas em solução tampão de Krebs-HEPES com 30% de sacarose durante uma hora e a seguir foram embebidas em meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek - OCT (Bayer) e mantidas à -80°C até o momento da realização dos cortes com criostato (Killik®, Easy Path). Os segmentos de aorta foram cortados com $10\ \mu\text{m}$ de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas. Os cortes nas lâminas foram incubados com tampão fosfato (0,1M) contendo CaCl_2 (0,45M) e mantidos em

estufa a 37°C por 30 minutos para retirar o meio de inclusão (Tissue-Tek®, Compound, Sakura – OCT), após secagem foram incubadas em câmara escura, lâminas do grupos Controle: DAF (8µM) e Controle: DAF+L-NAME (100µM), Cádmio: DAF (8µM) e Cádmio: DAF+LNAME (100µM) a 37°C por 30 min com a finalidade de avaliar a fluorescência do NO e a inibição da síntese de óxido nítrico. As imagens foram coletadas no microscópio de fluorescência invertido Leica DM 2500, usando filtro 568nm e com câmera Leica DFC 310 FX, usando configurações iguais de imagem tanto para o grupo Ct quanto para o grupo Cd. Para quantificação, quatro imagens de segmentos de aorta por animal foram utilizadas para obter a média amostral. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software Metamorph.

3.2.5 Quantificação de ânion superóxido “in situ”

A produção “in situ” de $O_2^{\cdot-}$ foi avaliada pela fluorescência por dihidroetídeo (DHE, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), como previamente descrito por Nunes e colaboradores (NUNES et al., 2014). Segmentos de aorta foram submersos em solução de Krebs-HEPES com sacarose 30% por uma hora e congeladas em meio de inclusão (OCT) a -80°C. Estas artérias congeladas foram cortadas em criostato com espessura de 10 µm e os anéis colocados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram incubadas por 30 minutos em solução de Krebs-HEPES a 37°C e após período de secagem, incubadas em câmara escura por 30 minutos com os seguintes fármacos: grupo Controle: DHE (2µM) e Controle: DHE+Tiron (1mM), Cádmio: DHE (2µM) e Cádmio: DHE+Tiron (1mM), aplicado as soluções diretamente sobre os anéis. As imagens foram detectadas utilizando microscópio de fluorescência invertido Leica DM 2500 com câmera Leica DFC 310X. As configurações de análise foram às mesmas tanto no grupo Ct quanto no grupo exposto ao Cd. A média da densidade das fluorescências foi calculada a partir de quatro imagens de segmentos de aorta de cada animal, utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Aortas dos diferentes grupos experimentais, Ct e Cd, foram coletadas, cortadas para expor a superfície endotelial e fixadas em solução de 39 Karnovsky (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 2% e tampão de cacodilato a 0,1 M). Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio e desidratadas com etanol em diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Após período de desidratação foram submetidas ao procedimento de secagem em ponto crítico e uma camada de ouro de 10nm foi evaporada na superfície do tecido conforme descrito por estudo de Friques e colaboradores (FRIQUES et al., 2015). As micrografias eletrônicas dos dois grupos foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JEM6610 LV, Inc. EUA) com ampliação de 1000x.

3.3 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados e aplicação das análises estatísticas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel (Redmond, Washington, EUA) e GraphPad Prism Software 8.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para normalizar as forças obtidas de cada preparação, as respostas vasoconstritoras induzidas pela Fe foram expressas como uma porcentagem da contração induzida pelo KCl 75 mM. A resposta vasodilatadora foi expressa como uma porcentagem da contração prévia de fenilefrina. O número de animais utilizados em cada experimento encontra-se entre parênteses nos gráficos.

As curvas concentração-resposta foram analisadas através de ANOVA duas vias e quando detectada significância estatística era realizado pós-teste de Bonferroni. Com o objetivo de comparar o efeito da remoção do endotélio ou de alguns fármacos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina dos grupos estudados, os resultados foram expressos como porcentagem da diferença da área abaixo da curva (dAUC) nas situações controle (sem fármaco) e nas situações experimentais (remoção do endotélio ou na presença de fármacos).

Para a avaliação da intensidade de fluorescência de óxido nítrico e ânion superóxido foi utilizado ANOVA uma via e para as demais análises foi utilizado Teste t de Student não pareado para comparação de duas médias. As diferenças foram consideradas significativamente estatísticas quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 REATIVIDADE VASCULAR

4.1.1 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente (ACh) do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica

Foi avaliado se a exposição *in vitro* ao Cd poderia alterar o relaxamento dependente do endotélio, por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina (10^{-12} a 10^{-4} M) em segmentos de aorta de ratas. A ACh promoveu relaxamento dos anéis de aorta de maneira semelhante em ambos os grupos como indicado na Figura 6. O Cd não foi capaz de alterar essa resposta.

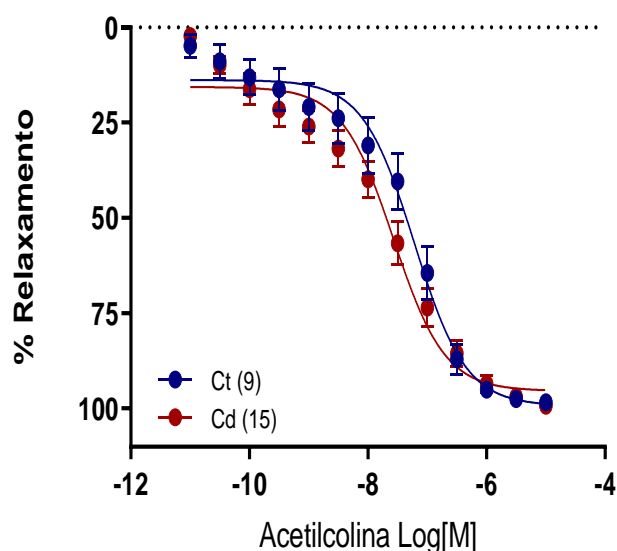


Figura 6: Resposta dilatadora induzida pela ACh em segmentos de aorta de ratas dos grupos Ct e Cd. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à Fe. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) $P > 0,05$.

4.1.2 Avaliação da resposta vasodilatadora independente (NPS) do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica

Para verificar se a exposição *in vitro* ao Cd poderia alterar o relaxamento independente do endotélio em segmentos de aorta de ratas, o endotélio de

alguns anéis aórticos foi removido e a avaliação do relaxamento ao nitroprussiato de sódio (NPS - 10^{-12} a 10^{-4} M), um doador de NO, foi realizada.

Anéis de aorta que tiveram seu endotélio removido mecanicamente foram pré-contraídos com Fe. A adição de NPS induziu o relaxamento dos anéis isolados de aorta em ambos os grupos. Entretanto, a curva de relaxamento ao NPS do grupo Cd se mostra deslocada para a esquerda, sugerindo maior sensibilidade ao NPS no grupo Cd (Figura 7).

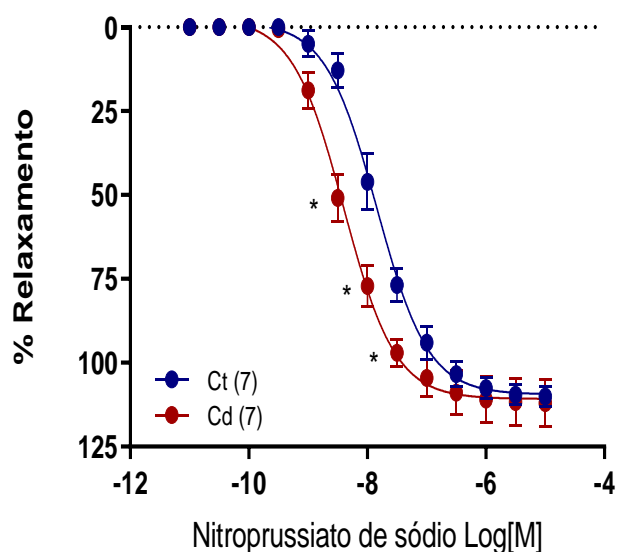


Figura 7: Resposta dilatadora induzida pelo NPS em segmentos de aorta de ratos dos grupos Ct e Cd. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contração à Fe. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) *P < 0,05.

4.1.3 Participação da enzima guanilato ciclase solúvel no relaxamento independente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica

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

A adição de Azul de metileno reduziu a resposta ao NPS em ambos os grupos experimentais, indicando participação similar da Guanilato Ciclase no relaxamento induzido pelo NPS em ambos os grupos (Figura 8).

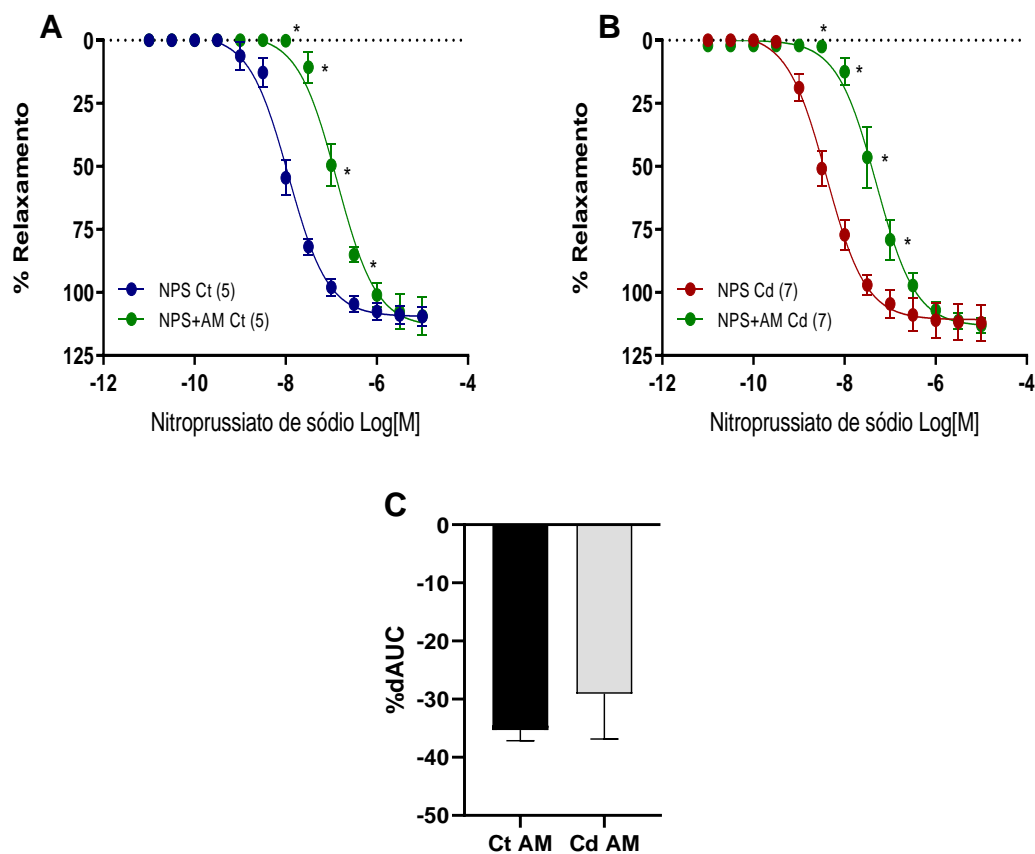


Figura 8: (A-B) Resposta dilatadora induzida pelo NPS na presença ou não de azul de metileno em segmentos de aorta de ratas dos grupos Ct e Cd. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à Fe. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA (duas vias) * $P < 0,05$. (C) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, $P > 0,05$.

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

A exposição dos anéis de aorta ao KCl (75 mM) provocou resposta contrátil similar em ambos os grupos experimentais (Controle $1,70 \pm 0,13$ g, n=34; vs Cádmio $1,84 \pm 0,08$ g, n=35, teste t-Student não pareado), por isso, a resposta contrátil à Fe foi normalizada pela contração máxima ao KCl, em porcentagem (Figura 9).

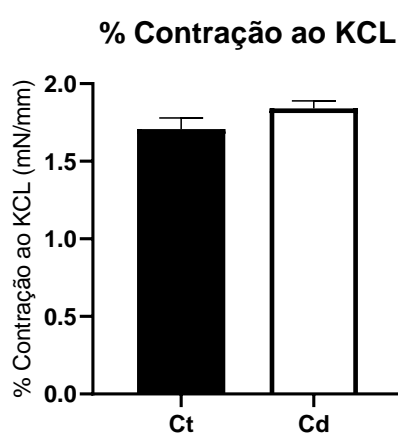


Figura 9: Avaliação da função muscular lisa dos segmentos de aorta (Δ Contração ao KCL). Valores expressos em média e EPM; $p > 0,05$, Teste t de Student não pareado.

