

**Efeitos da exposição crônica ao cloreto de cádmio
sobre a reatividade vascular e pressão arterial de
ratos**

Camila Almenara Cruz Pereira

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

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

Vitória
2013

Efeitos da exposição crônica ao cloreto de cádmio sobre a reatividade vascular e pressão arterial de ratos

Camila Almenara Cruz Pereira

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

Aprovada em 29/05/2013 por:

Profª Drª Alessandra S. Padilha – Orientadora, UFES

Profª Drª Silvana dos Santos Meyrelles, UFES

Profª Drª Mirian Fiorese, UFES

Prof Dr Dalton Valentim Vassallo, UFES

Coordenador do PPGCF: Profª Drª Ivanita Stefanon

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 2013

Almenara, Camila 1988

Efeitos da exposição crônica ao cloreto de cádmio sobre a reatividade vascular e pressão arterial de ratos [Vitória] 2013

99pp, 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2013)

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

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

1. Cádmio 2. Aorta 3. Óxido Nítrico 4. Espécies Reativas de Oxigênio.

Aos meus maiores incentivadores. Meus pais, meus irmãos e Gilson.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me fornecer todo o necessário para que essa etapa fosse realizada.

À Prof^a. Dr^a. Alessandra por me aceitar como sua aluna. Obrigada por permitir e promover para que este projeto fosse concretizado.

Ao Prof. Dr. Dalton, pela disponibilidade e dedicação. Obrigada por compartilhar comigo seu conhecimento inestimável.

À Prof^a. Dr^a Ivanita e ao Prof Dr. Leonardo, pelas sugestões e observações científicas e pela companhia no laboratório.

Aos amigos do LEMC: Bruna Fernandes, Bruna Marquezini, Carol, Cindy, Daniele, David, Dieli, Edna, Emily, Fabiana Siman, Fabiana Simões, Karol, Larissa, Lorena, Maylla, Marito, Mirian, Priscila, Rogério, Sâmia, Tereza e Vinícius. Pela amizade, companhia e apoio emocional e intelectual.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, por compartilhar seus conhecimentos, pela dedicação ao programa e à formação de qualidade de seus alunos. Foi uma honra aprender com tantos gênios da Fisiologia, da Bioquímica e da Genética.

Aos colegas de outros laboratórios com quem tive o prazer de trabalhar e trocar informações. O aprendizado que obtive com vocês foi essencial para esta formação.

À Jhuli, por me apresentar ao laboratório, pela confiança e orientação.

À Jonaína, por me ensinar a técnica de reatividade vascular. Obrigada por me acolher e me explicar tudo tão pacientemente.

Ao Vinícius, pelas dosagens de metais e companhia nos experimentos.

À Thaís, pelo cuidado, dedicação, preocupação, interesse e confiança, mesmo de longe.

Aos meus irmãos, pelo impecável exemplo e constante estímulo. Obrigada pelo amor, companheirismo e apoio, em todas as horas.

Aos meus pais, pelo apoio em todas as minhas escolhas, mesmo quando não concordavam com elas. Obrigada por todo o suporte, carinho e admiração e por me dar confiança para realizar meus sonhos.

Ao Gilson, pela paciência, dedicação, apoio, carinho, incentivo e por participar ativamente deste projeto. Obrigada por sempre ajudar e me ouvir, sobre qualquer assunto que seja.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1.1	Contaminação Ambiental e Exposição.....	24
1.1.2	Cinética do Cádmio	26
1.1.3	Efeito do cádmio nos diferentes sistemas	27
1.1.4	Efeito do Cádmio no Sistema Cardiovascular	29
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1.	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	36
3.1.1	Modelo Experimental	36
3.1.1.1	Concentração sanguínea de cádmio	37
3.2	ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	37
3.3	METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA.....	37
3.3.1	Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)	39
3.3.2	Avaliação da integridade funcional do endotélio	40
3.4.	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	41
3.4.1	Efeito da exposição trinta dias com cloreto de cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	41
3.4.2	Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina	42
3.4.3	Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio	42
3.4.4	Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio	42

3.4.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta à fenilefrina na aorta.....	43
3.4.5.1 Influência da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a via do óxido nítrico.....	43
3.4.5.2 Envolvimento da Angiotensina II local sobre a exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.....	44
3.4.5.3 Envolvimento de radicais livres na exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica ..	44
3.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA.....	44
3.5.1 Western Blot para detecção da isoforma SOD Cu/Zn da superóxido dismutase e da isoforma NOX2 da NADPH oxidase em aorta de ratos.....	44
3.6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3.7 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS	47
4 RESULTADOS	50
4.1 CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO NO SANGUE.....	50
4.2 VALORES DE MASSA CORPORAL	50
4.3. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS).....	51
4.4 RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA.....	52
4.5 EFEITO DO TRATAMENTO POR TRINTA DIAS COM CLORETO DE CÁDMIO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.....	52

4.6 MODULAÇÃO ENDOTELIAL DO TRATAMENTO POR 30 DIAS COM CLORETO DE CÁDMIO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.	53
4.7 EFEITO DO TRATAMENTO POR TRINTA DIAS COM CLORETO DE CÁDMIO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.	55
4.8 EFEITO DO TRATAMENTO POR TRINTA DIAS COM CLORETO D CÁDMIO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.	56
4.9 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS COM CLORETO DE CÁDMIO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.	57
4.9.1 Participação da via do óxido nítrico na exposição por trinta dias com cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.	57
4.9.2 Participação de espécies reativas de oxigênio na exposição por trinta dias com cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.	59
4.9.3 Participação da angiotensina II na exposição por trinta dias com cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.	64
5 DISCUSSÃO.....	67
5.1. CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CÁDMIO.....	67
5.5 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA.....	73

5.5.1	Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a via do Óxido Nítrico	73
5.5.2	Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a via dos radicais livres	76
6	CONCLUSÃO	81
7	REFERÊNCIAS	82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Peso corporal (g) no início e ao término da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio..... 51
- Tabela 2:** Valores médios da Pressão Arterial Sistólica (PAS) dos animais dos grupos Controle e Cádmio durante quatro semanas de exposição..... 52
- Tabela 3:** Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD_2) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Cádmio..... 54
- Tabela 4:** Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis com (E^+) e sem endotélio (E^-) dos grupos Controle e Cádmio..... 55
- Tabela 5:** Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas de relaxamento induzidos pela acetilcolina em aorta de ratos dos grupos Controle e Cádmio..... 56
- Tabela 6:** Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas de relaxamento independente do endotélio induzidas pelo nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Cádmio..... 57
- Tabela 7:** Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Cádmio..... 59
- Tabela 8:** Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da enzima Superóxido Dismutase..... 61
- Tabela 9:** Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da enzima Catalase..... 62
- Tabela 10:** Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de apocinina..... 64
- Tabela 11:** Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de enalapril..... 66

Tabela 12: Sensibilidade (pD_2) e Resposta máxima (R_{max}) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de losartan..... 67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Angeli, 2009)..... 39
- Figura 2:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado de Dias, 2007)..... 40
- Figura 3:** 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 0.9 a 1,3 g); 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) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007)..... 42
- Figura 4:** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Angeli, 2009)..... 44
- Figura 5:** Análise dos valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de pletismografia de cauda em ratos dos grupos Controle e Cádmio, durante quatro semanas de exposição. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias), * $p < 0,05$ vs Controle, dia correspondente, # $p < 0,05$ vs Cádmio dia 0..... 52
- Figura 6:** Curvas concentração-resposta à fenilefrina de segmentos aórticos de ratos dos grupos Controle e Cádmio, após quatro semanas de exposição. Os números de

animais utilizados estão representados entre parênteses. Teste t-Student não pareado, * $p < 0.05$ vs Controle..... 53

Figura 7: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: (A) Controle (E^+) e após a retirada do endotélio (E^-); (B) Cádmio (E^+) e após a retirada do endotélio (E^-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado. # $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Controle E^+ vs Controle E^- ; * $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Cádmio E^+ vs Cádmio E^- ; e % dAUC: Controle vs Cádmio..... 55

Figura 8: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Cádmio. Os símbolos representam média \pm EPM expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Teste t-Student não-pareado. * $p < 0,05$ vs Controle..... 56

Figura 9: Curvas concentração-resposta ao Nitroprussiato de sódio para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Cádmio. Os símbolos representam os valores, expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t-Student não-pareado, $p < 0.05$ vs Controle..... 57

Figura 10: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de L-NAME. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado. * $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Controle vs Controle L-NAME; # $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Cádmio vs Cádmio L-NAME e % dAUC: Controle vs Cádmio..... 59

Figura 11: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da enzima superóxido dismutase (SOD) em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle e Cádmio. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os

símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado. * $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Cádmiu vs Cádmiu + SOD..... 60

Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da enzima catalase em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle e Cádmiu. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado. * $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Cádmiu vs Cádmiu + SOD.....62

Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de apocinina em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmiu (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de Apocinina. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado. # $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Controle vs Controle Apocinina; * $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Cádmiu vs Cádmiu Apocinina e % dAUC: Controle vs Cádmiu.....63

Figura 14: Resultados da expressão proteica da isoforma Cu/Zn da enzima superóxido dismutase (SOD1), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta abdominal dos grupos Controle (n= 7) e Cádmiu (n= 6). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a isoforma Cu/Zn citosólica da enzima superóxido dismutase (SOD Cu/Zn) e a alfa-actina. Os resultados estão expresos como média \pm EPM, como relação entre a densidade das bandas da SOD-Cu/Zn e da α actina. Teste t-Student não pareado, * $p < 0,05$ 64

Figura 15: Resultados da expressão proteica da subunidade gp91^{phox} da enzima NADPH oxidase, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta abdominal dos grupos Controle (n= 6) e Cádmiu (n= 5). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a subunidade da gp91^{phox} e a alfa-actina. Os resultados estão expresos como média \pm EPM, como relação entre a densidade das bandas da gp91^{phox} e da α actina. Teste t-Student não-pareado, * $p < 0,05$ vs Controle..... 65

Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de enalapril em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmiu (B). O

número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado..... 66

Figura 17: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de losartan em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmio (B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado..... 67

Figura 18: Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI₂), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca²⁺. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização. (modificado de Rattmann, 2009)..... 72

Figura 19: Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular. (modificado de Rattmann, 2009)..... 75

Figura 20: Células Endoteliais possuem pelo menos quatro isoformas funcionais da Nox: Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5. Subunidades regulatórias diferem entre as isoformas de Nox. O protótipo da nicotinamida adenina dinucleotíneo fosfato oxidase contendo gp9phox, Nox2, requer p22phox, p47phox, p67phox e p40phox para sua total ativação As outras Nox são reguladas por proteínas regulatórias específicas. De modo geral, moléculas sinalizadoras como PC, c-Src, PI3K, PLD e fosfolipase A2 levam a ativação das oxidases. Enquanto a ativação endotelial das Nox1, 2 e 5 pode induzir dano oxidativo e injúria celular, a Nox4 pode ter uma função protetora (Modificado de Touyz e Briones, 2011) 79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

1,4,5 – inositol trifosfato (IP₃)

3,5 – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

5'-trifosfato de adenosina (ATP)

Acetilcolina (ACh)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Agency for Research on Cancer (IARC)

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)

Ânion superóxido (O^{2•-})

Áreas abaixo da curva (AUC)

Bradicinina (BK)

Íon Cádmio (Cd²⁺)

Ciclooxigenase (COX)

Cloreto de potássio (KCl)

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES)

Diacilglicerol (DAG)

Diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC)

Endotélio íntegro (E⁺)

Endotélio removido mecanicamente (E⁻)

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Enzima fosfolipase A₂ (PLA₂)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Fenilefrina (FE)

Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

Flavina mononucleotídeo (FMN)

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

Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS)

Isoforma induzível da sintase de óxido nítrico (iNOS)

Isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico (nNOS)

Malondialdeído (MDA)

Músculo liso vascular (MLV)

Nitroprussiato de sódio (NPS).

Óxido nítrico (NO)

Pressão arterial (PA)

Pressão arterial sistólica (PAS)

Pressão arterial diastólica (PAD)

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂),

Peróxido de nitrito (ONOO⁻)

Prostaciclina (PGI₂)

Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Prostaciclina F_{2α} (PG F_{2α})

Prostaglandina H₂ (PGH₂)

Proteína quinase G (PKG)

Radical hidroxila (•OH)

Receptor de angiotensina do subtipo 1(AT₁)

Resposta máxima (R_{máx})

Sensibilidade (pD₂)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1)

Superóxido dismutase mitocondrial (Mn SOD; SOD2)

Superóxido dismutase extracelular (ECSOD; SOD3)

Tetrahydrobiopterina (BH₄)

The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)

Tromboxano (TXA₂)

RESUMO

Cádmio é um metal altamente tóxico presente em fertilizantes fosfatados, o que têm contribuído para a contaminação dos alimentos, mas principalmente das folhas de tabaco por esse metal, o que faz da fumaça de cigarro a principal forma de exposição não-ocupacional ao cádmio. Uma vez absorvido, o cádmio se acumula nos tecidos, levando a diversas desordens como diabetes melito, desmineralização óssea e câncer. Além disso, a exposição ao cádmio tem sido associada ao desenvolvimento de hipertensão, disfunção endotelial e aterosclerose, processo que ocorre principalmente na artéria aorta. Os mecanismos envolvidos nas alterações induzidas pelo cádmio sobre o sistema cardiovascular ainda não foram bem elucidadas. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição crônica a baixa concentração cloreto de cádmio sobre a pressão arterial e reatividade vascular de segmentos isolados de aorta torácica de ratos. Os animais receberam água destilada (grupo controle) ou solução de CdCl_2 100 mg/L (grupo Cádmio) durante trinta dias via água de beber. A pressão arterial sistólica dos animais foi aferida semanalmente por pletismografia de cauda. Ao final do tratamento, a concentração de cádmio no sangue dos animais foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica e a reatividade vascular de anéis de aorta a fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio foram avaliadas em anéis sem endotélio ou de endotélio íntegro na presença de L-NAME, apocinina, losartan, enalapril, superóxido dismutase (SOD) ou catalase. A concentração de cádmio dos animais expostos ao metal ($40.3 \pm 2.0 \mu\text{g/L}$) foram similares às encontradas em trabalhadores expostos. Foi observado aumento de PAS nos ratos expostos ao metal desde o sétimo dia de tratamento, e se manteve até a quarta semana de exposição. Foi observado aumento da resposta à fenilefrina em anéis provenientes de ratos expostos ao cádmio. Este aumento foi abolido pela incubação da SOD, bem como da catalase. A incubação da apocinina reduziu a resposta a fenilefrina em ambos os grupos, mas esta redução ocorreu em maior magnitude em ratos tratados com o metal. Corroborando este achado, a expressão da NOX2 estava aumentada também no grupo cádmio. Ainda, o bloqueio da produção de NO levou ao aumento reatividade à fenilefrina em ambos os grupos, mas este efeito foi observado em menor magnitude no grupo cádmio. Resultado semelhante foi

encontrado após a remoção do endotélio. Estes dados sugerem que o cádmio, em concentrações sanguíneas similares às encontradas na população exposta ocupacionalmente, é capaz de estimular a expressão da NOX2, contribuindo para o estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO. Esses achados sugerem que a exposição ao cádmio promove disfunção endotelial, que pode contribuir para inflamação, injúria vascular e desenvolvimento de aterosclerose.