4.1.5 Reatividade à fenilefrina de segmentos isolados de aorta

A incubação com concentrações crescentes de Fe, um agonista $\alpha 1$ -adrenérgico, foi capaz de produzir contração nos anéis aórticos de ambos os grupos. A exposição *in vitro* ao Cd 5 μ M não foi capaz de alterar essa resposta (Figura 10).

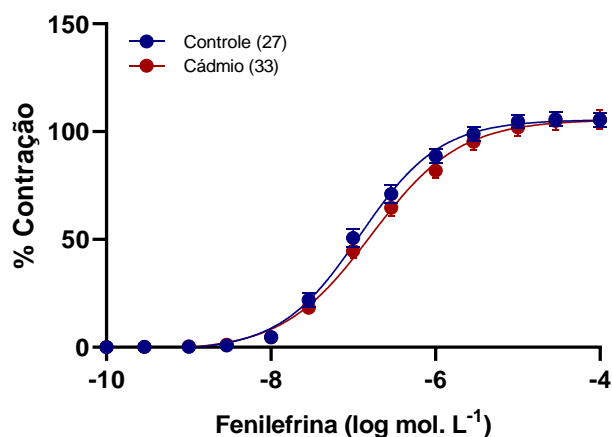


Figura 10: Curvas concentração-resposta a Fe em segmentos aórticos dos grupos Ct e Cd após exposição *in vitro* ao CICd2. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. $P > 0,05$.

4.1.6 Participação do tecido adiposo perivascular (TAP) na resposta à fenilefrina de segmentos isolados de aorta

Para avaliar a participação do TAP na reatividade à fenilefrina após a exposição *in vitro* ao Cd, os anéis com TAP foram dissecados da aorta, antes da remoção completa desse tecido nos demais segmentos da aorta.

A presença do TAP foi capaz de reduzir a reatividade vascular à Fe (desvio da curva para direita) somente no grupo controle (Figuras 11A, B e C), indicando seu papel anticontrátil. No entanto, após exposição ao Cd, a modulação anticontrátil do TAP sobre a reatividade à Fe foi abolida (Figura 11C).

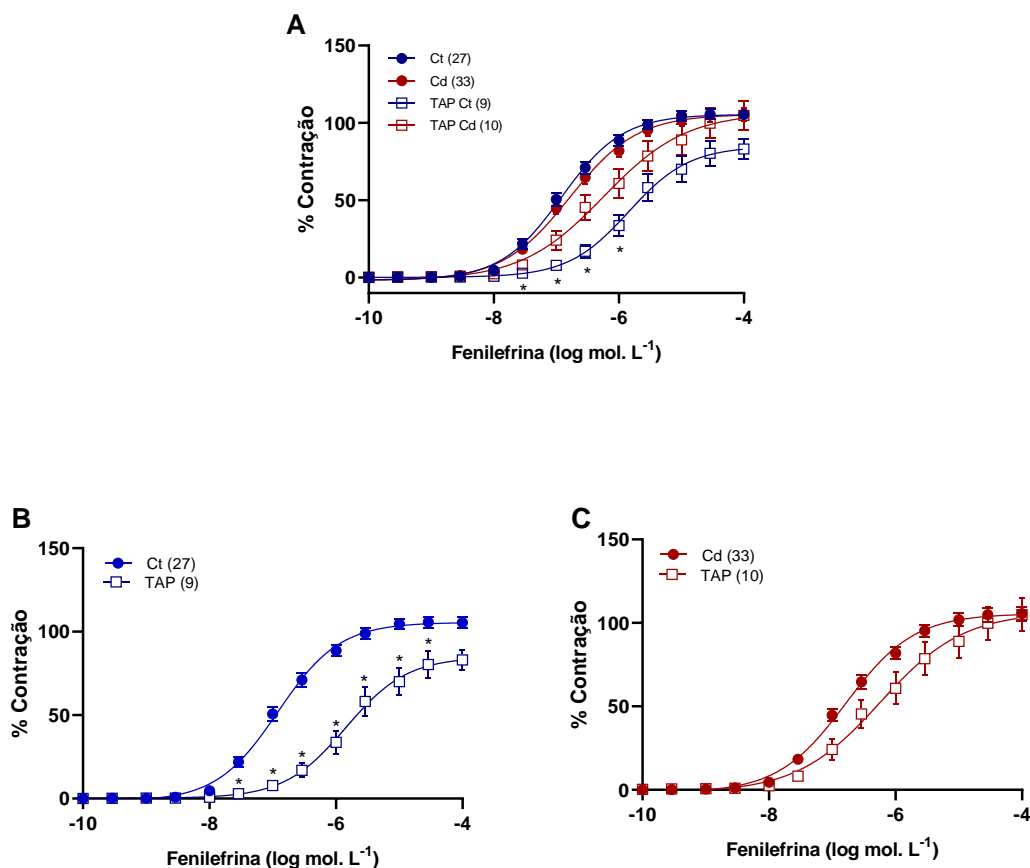


Figura 11: (A-C) Curvas concentração-resposta a Fe em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct TAP e Cd TAP. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs contração do Controle à mesma concentração de Fe.

4.1.7 Efeitos da exposição *in vitro* ao Cádmi sobre a modulação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para definir se haveria alguma alteração na participação do endotélio na resposta contrátil à Fe, o endotélio de alguns anéis foi removido e as curvas de ambos os grupos foram analisadas. Observou-se que a remoção mecânica do endotélio aumentou a resposta contrátil à Fe tanto do grupo Ct quanto do grupo Cd (Figuras 12A, B e C). Entretanto, não houve diferença na magnitude dessa resposta entre os grupos (Figura 12D).

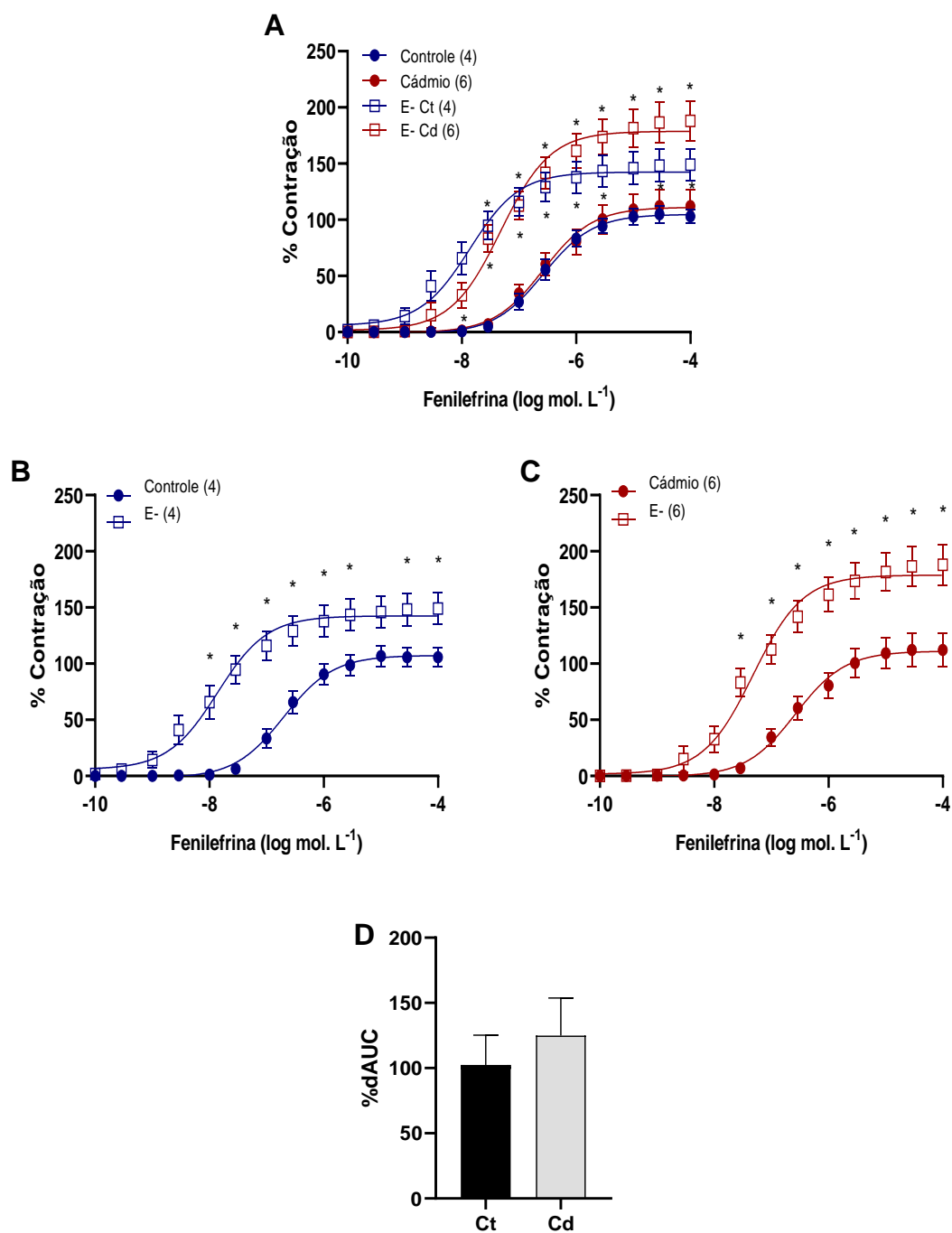


Figura 12: (A-C) Curvas concentração-resposta a Fe em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct E- e Cd E- após a remoção do endotélio. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. *P > 0,05 vs contração do Controle à mesma concentração de Fe. (D) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, p > 0,05.

4.1.8 Efeitos da exposição *in vitro* ao Cádmiio sobre vias vasoativas endoteliais na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Embora a exposição *in vitro* ao cádmio não tenha modificado a reatividade vascular à Fe ou a modulação endotelial, não se pode descartar os possíveis efeitos do metal em vias endoteliais que induzem relaxamento e/ou contração. Portanto, mesmo diante dos resultados acima, algumas vias endoteliais alvo do Cd, já reportada em trabalho anterior (ANGELI et al., 2013), foram investigadas.

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

Para avaliar a participação do NO na resposta contrátil à Fe, utilizamos o L-NAME (100 μ M), que é um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), enzima responsável pela produção de NO.

Observamos que ao inibir a NOS, ambos os grupos tiveram um aumento da resposta contrátil à Fe (Figuras 13A, B e C). Entretanto, a magnitude desse efeito não foi diferente entre os grupos (Figura 13D).