Palavras-chave: Cádmio, Aorta, Espécies Reativas de Oxigênio, NO.

ABSTRACT

Cadmium is a highly toxic metal present in phosphate fertilizers, which have contributed to the cadmium contamination of food, but mostly of tobacco leaves, which makes the cigarette smoke the main source of non-occupational exposure to cadmium. Once absorbed, cadmium accumulates in the tissues, leading to many disorders such as diabetes, bone demineralization, and cancer. Furthermore, exposure to cadmium has been associated to the development of hypertension, endothelial dysfunction and atherosclerotic, process that occurs primarily in the aorta. The mechanisms involved in the changes induced by cadmium on the cardiovascular system have not been well elucidated. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of chronic exposure to low concentrations of cadmium chloride on blood pressure and vascular reactivity of isolated segments of rat thoracic aorta. The animals received distilled water (control group) or CdCl₂ solution 100 mg/L (group Cadmium) for thirty days via drinking water. Systolic blood pressure of the animals was measured weekly by tail plethysmography. At the end of treatment, the blood cadmium content was established, and the vascular reactivity of the isolated aorta to phenylephrine, acetylcholine and sodium nitroprusside was analyzed in the context of endothelium denudation and incubation with L-NAME, apocynin, losartan, enalapril, superoxide dismutase (SOD) or catalase. The cadmium blood concentration in exposed-animals ($40.3 \pm 2.0 \mu\text{g} / \text{L}$) were similar to those found in exposed workers. The rats exposed to cadmium showed an increase on systolic blood pressure since the seventh day of treatment to the fourth week. We observed an increased response to phenylephrine in rings from cadmium-rats. This increase was abolished by SOD or catalase incubation. Apocynin incubation reduced the phenylephrine response in both treatment groups, but its effect was greater in cadmium-treated rats, and NOX2 expression was greater in the cadmium group. Also, the block of NO production increased reactivity to phenylephrine in both groups, but this effect was minor on group cadmium. A similar result was found after removal of endothelium. These data suggest that cadmium in blood concentrations similar to those found in occupationally exposed

populations is able to stimulate NOX2 expression, contributing to oxidative stress and reducing NO bioavailability. Also, cadmium exposure seems to promote endothelial damage that might contribute to inflammation, vascular injury and the development of atherosclerosis.

Keywords: Cadmium, aorta, reactive oxygen species, NO.

1 INTRODUÇÃO

1.1. CÁDMIO

O cádmio é um metal cinza claro, dúctil e maleável, facilmente oxidado a óxido de cádmio, na presença de oxigênio. Foi descoberto em 1817, pelo professor de Química e Farmácia da Universidade de Gottinger, na Alemanha, Friedrich Stromeyer (Weeks e Leicester, 1968). Trata-se de um metal de transição, do grupo IIb, o mesmo ocupado pelo zinco e pelo mercúrio.

O cádmio, naturalmente encontrado como contaminante de outros metais, é obtido principalmente como coproduto da mineração, fundição e refinamento de zinco, chumbo e cobre. O uso do cádmio na produção de pigmentos, estabilizantes de PVC e na galvanização tem sido reduzido e, em alguns países foi até extinto, no entanto, na União Europeia, tais fins ainda representam uma grande porção do consumo total de cádmio (NCM, 2003). A produção de baterias níquel-cádmio vem ganhando grande espaço no mercado mundial contribuindo para cerca de 78 % do consumo total do metal (NCM, 2003).

1.1.1 Contaminação Ambiental e Exposição

As principais fontes naturais de emissão de cádmio para o ambiente são os vulcões e, com menor participação, o intemperismo das rochas. Em 1983, cerca de 140-1500 toneladas de cádmio foram lançadas para a atmosfera através de erupções vulcânicas (Nriagu, 1989). Para o mesmo ano, Nriagu e Pacyna (1988) estimaram a contaminação atmosférica por fontes antropogênicas em 7600 toneladas de cádmio. As principais fontes antropogênicas de contaminação ambiental pelo cádmio são: queima de combustíveis fósseis, produção de metais não-ferrosos, ferro e aço; produção de cimento e eliminação de resíduos por incineração ou despejo (Pacyna e Pacyna, 2001). As concentrações relatadas de

cádmio no sangue de trabalhadores expostos estão geralmente compreendidas entre 5 e 50 $\mu\text{g/L}$, mas exposições extremas tiveram como resultado os níveis de cádmio entre 100 e 300 $\mu\text{g/L}$ (Roels *et al.*, 1982; Hassler *et al.*, 1983).

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

Já em Itaguaí, Rio de Janeiro, em 1996, uma fábrica de zinco eletrolítico foi denunciada por despejar na região mais de 50 milhões de litros de água e lama contendo zinco e cádmio, contaminando os manguezais que abrigavam caranguejos, siris, ostras e mexilhões, consumidos pelas populações locais e da cidade do Rio de Janeiro (Gonçalves *et al.*, 1996).

Fertilizantes fosfatados apresentam cádmio em sua constituição e o crescente uso desses produtos em solos cultivados, levou ao aumento da incidência de intoxicação por cádmio na população não-exposta ocupacionalmente (WHO, 1992). Vegetais folhosos, sementes oleosas e folhas de tabaco acumulam altos níveis de cádmio do solo (WHO, 1992). Fumantes apresentam aproximadamente o triplo da concentração sanguínea de cádmio encontrada na população não-fumante (1.58 $\mu\text{g/L}$ para fumantes vs 0.47 $\mu\text{g/L}$ para não-fumantes), o que faz do fumo do tabaco, a principal forma de exposição não-ocupacional ao cádmio (ATSDR, 2008). Esse conteúdo de cádmio nos fumantes tem sido associado com o aumento do risco de hipertensão e doenças relacionadas (Afridi *et al.*, 2010).

No ambiente aquático, os moluscos filtradores são os principais acumuladores de metais, independente da poluição ambiental, mas águas contaminadas podem aumentar significativamente a concentração de metais nesses seres (Whyte *et al.*, 2009). O conteúdo de cádmio de ostras do oceano Pacífico chega a 13,5 mg/kg de

peso seco, enquanto que, a quantidade de cádmio observada nas ostras da costa da Nova Zelândia, é duas vezes maior, devido à contaminação dessa área (Copes *et al*, 2008).

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

O cádmio pode ser detectado em diversos tecidos, dependendo do tempo de exposição ao metal, mas os principais marcadores de exposição ao cádmio são as concentrações de cádmio na urina e no sangue total. A concentração de cádmio na urina de 24 horas é um marcador para a exposição de longo prazo (Nordberg *et al*, 2007). Já a concentração sanguínea de cádmio reflete exposição mais recente, decorrentes dos últimos meses (Nordberg *et al*, 2007) e tem como limite de tolerância biológica o valor de 5 µg/L de cádmio no sangue (ACGIH, 2007).

1.1.2 Cinética do Cádmio

Como já dito, o fumo do tabaco é a principal forma de exposição não-ocupacional ao cádmio. Mas isso não se deve somente ao fato de que as folhas de tabaco acumulam o cádmio do solo, já que as sementes oleosas, como semente de girassol, amendoim e linhaça, também apresentam propriedade acumuladora de cádmio, de maneira similar às folhas de tabaco. No entanto, em torno de 50% do cádmio inalado é absorvido, enquanto que a via oral permite a absorção de apenas 5% da dose do metal (WHO, 1992).

O cádmio não apresenta função essencial conhecida para os organismos, não tendo assim, mecanismos específicos para sua absorção, transporte e entrada nas células. Para tal, ele utiliza os mecanismos desenvolvidos para os metais essenciais, em especial o ferro, zinco, magnésio e cálcio, o transportador de metais divalentes 1 (DMT1). Assim, o estado nutricional do indivíduo, como seu conteúdo de ferro, irá influenciar na absorção intestinal do cádmio devido a competição do ferro e do

cádmio pelos carreadores. A dieta pobre em ferro aumenta a expressão do DMT1, que transporta ferro, mas também cádmio, o que aumenta a absorção de Cd^{2+} (Klaassen *et al*, 2009). Satarug e Moore (2004), em um estudo realizado com tailandeses, observaram que mulheres com depleção de ferro apresentavam conteúdo de cádmio 3 a 4 vezes maior que o observado em mulheres de mesma idade e com estoques normais de ferro.

Após absorvido, o Cd^{2+} se liga à metalotioneína (MT), uma proteína de baixo peso molecular, rica em cisteína, com grande afinidade por metais (Nordberg, 2004). A ligação a essa proteína impede as ações do cádmio sobre outras macromoléculas além de dificultar a excreção renal desse metal (Klaassen *et al*, 2009). Assim, quando o complexo MT- Cd^{2+} chega aos rins, é filtrado e reabsorvido pelas células dos túbulos proximais, onde a ligação desse complexo é quebrada, liberando o cádmio bivalente para a circulação. Quando o conteúdo de cádmio excede a capacidade de produção e ligação dessa proteína, a concentração de cádmio livre aumenta e passa a causar seus efeitos deletérios sobre diversos tecidos (Friberg *et al*, 1986).

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

1.1.3 Efeito do cádmio nos diferentes sistemas

A exposição ao cádmio tem sido relacionada a diversas desordens. A mais severa delas, mencionada anteriormente, é conhecida como doença de Itai-itai. Tal doença é causada pela exposição crônica ao cádmio em altas doses. Afeta principalmente mulheres e é caracterizada por impedimento da função tubular e glomerular, além de osteomalácia e osteoporose, que resulta em dor intensa e fraturas múltiplas de ossos (Inaba *et al*, 2005).

Em exposições a baixas doses, o cádmio tem sido relacionado ao impedimento da função tubular renal com perda da capacidade reabsortiva de nutrientes, vitaminas e minerais. Esses efeitos acabam influenciando no

funcionamento de outros órgãos, a exemplo dos ossos que, com a redução do cálcio sanguíneo, sofre desmineralização (WHO, 1992).

O cádmio também tem sido associado à diabetes melito. O Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) examinou 8.722 cidadãos norte-americanos com mais de 40 anos de idade. Seus dados revelaram uma associação significativa entre níveis elevados de cádmio urinário e o aumento nos níveis de glicemia em jejum (110-126 mg/dL). E mesmo restringindo as análises para pessoas sem evidência de lesão renal, para excluir o efeito da função tubular renal, a conclusão foi semelhante (Schwartz *et al.* 2003).

A exposição ocupacional a esse metal tem sido associada ao aparecimento de câncer em diversos tecidos, levando o cádmio a ser classificado como um carcinógeno humano pela International Agency for the Research on Cancer (IARC, 1993). Verougstraete e colaboradores (2003) revisaram vários estudos (Kazantzis *et al.* 1992.; Sorahan e Lancashire 1997; Järup *et al.* 1998; Sorahan e Waterhouse 1983) e combinaram os resultados estimando o risco de câncer de pulmão em trabalhadores expostos ou não ao cádmio. Nem todos os estudos apresentavam associação positiva entre o risco de câncer de pulmão e a exposição ao cádmio. A estimativa combinada desses estudos apresentou risco aumentado em 20% em trabalhadores expostos ao cádmio em comparação com aqueles que não estão expostos. Ainda, muitos estudos *in vitro* de exposição ao cádmio têm mostrado aumento do estresse oxidativo (Cuypers *et al.* 2010), atividade modificada de fatores de transcrição (Watkin *et al.* 2003), e inibição de reparação do DNA (Jin *et al.* 2003). Esses fatores levam ao aumento da mutagênese e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de câncer.

A exposição ao cádmio, por meio da fumaça de cigarro, também provocou efeitos maléficos em tecido pulmonar. Lampe e colaboradores (2008) observaram associação entre redução do volume expiratório forçado em um segundo e cádmio urinário aumentado em indivíduos fumantes. Os dados sugeriram que a doença pulmonar observada em fumantes pode ser mediada em parte pelo cádmio.

1.1.4 Efeito do Cádmio no Sistema Cardiovascular

Ainda no início do século XX, o cádmio foi relacionado a efeitos cardiovasculares, quando Alsberg e Schwartze (1919) relataram que a administração subcutânea de cádmio em ratos causou coloração púrpura nos testículos dos animais. Estudos posteriores mostraram que o cádmio produz esse efeito por meio da ruptura das junções entre as células endoteliais de capilares e vênulas testiculares, resultando em aumento da permeabilidade testicular, seguido de edema, hemorragia e necrose (Aoki e Hoffer, 1978; Fende e Niewenhuis, 1977).

Outros efeitos sobre o sistema cardiovascular também foram relatados. Kolluro e colaboradores (2006) mostraram que o cádmio pode inibir diretamente a migração de células endoteliais e formação do tubo, associando esses efeitos com produção reduzida de NO pelas células endoteliais.

A associação entre doença arterial periférica e concentração de cádmio no sangue e na urina foi observada. Navas-Acien e colaboradores (2004, 2005) utilizou o índice tornozelo-braquial para avaliar os indivíduos. Este método consiste na relação entre a pressão arterial sistólica dos tornozelos e a pressão arterial sistólica dos braços, sendo um método diagnóstico semiológico simples, que oferece informações por meio de exame físico para avaliação do risco cardiovascular e doença arterial obstrutiva periférica. Os dados coletados evidenciaram que o cádmio pode exercer fundamental contribuição para o desenvolvimento de doença arterial periférica. Nesse estudo o risco de doença arterial periférica em indivíduos do percentil de maior nível cádmio urinário foi 3.05, quando comparado com indivíduos do menor percentil.

A exposição ao cádmio também foi associada à aterosclerose em modelos animais de exposição. Knoflach e colaboradores (2011) estudaram histologicamente a aorta de camundongos Apo-E knowout expostos ao cádmio por doze semanas. Os resultados indicaram que o cádmio afeta a integridade das camadas de células endoteliais facilitando o influxo de componentes séricos pró-aterogênicos e o recrutamento de leucócitos. Em um estudo clínico, Houtman (1993) observou que pacientes com hipertensão apresentavam maiores concentrações de cádmio na urina e que populações de áreas contaminadas com o cádmio apresentavam maior incidência de aterosclerose. Já em coelhos, Subramanyam e colaboradores (1992)

observaram que exposições crônicas a baixas doses de cádmio levam à hipertensão e aterosclerose, sem disfunção renal.

Apesar dos avanços da medicina e da quantidade de drogas anti-hipertensivas disponíveis, a Hipertensão arterial afeta 30 % da população mundial, sendo que 95 % dos casos são caracterizadas como hipertensão primária, na qual não se encontra uma causa específica (Pimenta e Oparil, 2010). No Brasil, em 2007, 29,4 % dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares (VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial). Acredita-se que a hipertensão arterial seja acompanhada por mudanças na função das células endoteliais. Sendo assim, a disfunção endotelial parece contribuir para manutenção do aumento de resistência vascular, favorecendo o processo hipertensivo (Cannon III, 1998; Triggle *et al.*, 2003; Kolluru *et al.*, 2010).