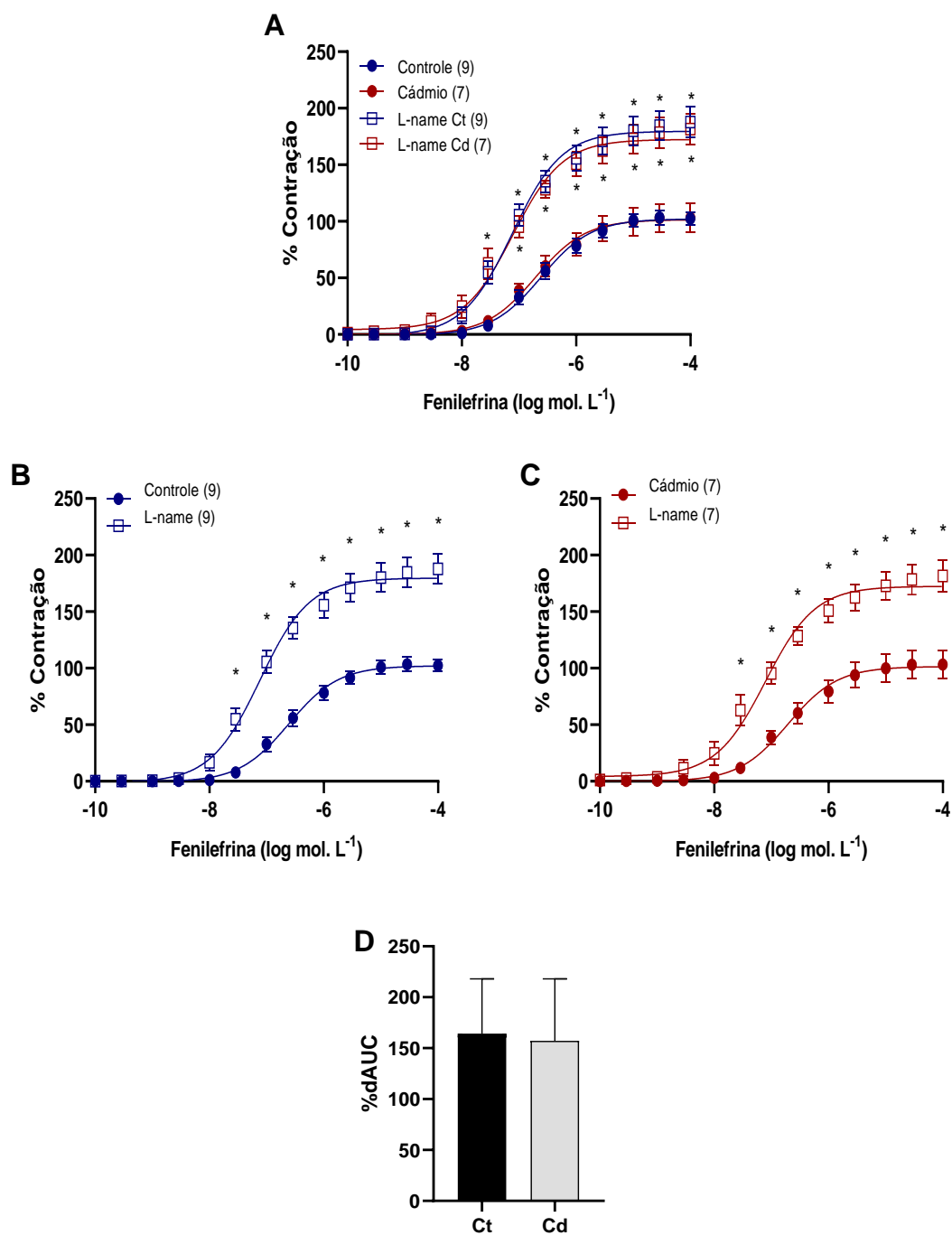


Figura 13: (A, B e C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não do L-NAME em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct L-name e Cd L-name. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ vs contração do Controle à mesma concentração de Fe. (D) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, $P > 0,05$.

Corroborando os achados funcionais, a produção basal de NO, avaliada através de sonda DAF-2 fluorescente, também se manteve inalterada em ambos os grupos. Esses dados, em conjunto, indicam uma produção similar de NO em ambos os grupos, corroborando com análise funcional da NOS.

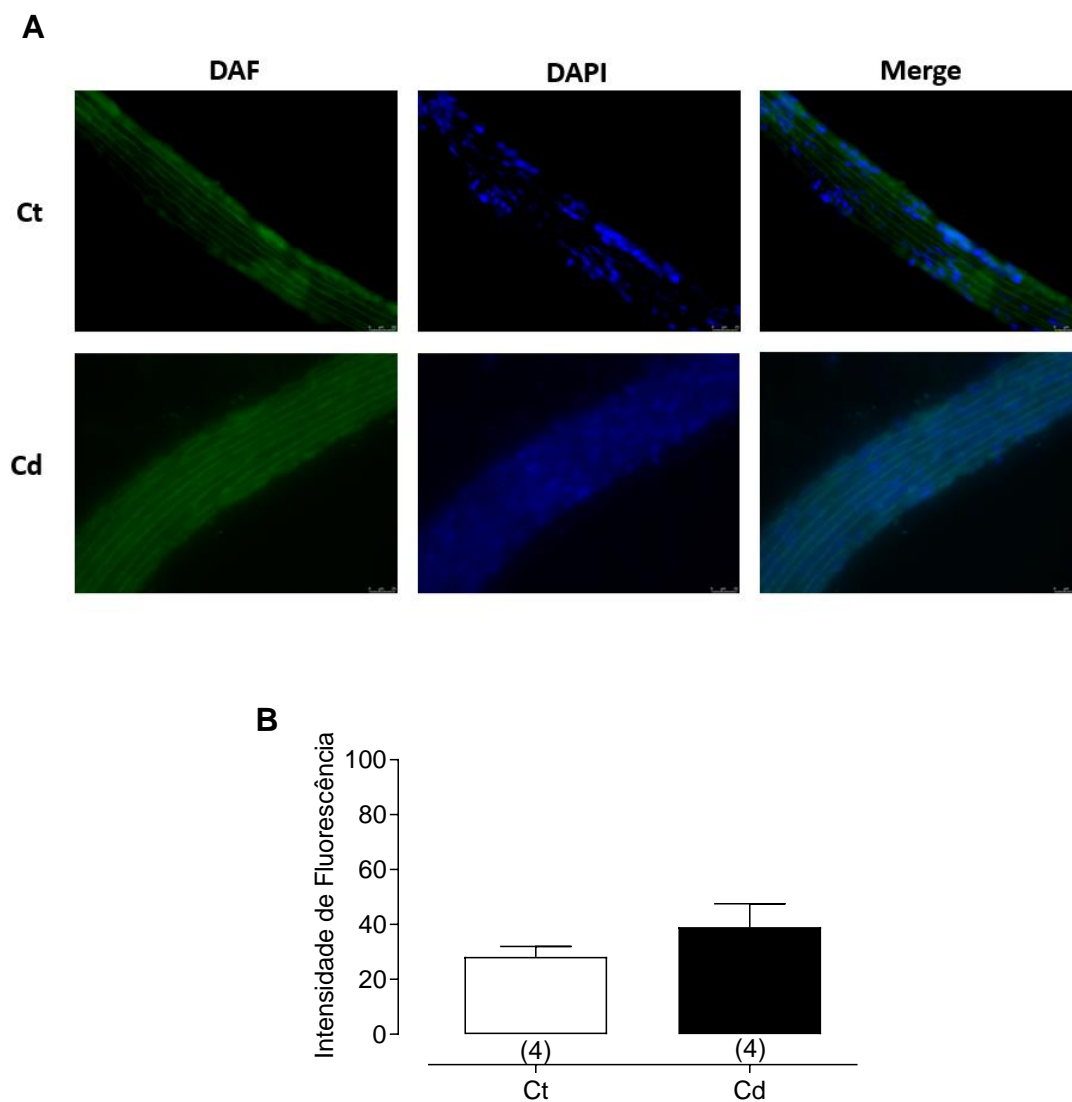


Figura 14: Detecção de NO “in situ” em seções de aorta. (A) Imagens representam os segmentos de aorta marcados com a sonda fluorescente DAF-2 no grupo Controle e Cádmio na presença e ausência de L-NAME. (B) Gráfico demonstrando a análise semi-quantitativa dos níveis de fluorescência. Dados expressos em média \pm EPM da densidade de fluorescência. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. $P > 0,05$.

4.1.8.2 Participação da via da enzima ciclooxigenase (COX) na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

Para avaliar a participação da via da COX na resposta contrátil à Fe após a exposição *in vitro* ao Cd, utilizamos um inibidor não seletivo da COX, a Indometacina.

A incubação com o fármaco no grupo Controle reduziu a resposta contrátil a Fe sugerindo liberação de prostanóides constritores. No entanto, no grupo exposto ao Cd, essa resposta foi abolida sugerindo uma redução da modulação positiva dos prostanóides derivados da COX na resposta contrátil à Fenilefrina de ratas expostas ao Cd. (Figura 15A-C).

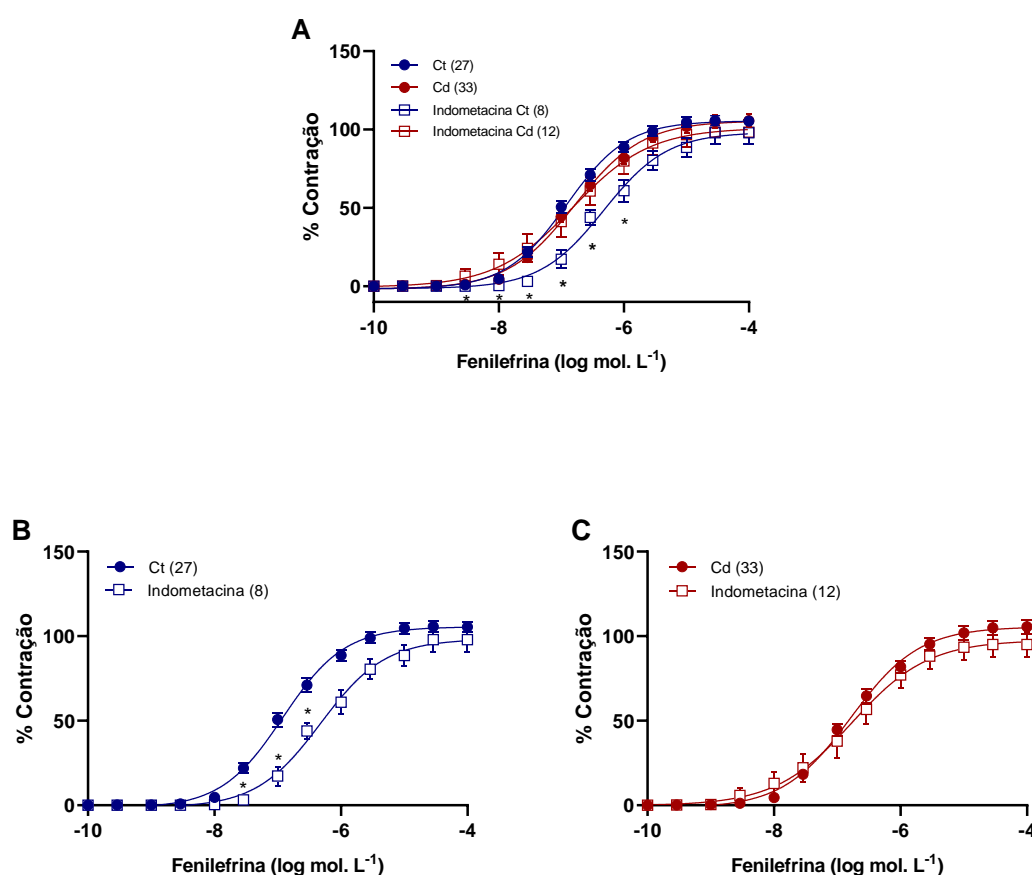


Figura 15: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Indometacina em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct indometacina e Cd indometacina. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. *P < 0,05 vs contração do Controle à mesma concentração de Fe.

4.1.8.3 Participação da via da Angiotensina II na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

Para avaliar a participação da via da Ang II na resposta contrátil à Fe após a exposição *in vitro* ao Cd, utilizamos um inibidor não seletivo da ECA, o Enalapril.

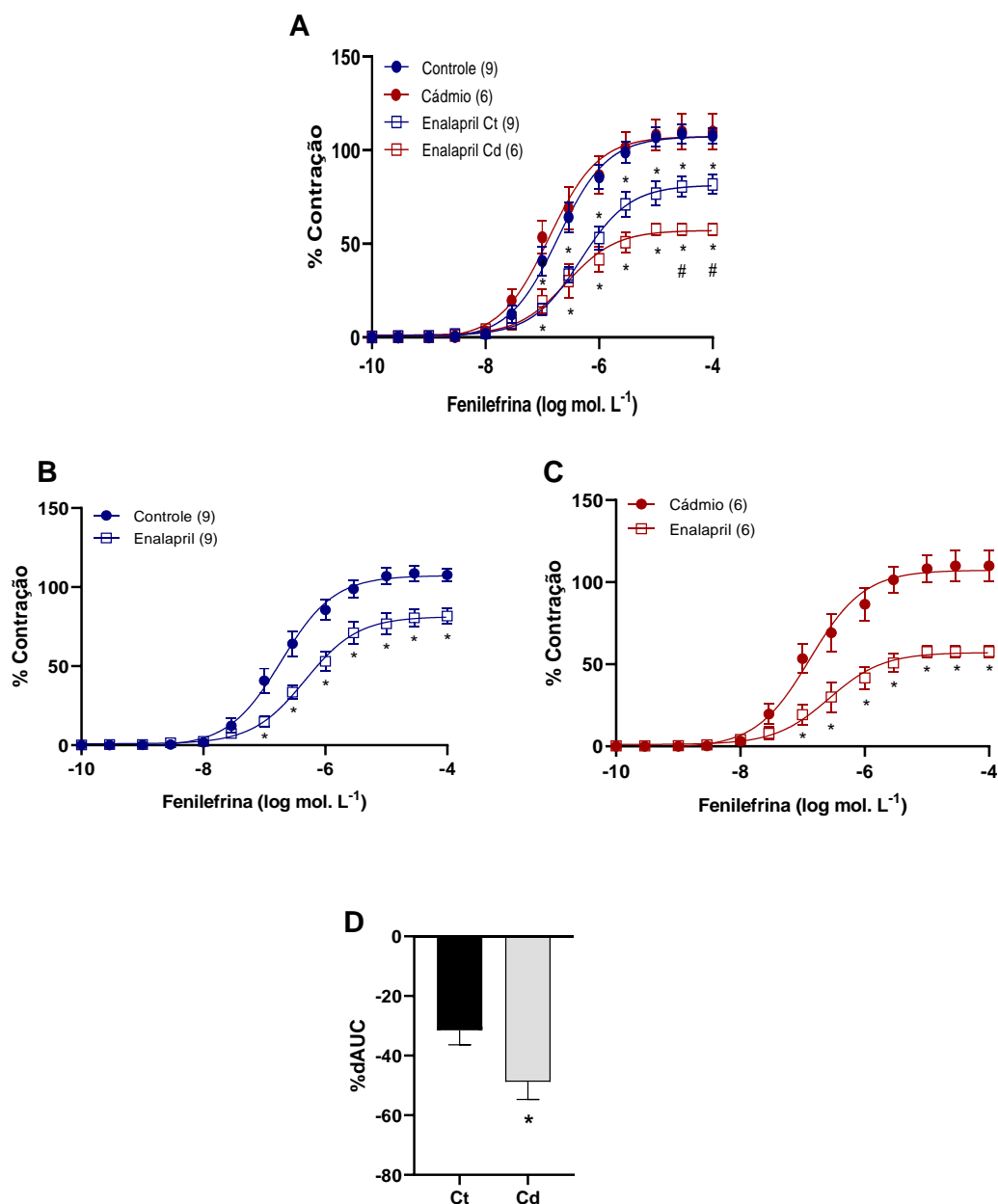


Figura 16: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Enalapril em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct Enalapril e Cd Enalapril. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste