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

Apesar da associação entre exposição ao cádmio e hipertensão ser inconsistente se tratando de humanos, a indução da hipertensão pela exposição ao

cádmio já foi observada em diversos modelos experimentais. Há relatos da indução de dano no túbulo renal proximal, retenção de sal e aumento do volume sanguíneo como possível causa da hipertensão induzida pelo cádmio (Satarug *et al*, 2005). Outros autores associam à depleção da glutathiona (Valko *et al*, 2005) levando ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica, como possíveis ações pró-hipertensivas induzidas pelo cádmio (Yiin *et al*, 1999). Hipóteses adicionais para o mecanismo de desenvolvimento de hipertensão após a exposição ao cádmio incluem interação com canais de Ca^{2+} (Balaraman *et al*, 1989), estimulação do sistema nervoso simpático (Fadloun e Leach, 1980), e redução da liberação de agentes vasodilatadores (Skozynska e Martynowicz, 2005).

Vários outros estudos sugerem o endotélio como o principal alvo da intoxicação pelo cádmio no sistema cardiovascular, levando ao desequilíbrio da biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras levando ao aumento do tônus vascular (Martinowics *et al*, 2004; Kolluru *et al*, 2006; Donpunha *et al*, 2011).

O endotélio é constituído por uma única camada de células epiteliais pavimentosas. Durante muito tempo se pensou que o endotélio servia apenas de barreira entre o sangue e a camada média do músculo liso vascular. Somente em 1977, foi relatada a primeira indicação de que o endotélio possuía fundamental importância no controle do tônus vascular, por meio da produção de substâncias vasoativas (Moncada *et al*, 1977). Atualmente, sabe-se que as células endoteliais sintetizam e liberam fatores que regulam a angiogênese, as respostas inflamatórias e o tônus vascular (Carvalho *et al*, 2001). É responsável também pela manutenção do balanço entre a promoção e a inibição da proliferação e migração das células do músculo liso vascular, além de prevenir a agregação plaquetária e a trombose (Félètou e Vanhoutte, 2009).

Os principais fatores relaxantes do endotélio são: óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Furchgott e Zawadski, 1980) e a prostaciclina (Moncada *et al*, 1977). Dentre os fatores contráteis, os principais são: a angiotensina II (Skeegs *et al*, 1954), endotelina-1 (ET-1) (Yanagisawa *et al*, 1988), ânion superóxido (Rubany e Vanhoutte, 1986) e derivados da via do ácido araquidônico, como o tromboxano (TXA_2) e as prostaglandinas H_2 e $\text{F}_{2\alpha}$ (PGH_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$) (Frolich e Fortermann, 1989).

Modificações da função endotelial induzidas pelo cádmio, já foram evidenciadas em diversos estudos. Yoopan e colaboradores (2008) observaram redução do relaxamento à acetilcolina em anéis de aorta provenientes de ratos expostos ao cádmio via água de beber (10 e 50 mg/L) durante três meses. A resposta ao nitroprussiato de sódio não foi alterada pela exposição ao metal, sugerindo o endotélio como alvo da ação do cádmio. Corroborando esses achados, os autores ainda observaram redução da expressão da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase, relacionando a redução do relaxamento à acetilcolina, à redução da produção de NO. O óxido nítrico é produzido nas células endoteliais a partir da oxidação da L-arginina, levando à formação de NO e L-citrulina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Palmer et al, 1987; Moncada et al, 1991). Este gás de difunde através das membranas e atua, por meio de diversos mecanismos, no músculo liso vascular subjacente, levando à hiperpolarização deste (Moncada et al, 1991; Cannon III, 1998). A redução da biodisponibilidade de NO é considerada um dos mais importantes fatores associados a doenças vasculares (Stroes et al, 1998; Kerr et al, 1999; Frostermann e Munzel, 2006). Um dos principais mecanismos envolvidos neste processo é o aumento de ânions superóxido, que reagem rapidamente com o NO, reduzindo a biodisponibilidade deste e levando à produção de peroxinitrito, um potente agente oxidante (Stroes et al, 1998; Frostermann e Munzel, 2006; Takaya et al, 2007).

Muitas funções do endotélio e do músculo liso vascular são afetadas pelas EROs. No endotélio vascular os radicais livres podem causar diminuição da biodisponibilidade de NO, apoptose, aumento da adesão de monócitos e angiogênese. Enquanto no MLV, os radicais livres podem promover crescimento celular, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e aumento do tônus muscular (Taniyama e Griendling, 2003). Todas estas características contribuem para injúria vascular, disfunção endotelial e conseqüentemente para a fisiopatologia da hipertensão arterial (Griendling e Ushio-Fukai, 1994; Kerr *et al.*, 1999; Cruzado *et al.*, 2005; Touyz e Schinffrin, 2004; 2008). O aumento de espécies reativas de oxigênio também já foi observado em modelos experimentais de exposição ao cádmio. Wolf e Baynes (2007) sugeriram que o cádmio induz estresse oxidativo através da depleção de enzimas antioxidantes e que o aumento do dano oxidativo provocado leva à severa disfunção endotelial. As espécies reativas de oxigênio podem oxidar diretamente diversas macromoléculas,

levando a danos na estrutura básica celular resultando em disfunção e morte celular (Bertin e Averbeck, 2006; Kitamura e Hiramatsu, 2010). Dentre as EROs, o O_2^- , $ONOO^-$ e OH^- são os mais instáveis e reativos, enquanto H_2O_2 é a mais estável (Taniyama e Griendling, 2003). A formação das EROs é mediada por algumas enzimas vasculares que incluem a NADPH oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, eNOS, isoenzimas da citocromo P450, lipooxigenase, ciclooxigenase, heme oxigenase e glicose oxidase (Cai e Harrison, 2000). A principal fonte de EROs no endotélio parece ser a NADPH oxidase. Estas enzimas utilizam o NADH ou NADPH como substratos (Cai, 2005; Hamilton *et al.*, 2002; Garrido e Griendling, 2009) e podem ser ativadas pela angiotensina II (Cai, 2005; Koh *et al.*, 2009).

A literatura carece de estudos que relacionem a influência da exposição ao cádmio sobre o sistema renina-angiotensina (SRA) agindo no sistema cardiovascular. No entanto, estudos de nosso laboratório têm associado a exposição a outros metais pesados com a ativação do SRA. Simões e colaboradores (2011) observaram ativação do SRA em ratos expostos por duas horas ao acetato de chumbo (320 mg/kg de peso corporal, iv), associando a hipertensão induzida pelo chumbo ao aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina. A avaliação da reatividade de anéis de aorta expostos ao gadolínio (3 μ M) por 45 minutos demonstrou aumento da participação do SRA nestes (Angeli *et al.*, 2011). Por fim, estudos de reatividade da artéria caudal demonstraram que a exposição por uma hora ao cloreto de mercúrio (6 nM) leva ao aumento da ativação do SRA local (Lemos *et al.*, 2012). A angiotensina II é um peptídeo produzido a partir do angiotensinogênio por meio da ação sequencial de várias enzimas. Essas reações ocorrem em vários tecidos como renal, cerebral, glândulas adrenais, ovários, músculo liso vascular e endotélio vascular (Krieger e Santos, 1998). A angiotensina II sintetizada no endotélio vascular age em receptores AT1 na membrana do músculo liso vascular, ativando vias mediadas por proteína G e tirosinas quinase. A via mediada pela proteína G ativa as fosfolipases C (PLC), A₂ (PLA₂), D (PLD) e as lipogêneses. A ativação da fosfolipase C (PLC), forma o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP₃), que levam à contração do músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1996; Touyz e Schiffrin, 2000; Garrido e Griendling, 2009). A ativação da PLA₂ leva a produção dos prostanóides derivados da via da COX, que participam do controle do tônus através de estímulos vasodilatadores (PGI₂ e PGE₂)

e vasoconstritores (TXA₂) (Griendling *et al.*, 1996; Touyz e Schiffrin, 2000; Beltrán *et al.*, 2009). A angiotensina II ativa também a PLD, promovendo a hidrólise da fosfatidilcolina em colina e ácido fosfatídico que é convertido em DAG, este estimula e PKC sustentando a contração do músculo liso (Touyz e Schiffrin, 2000). Quando a via das lipooxigenases é ativada ocorre formação de leucotrienos, que estão associados a respostas inflamatórias. Estas características mostram a importância da angiotensina II na manutenção da integridade estrutural e funcional da parede dos vasos e o papel que ela exerce em doenças cardiovasculares associadas com a contração do músculo liso vascular, como a hipertensão (Touyz e Schiffrin, 2000; Garrido e Griendling, 2009).