de Bonferroni. *P < 0,05 vs contração do Controle à mesma concentração de Fe. #P < 0.05 Ct Enalapril vs Cd Enalapril. (D) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste-t não pareado foi usado na dAUC, *P < 0,05.

Ao inibir a ECA, observamos uma redução da reatividade vascular a fenilefrina em ambos os grupos (Figuras 16A, B e C), sugerindo modulação da Ang II na reatividade à Fe. Porém, os valores da dAUC demonstram que a participação da via da Ang II na resposta contrátil a fenilefrina está aumentada em anéis de aorta expostos ao cádmio. A diferença da participação da via da Ang II nos dois grupos estudados pode ser claramente observada através da diferença de área abaixo da curva (Fig. 16D).

4.1.8.4 Participação dos canais para potássio (K⁺) na resposta contrátil à Fenilefrina em aorta torácica

Para avaliar a participação dos canais para K⁺ na resposta contrátil à Fenilefrina após a exposição *in vitro* ao Cd, utilizamos um inibidor não seletivo desses canais, o TEA.

Ao inibir os canais para K⁺, observamos um aumento da reatividade vascular a Fe em ambos os grupos (Figuras 17A, B e C), sugerindo a participação desses canais na modulação da reatividade à Fe. No entanto, a magnitude desse efeito, evidenciado pelo dAUC (Figura 17D), foi menor no grupo exposto ao Cd.

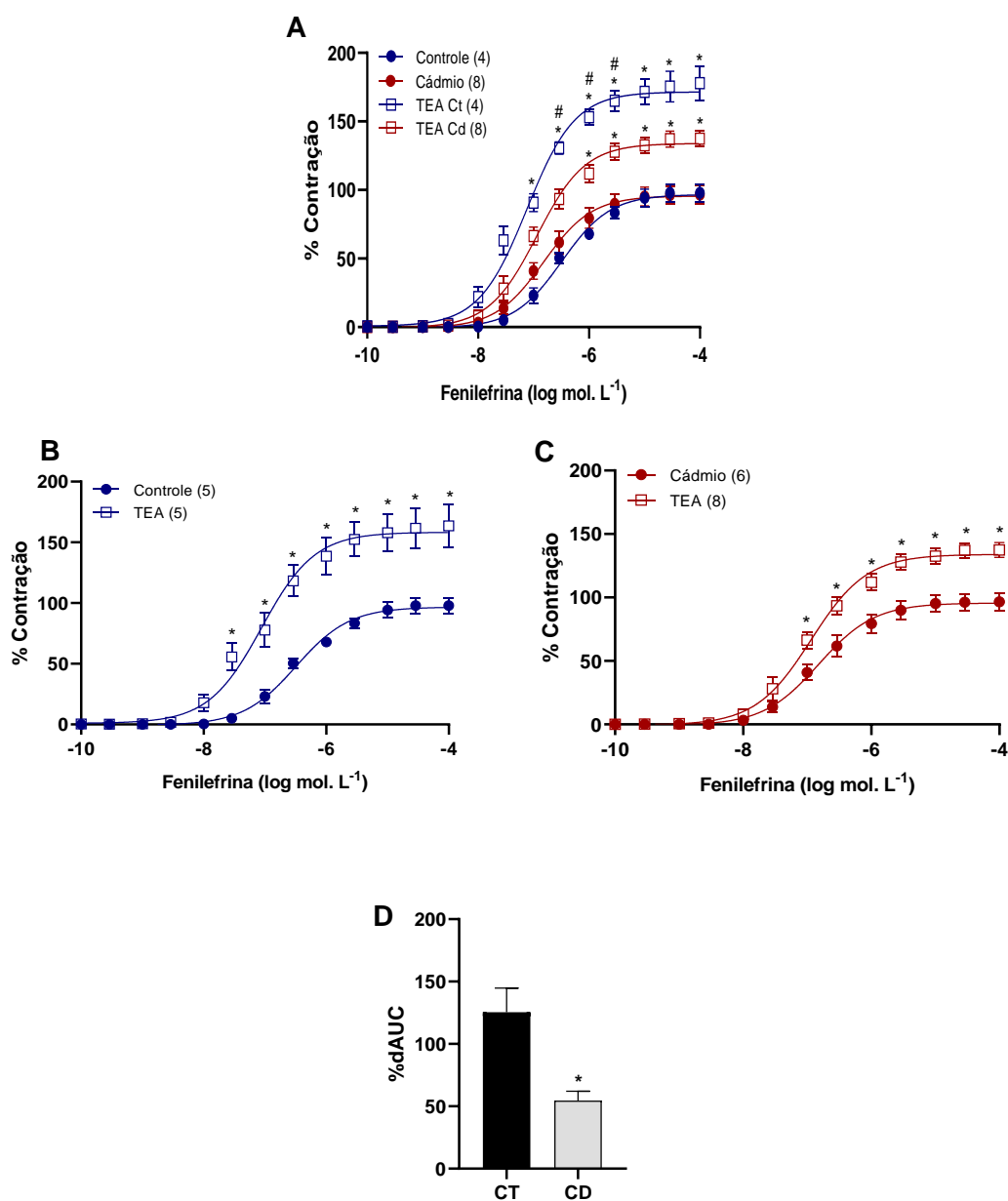


Figura 17: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de TEA em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct TEA e Cd TEA. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. *P < 0,05 vs contração do Controle à mesma concentração de Fe. #P < 0,05 Ct TEA vs Cd TEA. (D) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAUC%) para comparação entre os grupos. Teste t não pareado foi usado na dAUC, *P < 0,05.

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

Para investigar a participação do ânion superóxido na resposta contrátil à Fe, utilizamos um scavenger do $O_2^{\cdot-}$, a enzima SOD (150 U/ml).

Observamos que a incubação com essa enzima reduziu a resposta contrátil apenas no grupo Cd (Figura 18A-C). Esse resultado sugere que há participação do $O_2^{\cdot-}$ na modulação da reatividade vascular a Fenilefrina dos anéis expostos ao Cd.

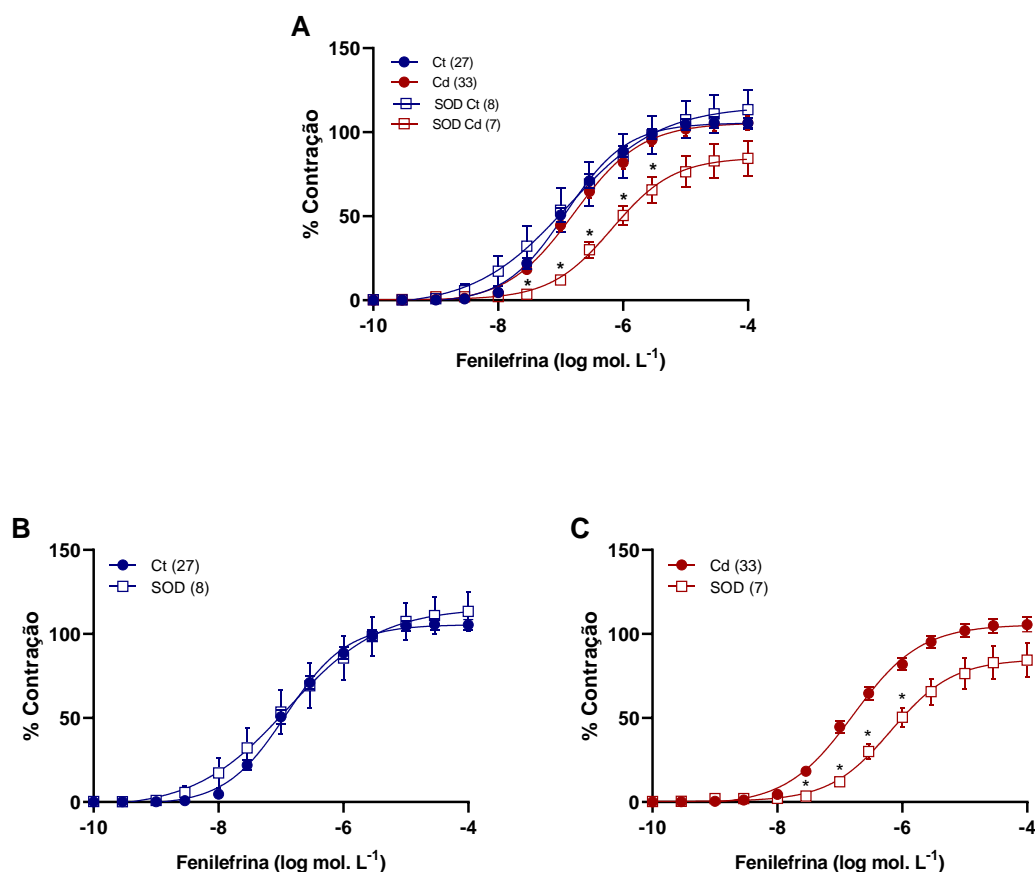


Figura 18: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de SOD em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct SOD e Cd SOD. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. *P < 0,05 vs contração do Controle à mesma concentração de Fe.

Com o objetivo de confirmar o aumento na produção de ânion superóxido pela exposição ao Cd observada nos dados funcionais, foi realizada a técnica de

detecção *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ por meio de fluorescência oxidativa ao DHE. A Figura 19 demonstra que segmentos de aorta de ratas expostas ao Cd apresentaram maior fluorescência quando incubadas com DHE, quando comparado ao grupo controle.

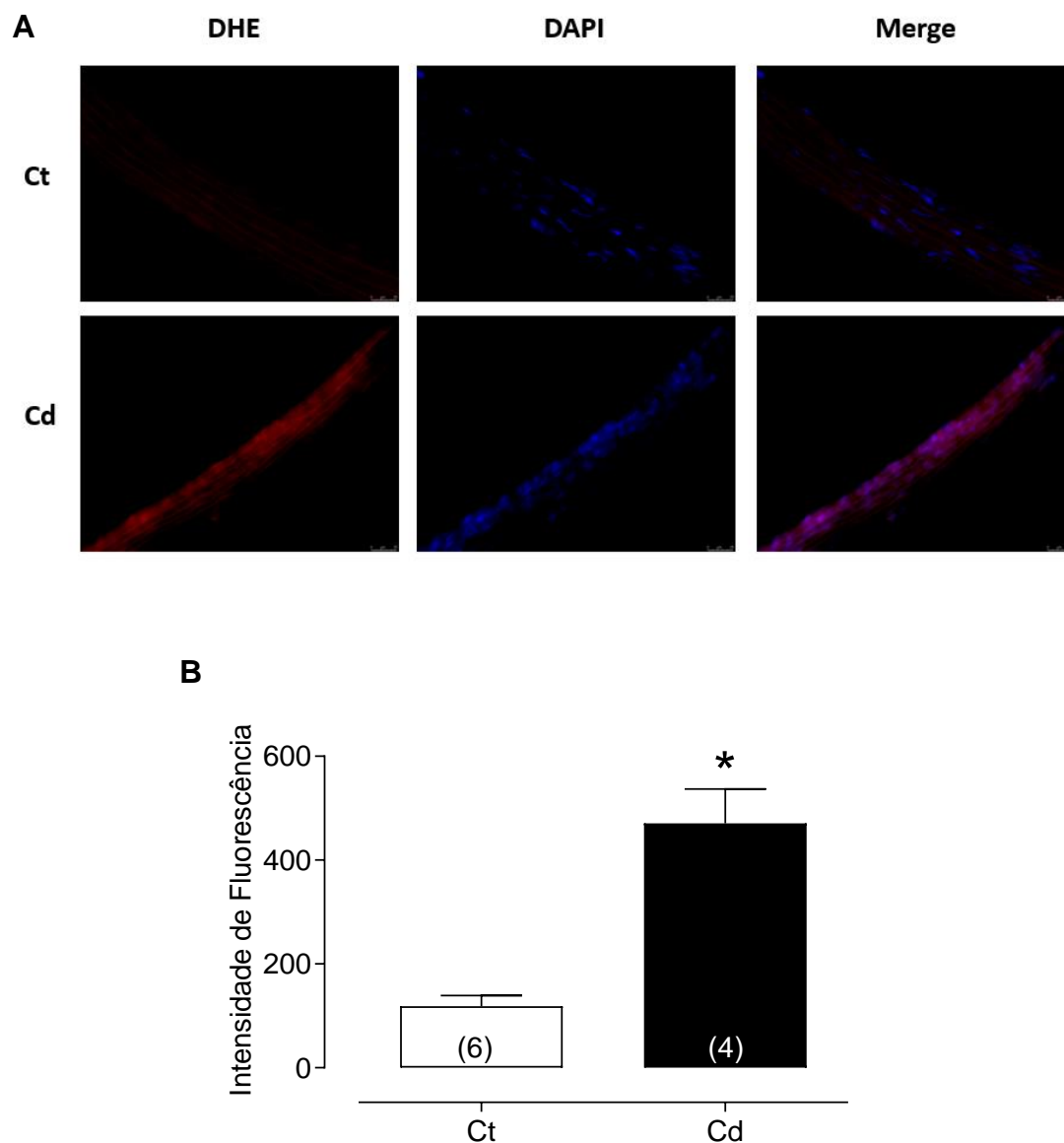


Figura 19: Detecção “*in situ*” da produção de ânion superóxido em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência representando secções transversais de aorta torácica na presença de DHE de animais do grupo Controle (Ct) e Cádmio (Cd). A especificidade do método foi avaliada pela incubação das aortas com o Tiron (1mM). Gráfico de barras demonstrando a análise semiquantitativa. Os dados estão expressos em média \pm EPM da densidade de fluorescência. O número de animais está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-t não pareado. *P < 0,05 vs Cd.

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

A NADPH oxidase é a principal enzima produtora de espécies reativas de oxigênio vascular. Para investigar a contribuição desta enzima, utilizamos a Apocinina (30 μ M), que impede a translocação das subunidades citosólicas da NADPH oxidase, inibindo-a.

Os resultados demonstraram reatividade vascular similar antes e após a incubação com o fármaco em ambos os grupos experimentais, sugerindo que essa enzima não é a fonte do excesso de $O_2^{\cdot-}$ observado nos anéis Cd (Figura 20A-C).

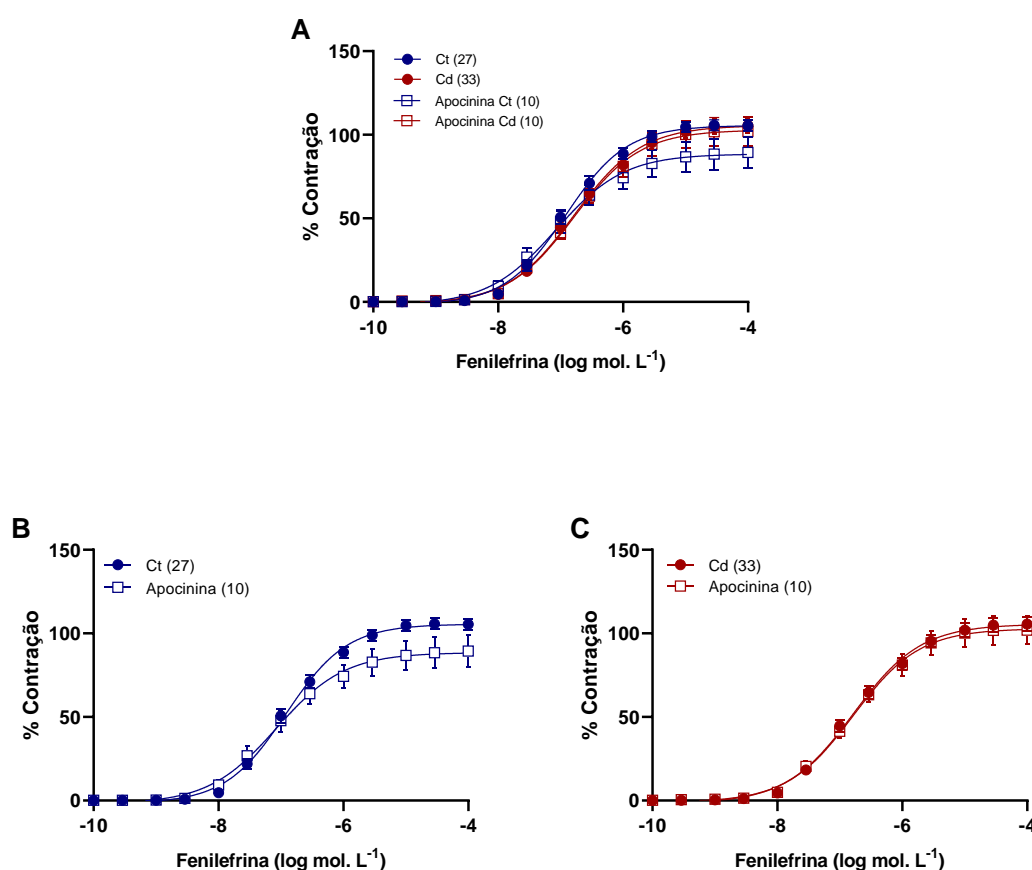


Figura 20: Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Apocinina em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct apocinina e Cd apocinina. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni $P > 0,05$.

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

Para investigar a participação do peróxido de hidrogênio na resposta contrátil à Fenilefrina, os anéis foram incubados com a enzima Catalase (1000U/ml), responsável pela degradação de H_2O_2 em H_2O e O_2 .

Os resultados demonstraram reatividade vascular similar antes e após a incubação com o fármaco em ambos os grupos experimentais, descartando a participação do H_2O_2 na reatividade vascular de ambos os grupos (Figura 21).

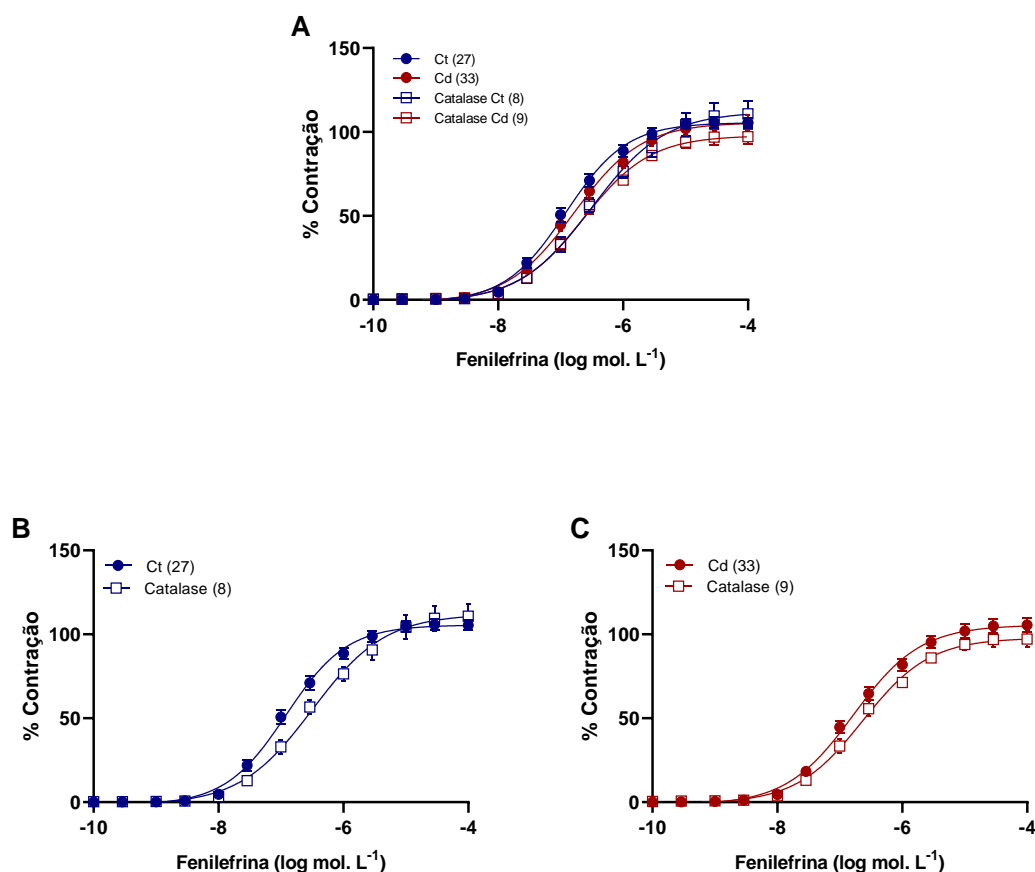


Figura 21: Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Catalase em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct catalase e Cd catalase. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni $P > 0,05$.

4.2 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ERA DE ESTROGÊNIO NA RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA EM AORTA TORÁCICA

Sabendo que o Cd é um metaloestrógeno decidimos explorar o desempenho dos receptores ER α na exposição a esse metal pesado através do Fulvestrant (1 μ M), que nesta dose age como um degradador desses receptores.

Observamos que a incubação com o Fulvestrant aumentou a reatividade vascular a Fe apenas no grupo Cd (Figura 22A-C), sugerindo uma maior modulação dos receptores ER α após a exposição *in vitro* ao Cd, fortalecendo esse metal pesado como um metaloestrógeno.

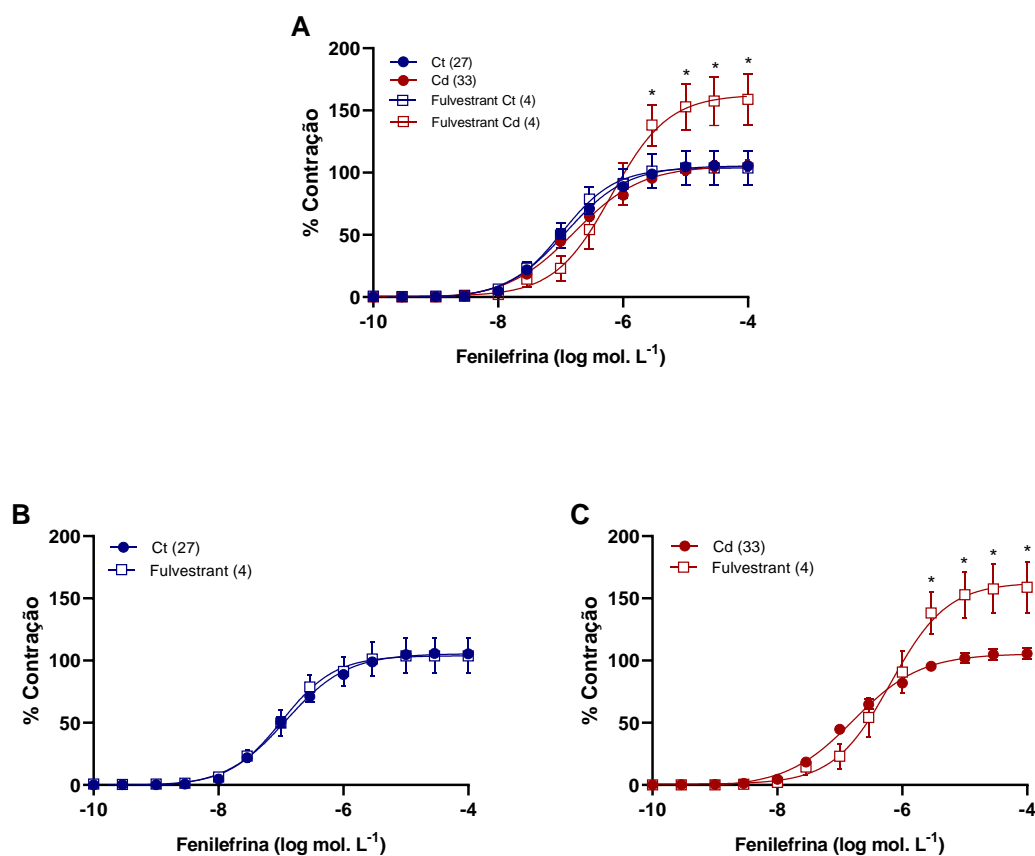


Figura 22: (A-C) Curvas concentração-resposta à Fe na presença ou não de Fulvestrant em segmentos aórticos dos grupos Ct, Cd, Ct fulvestrant e Cd fulvestrant. Valores expressos em média e EPM, o número de animais está representado entre parênteses; ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni *P < 0,05.