Como mencionado acima, o Cd²⁺ pode modificar a função endotelial e isso pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão arterial. Os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial e hipertensão induzidas pelo cádmio, especialmente em concentrações próximas às encontradas em indivíduos expostos ocupacionalmente, ainda não foram totalmente elucidados. A maioria dos estudos anteriores analisa os efeitos da exposição ao cádmio por períodos prolongados, de três meses ou mais, ou por períodos curtos com concentrações elevadas do metal. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de novos estudos para se compreender a toxicidade desse metal sobre os vasos sanguíneos, sua influência sobre a função endotelial e possível associação com desenvolvimento de hipertensão e aterosclerose, processo que ocorre em artérias de grande calibre como a aorta. Assim, o presente estudo procurou analisar a pressão arterial e a reatividade de anéis de aorta de ratos expostos a baixa concentração de cloreto de cádmio durante trinta dias.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição crônica a baixa concentração cloreto de cádmio sobre a pressão arterial e reatividade vascular de ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do cloreto de cádmio, durante trinta dias de exposição, sobre a pressão arterial sistólica de ratos acordados.

- Verificar a influência da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a reatividade à fenilefrina de anéis isolados de aorta torácica.

- Investigar se o cádmio altera a participação endotelial na resposta vascular à fenilefrina de anéis isolados de aorta.

- Averiguar a influência do cádmio sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio.

- Pesquisar se a exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio altera a participação do óxido nítrico, das espécies reativas de oxigênio e do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil à fenilefrina de segmentos de aorta torácica.

- Avaliar se a exposição por trinta dias ao cádmio modifica a expressão gênica da enzima superóxido dismutase (isoforma SOD-1) e da NADPH oxidase (isoforma NOX-2) em segmentos aórticos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com aproximadamente 10 semanas de idade, pesando entre 190 e 210 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Durante o tratamento, animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES- CEUA 027/2011).

3.1.1 Modelo Experimental

Os ratos foram classificados de forma aleatória em dois grupos experimentais: Controle e Cádmio. Aos animais do Grupo Controle, era disponibilizada água destilada para beber e aos animais do grupo Cádmio era disponibilizada solução de 100 mg/L cloreto de cádmio em água destilada. O uso da água destilada é fundamental no intuito de reduzir os efeitos que outros íons podem causar sobre os resultados. Cada grupo era alojado em gaiolas independentes, de forma que os animais do grupo controle não eram expostos à água e às excretas dos animais do grupo tratado com o metal.

3.1.1.1 Concentração sanguínea de cádmio

Ao final do tratamento, amostras heparinizadas, dos grupos Cádmio e Controle, foram medidas em duplicata por um espectrofotômetro de absorção atômica (modelo: AAS5 EA com forno de grafite, Carl Zeiss, Alemanha) no Centro de Ciências Exatas – Departamento de Química (Universidade Federal do Espírito Santo).

3.2 ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada de acordo com Grizzo *et al.* (2008). As medidas foram realizadas nos animais dos grupos Controle e Cádmio, antes do início da exposição e semanalmente até o final do tratamento, através de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Os animais foram previamente climatizados, durante três dias antes da mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. A média de três medidas, que não variassem mais que 4 mmHg, foi utilizada.

3.3 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Amental[®]) na dose de 50 mg/kg intraperitoneal e, em seguida, eutanaziados e exanguinados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em 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. Esta solução foi mantida com pH 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento (Figura 1).

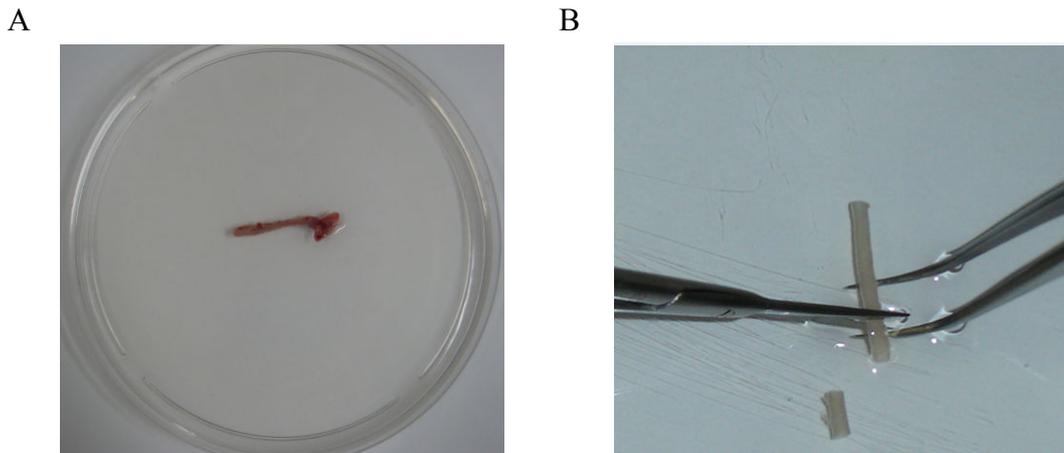


Figura 1: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Angeli, 2009).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que fiquem paralelos na 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 2).

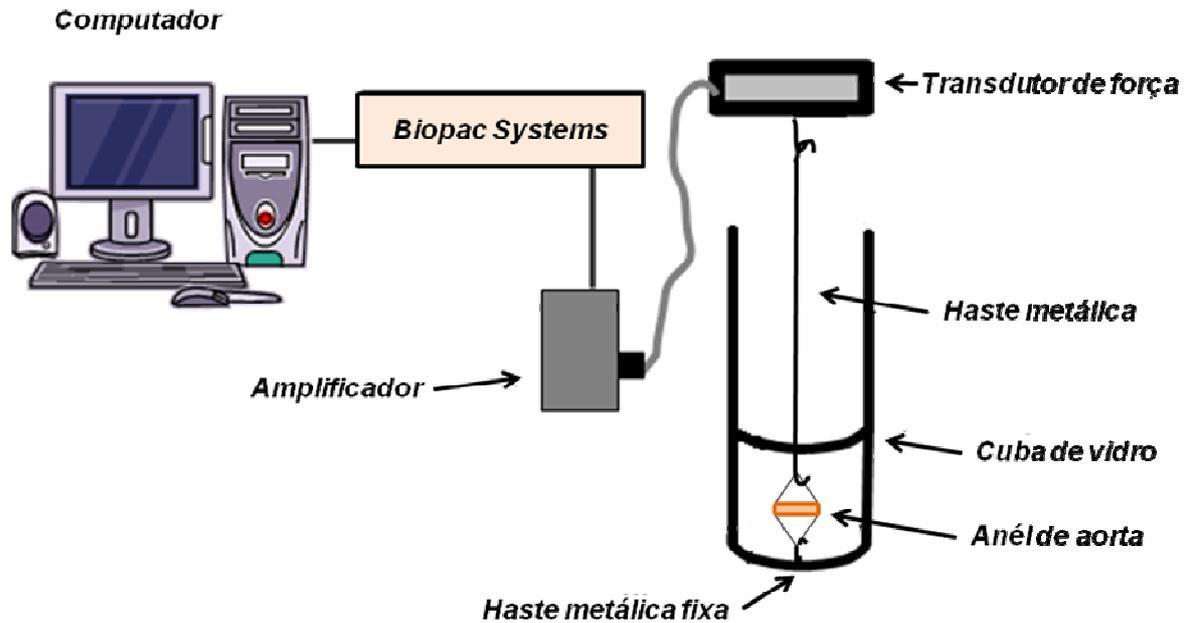


Figura 2: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado de Dias, 2007).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0.9 a 1.2 g, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura 3 A).