4.3 ANALISE DA ARQUITETURA ENDOTELIAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para verificar se há dano estrutural na superfície endotelial de aorta de ratas após a exposição *in vitro* ao Cd, foi realizada a MEV. As imagens aórticas torácicas de fêmeas do grupo Controle mostram uma superfície escamosa normal com uma camada celular endotelial confluyente. Em contraste, o grupo Cádmio exibe um dano endotelial da superfície estrutural com evidente irregularidade na superfície endotelial e perda da estrutura normal (Figura 23).

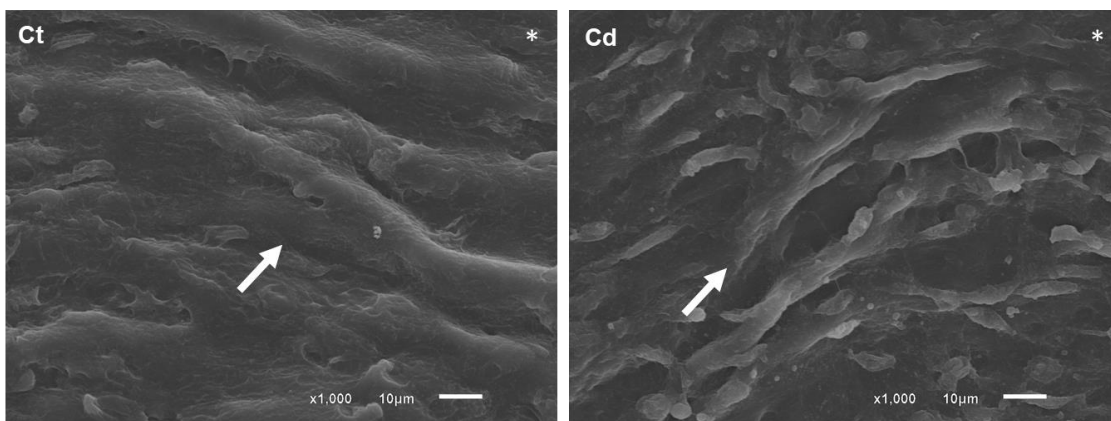


Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura mostrando fotomicrografia representativa da estrutura endotelial de aorta de ratas Controle (Ct) e Cádmio (Cd). Barra de escala 10µm (ampliação de x1000). Asterisco: superfície endotelial; seta branca: célula endotelial.

6 DISCUSSÃO

Embora o número de estudos sobre a função vascular induzida pela resposta ao Cd seja crescente nos últimos anos, até o presente momento, pouco se sabe sobre os efeitos desse metal em fêmeas. Decerto, avançamos no conhecimento dos efeitos do Cd *in vitro* em baixa concentração, sob a função vascular de ratas Wistar.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram pela primeira vez, que a exposição *in vitro* a 5 μ M de Cd, concentração abaixo daquela encontrada na camada média da aorta de fumantes (ABU-HAYYEH et al., 2001), foi capaz de lesionar a arquitetura do endotélio vascular, podendo levar a ocorrência de vasculopatias. Estudos prévios demonstraram que tanto a exposição aguda, como a exposição crônica ao Cloreto de Mercúrio (Cl_2Hg) também são capazes de danificar a camada endotelial de aorta de Wistar machos e fêmeas, expondo a membrana elástica interna do vaso (CORDEIRO et al., 2019; SCHEREIDER; VASSALLO; SIMÕES, 2021). Sendo assim, nossos achados demonstram que assim como o Hg, o Cd é um metal que mesmo em exposições *in vitro*, é capaz de danificar a estrutura do endotélio vascular em fêmeas.

O Cd foi capaz de alterar a reatividade vascular à Fe na presença do TAP, promover disfunção endotelial por aumento da produção de O_2^- , pelo aumento da participação da via da Ang II e por redução da participação dos canais para K^+ . Apesar da manutenção da reatividade vascular na ausência de TAP após a exposição *in vitro* ao Cd, a disfunção vascular observada nos anéis de aorta dessas ratas, também parece envolver a participação dos receptores $\text{ER}\alpha$, fortalecendo o papel desse metal pesado como um metaloestrógeno. Estudos demonstram a capacidade do estrogênio em desempenhar sua função cardioprotetora, através da ativação dos ER (CHAMBLISS; SHAUL, 2002; PÉREZ-CREMADES et al., 2018). A regulação da reatividade vascular associada ao estrogênio, se dá pela manutenção da função endotelial normal, que por ativação dos ER aumentam a biodisponibilidade de NO e de prostaciclina (GEARY et al., 2000; NOVELLA et al., 2013; SOBRINO et al., 2010, 2017). Sabe-se que a expressão de ER nas artérias é menor nos homens, do que nas mulheres pré e pós-menopausa, assim como o nível de secreção de estrogênio

(HAYASHI et al., 2007; ORSHAL; KHALIL, 2004). Oliveira e colaboradores (2022) demonstram que a exposição subcrônica ao Cd não altera os níveis circulantes de E₂ em ratas (OLIVEIRA, T. F. et al., 2022). Silva e colaboradores (2013), já haviam descrito a capacidade do Cd, como metaloestrógeno, induzir a proliferação de células do estroma, derivadas do endométrio de mulheres com endometriose, fortalecendo essa ação do metal (SILVA et al., 2013). Portanto, a elucidação dessa ação do Cd sobre os receptores de estrogênio, é importante para identificar o mecanismo de ação do Cd no sexo feminino.

De fato, evidenciamos que a exposição *in vitro* ao Cd 5 µM num vaso íntegro, altera a reatividade vascular, porém na ausência do TAP, não há alteração da reatividade vascular à Fe. Esses resultados são compatíveis com os observados em exposição subcrônica durante 30 dias com cádmio (Cd 100 ppm) através da água de beber em ratas, onde não foi observada alteração de reatividade vascular na ausência de TAP (OLIVEIRA, T. F. et al., 2022). Tais dados se opõem aos achados em ratos machos, onde verificaram que a exposição tanto aguda (10 µM), como subcrônica ao cádmio (Cd 100 ppm) aumentou a contratilidade vascular de aorta nesses ratos na ausência de TAP (ALMENARA, C.; PEREIRA, 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA, T. F. et al., 2019). Esses achados reforçam que a manutenção da reatividade vascular em fêmeas após a exposição ao Cd, em parte podem ser devidos a ação do Cd sobre os ER.

Para verificar se a exposição *in vitro* ao Cd poderia alterar a modulação endotelial em ratas, a reatividade vascular à Fe foi testada em anéis isolados de aorta na presença (E+) e na ausência do endotélio (E-). Embora não houvesse diferença na resposta de ambos os grupos, não foi descartado um desbalanço entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores induzidos pela exposição ao metal, e algumas vias vasoativas endoteliais foram testadas.

Em machos, a redução da biodisponibilidade de NO após exposição ao Cádmio já é bem estabelecida na literatura (ALMENARA, C.; PEREIRA, 2013; ANGELI et al., 2013; GÖKALP et al., 2009; MAJUMDER et al., 2008; NAGARAJAN et al., 2013; OLIVEIRA, T. F. et al., 2019). O único trabalho realizado em fêmeas, expostas de forma subcrônica ao Cd, demonstrou uma preservação de NO em aorta isolada (OLIVEIRA, T. F. et al., 2022). No entanto, os efeitos diretos do Cd *in vitro* sob a vasculatura de fêmeas, não haviam sido

estudados. De acordo com os resultados obtidos pela incubação com L-NAME, também não foi observada alteração da modulação do NO sobre a resposta à Fe em anéis de aorta de ratas expostas ao Cd, quando comparados ao grupo Ct, o que corrobora com os achados anteriores em fêmeas. A análise da produção basal de NO por DAF-2 confirma esse achado, indicando uma produção similar de NO em ambos os grupos.

Diversos estudos tem associado a exposição ao Cd, com danos cardiovasculares promovidos pelo aumento do estresse oxidativo causado pelo metal (ALMENARA, C.; PEREIRA, 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA, T. F. et al., 2019). Ratos machos expostos de forma subcrônica ao Cd e que obtiveram concentração sanguínea de Cd similar àquela encontrada em indivíduos expostos ocupacionalmente, tiveram aumento da liberação de $O_2^{\cdot-}$, associado à NADPH oxidase (isoforma NOX2) e participação do H_2O_2 como agente contrátil (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013). Cabe ressaltar que a depender da quantidade de H_2O_2 liberada, essa ERO pode agir como agente contrátil ou anticontrátil (GAO et al., 2004). Em machos, a exposição ao Cd de forma aguda ($10\mu M$), superior àquela encontrada na camada média de fumantes (ABU-HAYYEH et al., 2001) também demonstrou aumento de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , como agentes contráteis (ANGELI et al., 2013). Em nossos resultados não encontramos participação do H_2O_2 na modulação da reatividade vascular à Fe no grupo exposto ao Cd, entretanto, a remoção catalítica do $O_2^{\cdot-}$, através da incubação com SOD, reduziu a resposta contrátil à Fe apenas no grupo Cd. Esses dados sugerem uma maior biodisponibilidade de $O_2^{\cdot-}$, atuando como fator contrátil e contribuindo para a modulação da resposta à Fe. Essa hipótese foi confirmada através do protocolo de fluorescência com a sonda DHE, onde observamos maior produção $O_2^{\cdot-}$ in situ. Esse dado, se opõe ao encontrado em ratas expostas de forma subcrônica ao Cd, onde não foi observada alteração na biodisponibilidade de $O_2^{\cdot-}$ (OLIVEIRA, T. F. et al., 2022). Nossos resultados demonstram que em fêmeas, o Cd aumenta a liberação de $O_2^{\cdot-}$ mesmo em baixa concentração, mas que de forma crônica, mecanismos compensatórios podem atuar de forma a se contrapor a esse efeito (OLIVEIRA, T. F. et al., 2022).

Para verificar se a NADPH oxidase seria fonte responsável pelo aumento do $O_2^{\cdot-}$, um inibidor dessa enzima foi utilizado. No entanto, não observamos

alterações significativas na reatividade vascular que indicassem alterações na mesma. Sabe-se interação do $O_2^{\cdot-}$ com o NO provoca a formação de $ONOO^{\cdot-}$, que por sua vez, pode promover o desacoplamento da eNOS e induzir a produção de mais EROs (APEL; HIRT, 2004; MILSTIEN; KATUSIC, 1999). Sabendo que o Cd tem ação direta no sítio catalítico da eNOS e pode desacoplá-la (MITTAL; HARRELL; MEHTA, 1995), acreditamos que essa via possa explicar o aumento de $O_2^{\cdot-}$ observado após a exposição *in vitro* ao Cd. Portanto, mais estudos são necessários para investigar o aumento do estresse oxidativo em aorta de ratas após a exposição *in vitro* ao Cd.

A Ang II é considerada um potente vasoconstrictor, que induz disfunção vascular via aumento da produção de EROs que induzem estresse oxidativo em células do músculo liso vascular (CMLV) (NAZAREWICZ et al., 2014; ZAFARI et al., 1998). Um estudo onde aortas de machos foram expostas ao Cd *in vitro*, evidenciou a participação da Ang II no aumento da resposta contrátil à Fe e um aumento na produção intracelular de EROs induzidos pela Ang II, predominantemente derivados da NADPH oxidase (ZAFARI et al., 1998). Quanto às alterações na via da Ang II após a exposição ao Cd, Almenara e colaboradores (2013), não observaram alterações nessa via na disfunção endotelial promovida pela exposição subcrônica ao Cd em machos (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013). No estudo de Angeli e colaboradores (2013), onde machos foram expostos de forma aguda ao Cd, com o dobro da concentração utilizada no nosso estudo (10 μ M), foi observado um aumento da participação da Ang II na resposta contrátil a Fe (ANGELI et al., 2013).