3.3.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 3 B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 3 D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 3 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (1.0

grama) e, após 30 minutos (Figura 6 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

3.3.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico, acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (10^{-5} M) foi aplicada (Figura 3 I, J, L). Sabendo que a exposição ao cádmio poderia influenciar a função endotelial e assim, alterar a reatividade dos anéis isolados de aorta à resposta relaxante induzida pela acetilcolina, não descartamos nenhum anel com endotélio supostamente intacto ou que não atingiu um valor similar aos animais controles (~90%). Os anéis que tiveram o endotélio removido mecanicamente relaxaram no máximo 10% ou até contraíram.

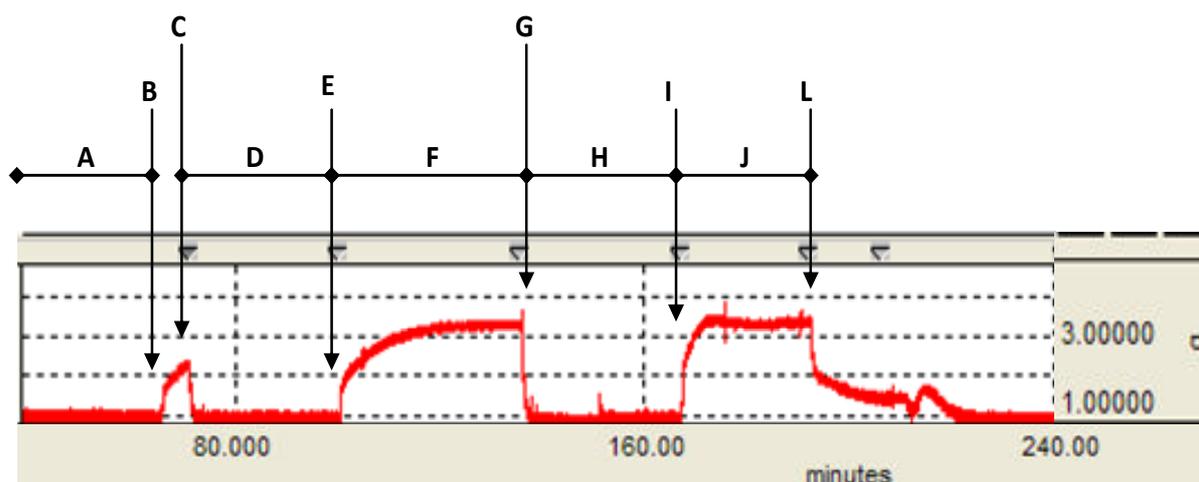


Figura 3: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição 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) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007).

3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Efeito da exposição trinta dias com cloreto de cádmio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse restabelecida. Após 30 minutos de estabilização e mais 30 minutos de incubação com fármacos, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

3.4.2 Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E^+) e sem endotélio (E^-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10^{-5} M induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina (10^{-7} M). A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M).

3.4.3 Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contráidos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10^{-11} a $3 \cdot 10^{-5}$ M).

3.4.4 Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contráidos com fenilefrina 10^{-6} M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta a esse agonista em concentrações de 10^{-11} a $3 \cdot 10^{-5}$ M.

3.4.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta à fenilefrina na aorta

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos (L-NAME, SOD, apocinina, catalase, enalapril e losartan), e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Figura 4).

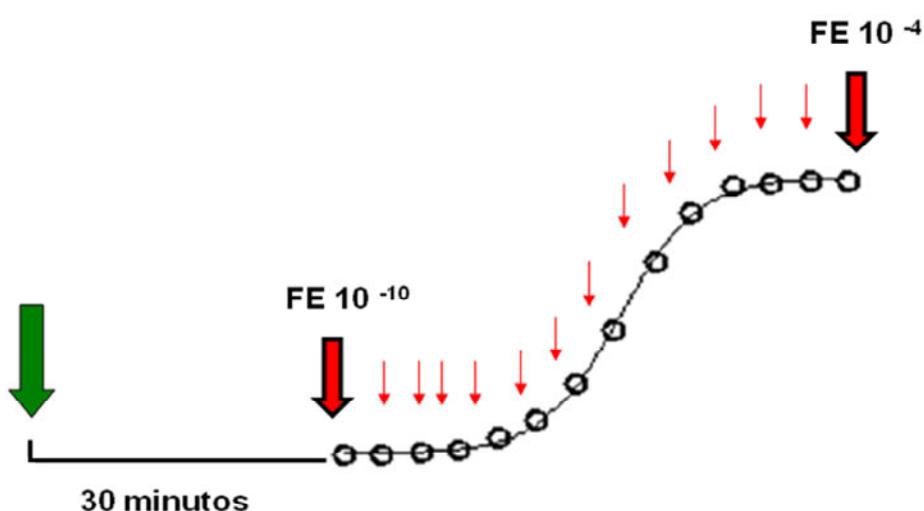


Figura 4: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Angeli, 2009).

3.4.5.1 Influência da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a via do óxido nítrico

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

3.4.5.2 Envolvimento da Angiotensina II local sobre a exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Buscando averiguar uma possível participação da via da angiotensina II local na reatividade vascular à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de anéis aórticos provenientes de ratos expostos ao cádmio, foi utilizado o enalapril ($10 \mu\text{M}$), um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA).

Em seguida, mediante outro protocolo, foi avaliada a participação da ativação dos receptores AT_1 pela angiotensina II através do bloqueio farmacológico destes receptores com o losartan ($10 \mu\text{M}$).

3.4.5.3 Envolvimento de radicais livres na exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Para verificar o envolvimento de EROs resposta contrátil à fenilefrina de anéis expostos ao metal, foram utilizadas: a apocinina ($100 \mu\text{M}$), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, ou seja, inibe uma das principais enzimas formadoras de radicais livres; a superóxido dismutase (SOD, 150 U/ml), é um importante anti-oxidante fisiológico que converte ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2); e a catalase (1000 U/ml), um “varredor” de H_2O_2 .

3.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA

3.5.1 Western Blot para detecção da isoforma SOD Cu/Zn da superóxido dismutase e da isoforma NOX2 da NADPH oxidase em aorta de ratos

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da exposição por trinta dias ao cádmio sobre a expressão protéica da isoforma SOD

Cu/Zn, e da subunidade gp91^{phox} (NOX2) em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Cádmio. A expressão protéica de todas as proteínas foi realizada em condições basais (segmentos retirados logo depois do animal ser sacrificado).