Já se sabe também que em machos, o Cd exerce ação inibitória direta sobre a atividade da ECA sérica, aórtica e pulmonar, efeito esse concentração-dependente (BROSEGHINI-FILHO et al., 2015). Nossos resultados demonstram uma participação da via da Ang II no grupo Cd, não observada no grupo Ct. Uma maior participação do SRA, aumenta a liberação de Ang II, que promove seus efeitos clássicos via receptor AT_1 (vasoconstrição e produção de EROs) (SALAZAR, 2018; TOUYZ; TABET; SCHIFFRIN, 2003).

Quanto a participação dos prostanoídes derivados da COX, um estudo anterior identificou um aumento da liberação de prostanoídes vasoconstrictores em aorta isolada de ratos após exposição *in vitro* ao Cd, com o dobro da

concentração utilizada no presente estudo (ANGELI et al., 2013). Os estudos que analisaram a via da COX na exposição ao Cd são escassos. Porém, a exposição ao Cd está associada ao aumento do estresse oxidativo (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA, T. F. et al., 2019), condição que aumenta a atividade/expressão da via da COX-2 (BRIONES; HERNANZ; PE, 2008; LIEBERT et al., 2004). Nossos resultados sugerem uma redução da modulação positiva dos prostanóides derivados da COX na resposta contrátil à Fe de ratas expostas ao Cd. Esses dados sugerem que pode haver um aumento da liberação de PGI₂ e/ou redução de prostanóides constrictores nessas ratas, contribuindo como dos importantes contrabalanceadores da resposta ao Cd na modulação da reatividade vascular. Porém, para confirmar essa hipótese, mais estudos são necessários para investigar tal participação.

Os canais para K⁺ são importantes reguladores do tônus vascular, pois participam do potencial de membrana das células excitáveis (NELSON; QUAYLE, 1995). Ao serem ativados, esses canais permitem o efluxo de K⁺ e hiperpolarização da célula ao reduzir o potencial de membrana (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; NELSON; QUAYLE, 1995). Sua ativação promove relaxamento do músculo liso vascular. Quando esses canais são inibidos, a redução no efluxo de K⁺ aumenta o potencial de membrana da célula, abrem-se os canais de cálcio, o que leva a despolarização e contração do músculo liso vascular (COLEMAN; TARE; PARKINGTON, 2004).

Dentre os tipos de canais para K⁺ presentes no endotélio e nas CMLV, podemos destacar os canais para K⁺ voltagem dependentes (K_v), canais para K⁺ ativados por cálcio (K_{Ca}) de baixa, intermediária e alta condutância (BK_{Ca}), canais para K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e canais para potássio retificadores (K_{IR}) (JACKSON, 2006). Os canais BK_{Ca} são os mais abundantes no músculo liso vascular e podem ser ativados por Ca⁺², por despolarização, monóxido de carbono (CO), entre outras substâncias (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; JACKSON, 2006).

Um estudo anterior realizado em CMLV de artérias mesentéricas bovinas, demonstrou que a exposição aguda ao Cd em concentrações inferiores a 1 µM podem inibir os BK_{Ca} do músculo liso vascular (STOCKAND J. et al, 1993), pois por ser um metal bivalente, o Cd poderia competir com o Ca⁺² pelo sítio de

ligação (BLAZKA; SHAIKH, 1991). Nossos resultados sugerem uma redução da participação dos canais para K^+ em ratas após a exposição ao Cd. Sabe-se que as EROs podem modular negativamente a atividade desses canais nas curvas de relaxamento (TANG et al., 2004; VASSALLO et al., 2018), o que também pode contribuir para a redução da participação dos canais para K^+ encontrada no nosso estudo nas curvas de reatividade a Fe em aorta isolada de ratas.

Nos anéis aórticos isolados de ratas, a exposição *in vitro* ao Cd não alterou o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela ACh. Tal achado, corrobora com o encontrados após exposição subcrônica durante 30 dias em fêmeas (OLIVEIRA, T. F. et al., 2022). Quanto ao relaxamento independente do endotélio, induzido por NPS, a exposição *in vitro* ao Cd aumenta a resposta vasodilatadora nesse grupo. Estudos anteriores demonstram que tanto a exposição aguda como a subcrônica, não alteram a resposta vasodilatadora independente do endotélio em machos (ALMENARA, C. C. P. et al., 2013; ANGELI et al., 2013; ROSSI, 2022), assim como não se observam alterações nessa via na exposição subcrônica em fêmeas (OLIVEIRA, T. F. et al., 2022). Quando testada a participação da GCs através da incubação com AM, os achados são similares, não observando diferenças entre os grupos que indicassem alterações da GCs. Mais estudos são necessários para investigar o aumento da resposta ao NPS em aorta de ratas após a exposição *in vitro* ao Cd.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que a exposição *in vitro* ao Cd 5 μM foi capaz de danificar a arquitetura da superfície endotelial e de aumentar a reatividade vascular a fenilefrina em aorta isolada íntegra, por reduzir a modulação anticontrátil do TAP. A exposição *in vitro* ao metal induziu a alterações na função vascular, caracterizada por um desbalanço na liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras. O Cd foi capaz de aumentar a produção de ânion superóxido, aumentar a participação da via da Ang II na resposta a Fe e de reduzir a participação dos canais para K^+ . Em contrapartida, o Cd também foi capaz de reduzir a liberação de prostanoídes vasoconstritores e/ou de aumentar a liberação de prostaciclina. Acreditamos, que o equilíbrio na liberação desses fatores, associado a participação do Cd como um metaloestrógeno, foram capazes de manter a reatividade vascular inalterada na ausência do TAP (Figura 24).

Assim, compreendidos alguns dos mecanismos pelos quais a exposição *in vitro* ao Cádmio age na vasculatura da aorta de fêmeas, sugerimos que mais estudos sejam realizados a fim de entender como esse metal age na população feminina e identificar as possíveis terapias que reduzam os danos vasculares nessa população.

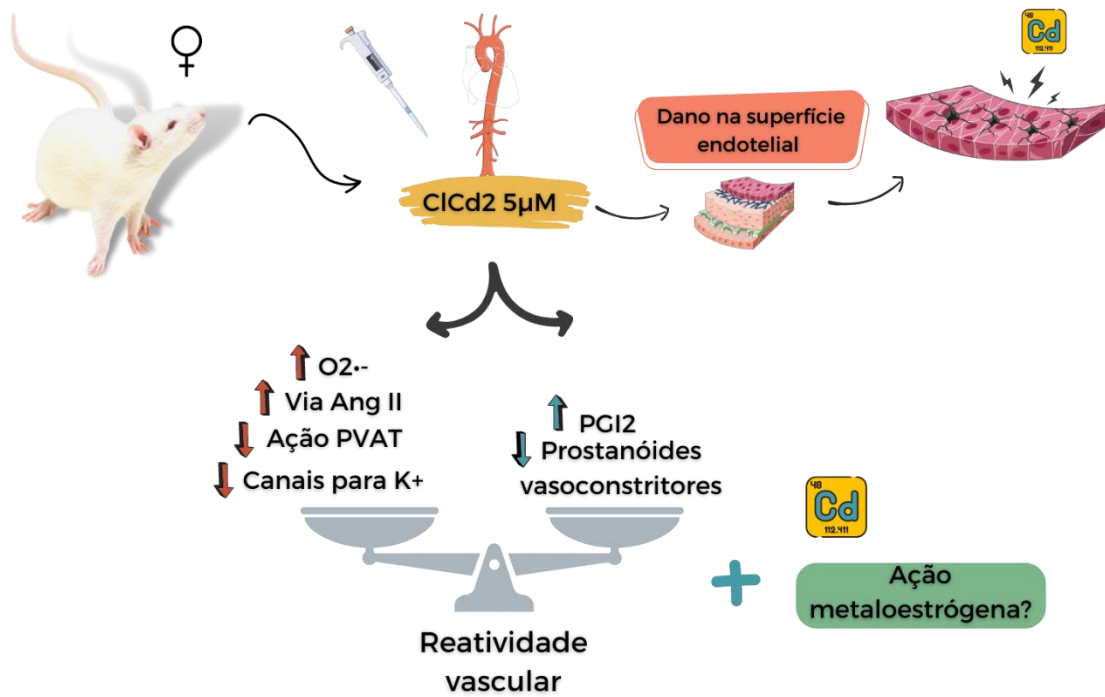


Figura 24: Resumo gráfico dos achados do presente estudo com sugestão de mecanismos pelos quais a exposição *in vitro* ao Cádmiio leva à disfunção vascular em ratas. Fonte própria a partir dos servidores Canva e Server Medical Art.

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.
- ADIE, G. U. et al. Preliminary Study of Heavy Metals in Low-Cost Jewelry Items Available in Nigerian Markets. v. 10, n. 28, 2020.
- AFRIDI, H. I. et al. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. **Journal of human hypertension**, v. 24, n. 1, p. 34–43, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jhh.2009.39>>.
- 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.
- ALMENARA, C.; PEREIRA, C. Efeitos da exposição crônica ao cloreto de cádmio sobre a reatividade vascular e pressão arterial de ratos Fisiologia Cardiovascular Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo Efeitos da exposição crônica ao . p. 0–94, 2013.
- ALVAREZ, Y. et al. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 4, p. 767–777, 2005.
- ANGELI, J. K. et al. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: The role of local angiotensin II and COX-2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 838–848, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.167>>.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- AQUINO, N. B. et al. The role of cadmium and nickel in estrogen receptor signaling and breast cancer: Metalloestrogens or not? **Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 189–224, 2012.

ARYAN, L. et al. The role of estrogen receptors in cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1–26, 2020.

ATSDR. Public Health Statement for Cadmium. **Public Health Statement**, n. September, p. 1–10, 2012.

BERNARD, A. Renal dysfunction induced by cadmium: Biomarkers of critical effects. **BioMetals**, v. 17, n. 5, p. 519–523, 2004.

BLAZKA, M. E.; SHAIKH, Z. A. Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: Role of calcium channels. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 355–363, 1991.

BOLEGO, C. et al. Selective agonists of estrogen receptor isoforms: New perspectives for cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 10, p. 2192–2199, 2006.

BRAMA, M. et al. Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ER α -dependent mechanism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 264, n. 1–2, p. 102–108, 2007.

BRANCA, J. J. V. et al. Cadmium-induced oxidative stress: Focus on the central nervous system. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 1–21, 2020.

BRIONES, A. M.; HERNANZ, R.; PE, J. V. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. n. July 2007, p. 926–935, 2008.

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, 2015.

BYRNE, C. et al. Metals and breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, n. 1, p. 63–73, 2013.

CARVALHO, M. H. C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

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

COLEMAN, H. A.; TARE, M.; PARKINGTON, H. C. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 9, p. 641–649, 2004.

CORDEIRO, E. R. et al. Mercury induces nuclear estrogen receptors to act as vasoconstrictors promoting endothelial denudation via the PI3K/Akt signaling pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 381, p. 114710, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114710>>.

CUI, X. Y. et al. Toxic metals in children's toys and jewelry: Coupling bioaccessibility with risk assessment. **Environmental Pollution**, v. 200, p. 77–84, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.035>>.

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

DAVIDGE, S. T. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circulation Research**, v. 89, n. 8, p. 650–660, 2001.

DE OLIVEIRA, Thiago Fernandes et al. Sex-dependent vascular effects of cadmium sub-chronic exposure on rats. **BioMetals**, n. 0123456789, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10534-022-00470-w>>.

DENIER, X. et al. Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 569–573, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.01.006>>.

DIPAK K. GHOSH AND J.C. SALERNO. NITRIC OXIDE SYNTHASES: DOMAIN STRUCTURE AND ALIGNMENT IN ENZYME FUNCTION AND CONTROL. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 193–209, 2003.

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

DUARTE, E. B. et al. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the

collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. **Chemosphere**, v. 262, p. 127879, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>>.

DUFFUS, J. H. “heavy metals” - A meaningless term? (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

EUDES, J. et al. Cadmium exposure activates NADPH oxidase , renin – angiotensin system and cyclooxygenase 2 pathways in arteries , inducing hypertension and vascular damage. **Toxicology Letters**, v. 333, n. May, p. 80–89, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.027>>.

FAROON O, ASHIZAWA A, WRIGHT S, et al. Toxicological Profile for Cadmium. **CHEMICAL AND PHYSICAL INFORMATION**, n. September, p. 487, 2012.

FATIMA, G. et al. Cadmium in Human Diseases: It’s More than Just a Mere Metal. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 371–378, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12291-019-00839-8>>.

FECHNER, P.; DAMDIMOPOULOU, P.; GAUGLITZ, G. Biosensors paving the way to understanding the interaction between cadmium and the estrogen receptor alpha. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 6, p. 1215–1225, 2006.

FERNÁNDEZ-TORRES, J. et al. Impact of Cadmium Mediated by Tobacco Use in Musculoskeletal Diseases. **Biological Trace Element Research**, v. 200, n. 5, p. 2008–2015, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12011-021-02814-y>>.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FRÉRY, N. et al. Environmental exposure to cadmium and human birthweight. **Toxicology**, v. 79, n. 2, p. 109–118, 1993.

FRIBERG, LARS; KJELLSTROM, T. E. C. Environmental health criteria for cadmium - Environmental aspects. **Environmental Health Criteria**, n. 135, p. 1–

156, 1992.

FRIBERG. L.; PISCATOR. M.; NORDBERG. M.B. Cadmium In The Environment. **Ohi: C. R. C Press**, p. 248, 1974.

FRIBERG, L. et al. **Cadmium Heal. A Toxicol. Epidemiol. Apprais.** [S.l: s.n.], 1985.

FRIQUES, A. G. F. et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2015.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, v. 93, n. 1, p. 105–113, 2004.

GAO, Y. et al. Vascular relaxation response to hydrogen peroxide is impaired in hypertension. n. March, p. 143–149, 2004.

GAUDET, H. M. et al. Methylmercury promotes breast cancer cell proliferation. **Toxicology Reports**, v. 5, n. June 2017, p. 579–584, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.05.002>>.

GEARY, G. G. et al. Estrogen reduces mouse cerebral artery tone through endothelial NOS- and cyclooxygenase-dependent mechanisms. p. 511–519, 2000.

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

HAN, G. et al. Nongenomic, endothelium-independent effects of estrogen on human coronary smooth muscle are mediated by type I (neuronal) NOS and PI3-kinase-Akt signaling. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, p. 314–321, 2007.

HAN, S. et al. Serum cadmium is associated with hepatic steatosis and fibrosis: Korean national health and nutrition examination survey data IV-VII. **Medicine (United States)**, v. 101, n. 4, p. E28559, 2022.

Handbook on the toxicology of metals. [S.l: s.n.], 1981. v. 19.

HAYASHI, K. et al. Sex Differences in the Relationship Between Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphisms and Arterial Stiffness in Older Humans. p. 650–656, 2007.

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

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

HENGSTLER, J. G. et al. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 1, p. 63–73, 2003.

HENSON, MICHAEL C; CHEDRESE, J. P. Endocrine Disruption by Cadmium, a Common Environmental Toxicant with Paradoxical Effects on Reproduction. **Experimental biology and medicine**, v. 5, n. 3, p. 383–392, 2004.

HÖFER, N. et al. Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus. **Toxicology Letters**, v. 191, n. 2–3, p. 123–131, 2009.

HORIUCHI, M.; MOGI, M.; IWAI, M. The angiotensin II type 2 receptor in the brain. **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2010.

HU, Z. W. et al. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: Implications for the function of vascular smooth muscle cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 563–573, 2002.

JACKSON, W. F. NIH Public Access. v. 12, n. 1, p. 113–127, 2006.

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

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.

KIM, K. H.; YOUNG, B. D.; BENDER, J. R. Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1–2, p. 65–70, 2014.

KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; DIWAN, B. A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 215–220, 2009.

KNOFLACH, M. et al. Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. **Circulation Journal**, v. 75, n. 10, p. 2491–2495, 2011.

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

KUMAR, S.; SHARMA, A. Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. **Reviews on Environmental Health**, 2019.

KUNSCH, C.; MEDFORD, R. M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circulation Research**, v. 85, n. 8, p. 753–766, 1999.

LASSEGUE, B.; SAN MARTIN, A.; GRIENDLING, KATHY K, A. Oxidases in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 110, n. 10, p. 1364–1390, 2012.

LIEBERT, M. A. et al. Enhanced Oxidative Stress and Impaired Thioredoxin INTRODUCTION. v. 6, n. 1, 2004.

LINDSEY, S. H. et al. Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 1, p. 113–118, 2013.

LOBATO, N. S. et al. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: Role of NO and prostanoids. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 10, p. 808–816, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2010.02.006>>.

LOPES, P. das D. et al. COX/iNOS dependence for angiotensin-II-induced endothelial dysfunction. **Peptides**, v. 157, p. 170863, 1 nov. 2022.

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

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927–930, 1994.

MEHTA, P. K.; GRIENGLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. 82–97, 2007.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1583–1587, 2005.

MEYER, M. R.; HAAS, E.; BARTON, M. Gender differences of cardiovascular disease: New perspectives for estrogen receptor signaling. **Hypertension**, v. 47, n. 6, p. 1019–1026, 2006.

MILSTIEN, S.; KATUSIC, Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 681–684, 1999.

MITTAL, C. K.; HARRELL, W. B.; MEHTA, C. S. Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 149–150, n. 1, p. 263–265, 1995.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. SUPPL. 1, p. 193–201, 2006.

MOURA, F. et al. tese_5142_Tese Fernanda Moura Vargas Dias. 2011.

NAGARAJAN, S. et al. Nitric oxide protects endothelium from cadmium mediated leakiness. v. 37, n. 2008, p. 495–506, 2013.

NASCIMENTO, C. L. . EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ZINCO NA

REATIVIDADE VASCULAR EM AORTA DE RATOS EXPOSTOS AGUDAMENTE AO CÁDMIO. v. 1, n. 1, p. 1–49, 2022.

NASIADEK, M. et al. Subchronic Exposure to Cadmium Causes Persistent Changes in the Reproductive System in Female Wistar Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

NATHAN, C.; XIE, Q. wen. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 915–918, 1994.

NAZAREWICZ, R. R. et al. Nox2-Induced Production of Mitochondrial Superoxide. v. 20, n. 2, 2014.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. channels in arterial smooth muscle \ I. **American Journal of Physiology**, v. 268, n. 4, p. C799–C822, 1995.

NGUYEN DINH CAT, A. et al. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 10, p. 1110–1120, 2013.

NORDBERG, G. F. Cadmium and health in the 21st Century - Historical remarks and trends for the future. **BioMetals**, v. 17, n. 5, p. 485–489, 2004.

NOVELLA, S. et al. Estradiol, acting through estrogen receptor alpha, restores dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and nitric oxide production in oxLDL-treated human arterial endothelial cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 365, n. 1, p. 11–16, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.020>>.

NR 7. NR 7 - PROGRAMA DE CONTROLE MÉDICO DE SAÚDE OCUPACIONAL - PCMSO. p. 40, 2022.

NUNES, D. O. et al. Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2014.

ODENLUND, M.; EKBLAD, E.; NILSSON, B. O. Stimulation of oestrogen receptor-expressing endothelial cells with oestrogen reduces proliferation of cocultured vascular smooth muscle cells. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 3, p. 245–248, 2008.

OHNAKA, K. et al. Induction of Cyclooxygenase-2 by Angiotensin II in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 68, 2000.

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, 2019.

ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender , sex hormones , and vascular tone. 2004.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes care**, v. 31 Suppl 2, 2008.

PECANHA, F. M. et al. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 29–36, 2010.

PÉREZ-CREMADES, D. et al. MiRNA as a new regulatory mechanism of estrogen vascular action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

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

ROSS, R.; SEROCK, M.; KHALIL, R. Experimental Benefits of Sex Hormones on Vascular Function and the Outcome of Hormone Therapy in Cardiovascular Disease. **Current Cardiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 309–322, 2008.

ROSSI, K. A.; JULGAMENTO, R. De; MESTRADO, D. D. De. Exposição por 7 dias ao Cádmiio promove aumento da pressão arterial e alteração da reatividade da aorta de ratos Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo Centro de Ciências da Saúde. 2022.

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

SALAZAR, G. NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. p. 1–21, 2018.

SANDOO, A. et al. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, n. 1, p. 302–312, 2015.

SANGARTIT, W. et al. Tetrahydrocurcumin protects against cadmium-induced hypertension, raised arterial stiffness and vascular remodeling in mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014.

SANTAMARIA-JUAREZ, C. et al. Aortic dysfunction by chronic cadmium exposure is linked to multiple metabolic risk factors that converge in anion superoxide production. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 128, n. 3, p. 748–756, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1726403>>.

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

_____. Dietary cadmium intake and its effects on kidneys. **Toxics**, v. 6, n. 1, p. 1–23, 2018.

SATARUG, S.; MOORE, M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1099–1103, 2004.

SATARUG, S.; VESEY, D. A.; GOBE, G. C. Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, n. June, p. 430–445, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.013>>.

SCHEREIDER, I. R. G.; VASSALLO, D. V.; SIMÕES, M. R. Chronic mercury exposure induces oxidative stress in female rats by endothelial nitric oxide synthase uncoupling and cyclooxygenase-2 activation, without affecting oestrogen receptor function. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 129, n. 6, p. 470–485, 2021.

SCOTT, S. R. et al. Cd isotope fractionation during tobacco combustion produces isotopic variation outside the range measured in dietary sources. **Science of the Total Environment**, v. 688, n. 2019, p. 600–608, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.269>>.

SHIVERICK, K. T.; SALAFIA, C. Cigarette smoking and pregnancy. I: Ovarian, uterine and placental effects. **Placenta**, v. 20, n. 4, p. 265–272, 1999.

SIEWIT, C. L. et al. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER α and c-Jun. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 5, p. 981–992, 2010.

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>>.

SOBRINO, A. et al. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 4, p. 237–246, 2010.

_____. Mas receptor is involved in the estrogen-receptor induced nitric oxide-dependent vasorelaxation. **Biochemical Pharmacology**, v. 129, p. 67–72, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.012>>.

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.

SRIPADA, K.; LAGER, A. M. Interventions to reduce cadmium exposure in low- and middle-income countries during pregnancy and childhood: A systematic review. **Journal of Global Health**, v. 12, 2022.

STOCKAND J, SULTAN A, MOLONY D, DUBOSE T, S. S. et al. **Interactions of Cadmium and Nickel with K Channels of Vascular Smooth Muscle**. . [S.l.: s.n.], 1993

STOICA, A.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; MARTIN, M. B. Activation of estrogen receptor- α by the heavy metal cadmium. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 4, p. 545–553, 2000.

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

TANG, X. D. et al. Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by

altering cysteine-mediated calcium sensing. v. 11, n. 2, p. 171–178, 2004.

TARAKINA, N. V.; VERBERCK, B. A portrait of cadmium. **Nature Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 96, 2016.

TEP-AREENAN, P.; KENDALL, D. A.; RANDALL, M. D. Mechanisms of vasorelaxation to 17 β -oestradiol in rat arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 476, n. 1–2, p. 139–149, 2003.

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

TINKOV, A. A. et al. Cadmium and atherosclerosis: A review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies. **Environmental Research**, v. 162, n. January, p. 240–260, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.008>>.

TOUYZ, R. M.; TABET, F.; SCHIFFRIN, E. L. Annual Scientific Meeting of ASCEPT 2002 REDOX-DEPENDENT SIGNALLING BY ANGIOTENSIN II AND VASCULAR REMODELLING IN HYPERTENSION. n. May, p. 860–866, 2003.

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

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

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction - The first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, v. 73, n. 4, p. 595–601, 2009.

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

VAZIRI, N. D.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of disease: Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, n. 10, p. 582–593, 2006.

WANG, H. et al. Characterization of the Cardiac Renin Angiotensin System in Oophorectomized and Estrogen-Replete mRen2.Lewis Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

WHO. EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. **WHO Technical Report Series**, p. 960, 2010.

World Health Organization. [S.l: s.n.], 1992. v. 1.

XIA, Z.; M. VANHOUTTE, P. Nitric Oxide and Protection against Cardiac Ischemia. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1774–1782, 2011.

YAMANO, T.; DECICCO, L. A.; RIKANS, L. E. Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male Fischer 344 rats: Role of kupffer cells and inflammatory cytokines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 68–75, 2000.

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

ZAFARI, A. M. et al. Angiotensin II – Induced Vascular Hypertrophy. **Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 488–495, 1998.

ZANG, Y.; ODWIN-DACOSTA, S.; YAGER, J. D. Effects of cadmium on estrogen receptor mediated signaling and estrogen induced DNA synthesis in T47D human breast cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 184, n. 2, p. 134–138, 2009.