Os anéis da aorta eram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C até o momento em que foram utilizados. Os segmentos arteriais foram homogeneizados com homogeneizador de vidro contendo uma solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH:7,4, em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras eram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos , 6.000 rpm a 4°C e, em seguida, o sobrenadante era retirado e feita então a quantificação protéica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 80 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%).

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para 1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPacTM HC, BioRad, Singapura) a 4 °C. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, foi realizado o método de transferência líquida na qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche em suporte Holder Cassete e acoplados á uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 190mM, SDS 0.1% e Metanol 20%) à 8° C com uma corrente de 60 V por 2 horas.

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas eram incubadas

durante toda a noite à 4 °C, sob agitação, em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para SOD Cu/Zn (1: 1:1000, Sigma, Aldrich, Germany), subunidade da NADPH oxidase (gp91^{phox}, 1:1000; Transduction Laboratories, Lexington, UK) e α -actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA).

Depois disto, as membranas eram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 30 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (1:5000, StressGen, Victoria, Canada).

As proteínas correspondentes SOD Cu/Zn, gp91^{phox} e α -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ELC Plus, AmershamTM GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas eram colocadas em contato com filme fotográfico (Hyperfilm, AmershamTM, UK), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas.

A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isto, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram escaneadas e analisados com o software Image J.

3.6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

As respostas contráteis ao KCl foram expressas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressas em porcentagem. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, induzidas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em

porcentagem de relaxamento em relação à pré-contracção obtida pela fenilefrina (10^{-6} M).

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e pD_2 ($-\log EC_{50}$, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente.

Os resultados da expressão protéica da SOD Cu/Zn e gp91^{phox} estão expressos como relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação à α -actina.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado, análise de variância (ANOVA), de duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando ANOVA apresentava significância estatística era realizado o *pos-hoc* de Bonferroni utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

3.7 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Cloreto de cádmio
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para alfa-actina (Sigma)

- Anticorpo produzido em camundongo para gp91^{phox} (Transduction Laboratories)
- Anticorpo produzido em camundongo para SOD Cu/Zn (Sigma)
- Anticorpo para camundongo conjugado com peroxidase (StressGen)
- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Catalase (Sigma)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Enalapril (Sigma)
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- N²-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
- Superóxido dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)

- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- Tiopental sódico (Amental[®])
- Tris HCl (Sigma)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C.

4 RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO NO SANGUE

A determinação da concentração sanguínea de cádmio no sangue total de ratos dos grupos Controle e Cádmio foi realizada após 30 dias de exposição. O grupo Cádmio apresentou $40.3 \mu\text{g/L} \pm 2.0 \mu\text{g/L}$ ($n= 11$) de cádmio sanguíneo, enquanto os animais do grupo Controle ($n= 11$) apresentaram concentrações menores que o limite de detecção do método ($\text{LD}= 0.9 \mu\text{g/L}$).

4.2 VALORES DE MASSA CORPORAL

Os animais dos grupos Controle e Cádmio apresentaram peso semelhante no início da exposição. Já ao final dos trinta dias de exposição, os animais do grupo Cádmio apresentaram menor peso corporal, sugerindo que o cádmio reduziu o ganho de peso dos animais durante a exposição (Tabela 1).

Tabela 2: Peso corporal (g) no início e ao término da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio.

	Peso Corporal (g)	
	Inicial	Final
Controle (19)	196 ± 5	334 ± 9
Cádmio (12)	197 ± 5	$294 \pm 7^*$

Valores expressos em média e EPM; Teste t-Student, * $p < 0.05$ vs Controle peso final.

4.3. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

Nos animais dos grupos Controle e Cádmio, a PAS foi avaliada semanalmente a partir do tempo 0 (antes de iniciar o tratamento) até o final dos trinta dias de tratamento. No tempo 0, os animais apresentavam valores pressóricos semelhantes. Já ao final da primeira semana de exposição foi observado aumento dos valores pressóricos no grupo Cádmio. Esta elevação mostrou-se progressiva até o final da exposição ao metal (Figura 5), chegando a valores próximos a 140 mmHg (Tabela 2).

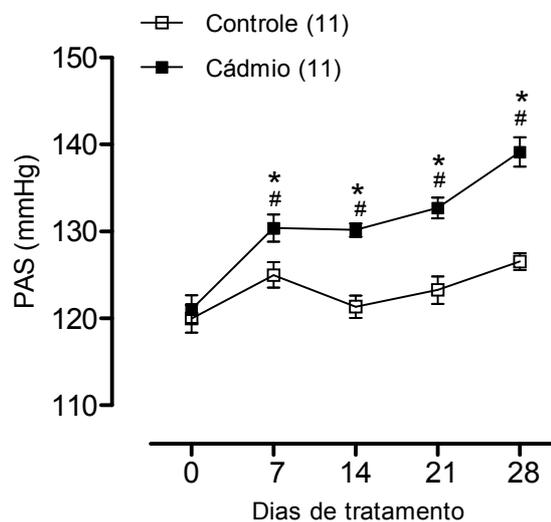


Figura 5: Análise dos valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Controle e Cádmio, durante quatro semanas de exposição. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (duas vias), * $p < 0,05$ vs Controle, dia correspondente, # $p < 0,05$ vs Cádmio dia 0.

Tabela 2: Valores médios da Pressão Arterial Sistólica (PAS) dos animais dos grupos Controle e Cádmio durante quatro semanas de exposição.

	PAS (mmHg)				
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
Controle	120 \pm 2	125 \pm 1	121 \pm 1	123 \pm 2	126 \pm 1
Cádmio	121 \pm 2	131 \pm 2*#	131 \pm 1*#	133 \pm 1*#	139 \pm 2*#

Valores expressos em média e EPM; ANOVA 2 vias e pós-teste Bonferroni * $p < 0.05$ vs Controle dia correspondente, # $p < 0.05$ vs Cádmio dia 0. N= 11 , para cada grupo.

4.4 RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA

A exposição dos segmentos arteriais ao KCl (75 mM) promoveu resposta contrátil de semelhante magnitude em ambos os grupos experimentais (Controle: $2,44 \pm 0,14$ g; vs Cádmio $2,26 \pm 0,12$ g; $n=29$, teste t-Student não pareado).

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO POR TRINTA DIAS COM CLORETO DE CÁDMIO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.

A fenilefrina (agonista α - adrenérgico) produziu contração concentração-dependente nos segmentos aórticos de ambos os grupos (Figura 6). No entanto, a resposta máxima à fenilefrina no grupo Cádmio foi maior que a desenvolvida pelos anéis do grupo Controle (Tabela 3). Já a sensibilidade, avaliada por pD_2 , foi semelhante nos dois grupos (Tabela 3).

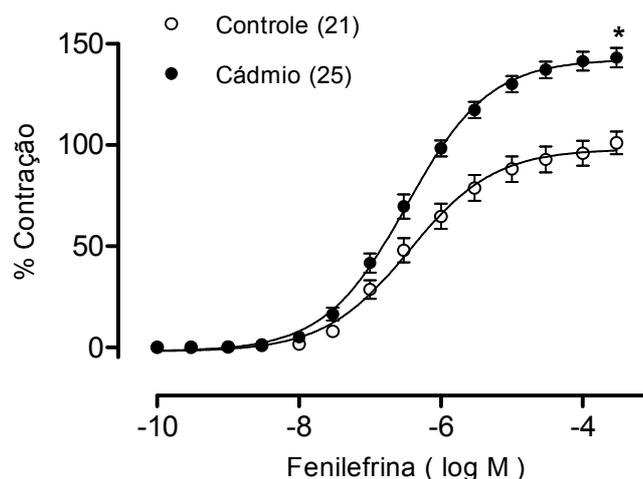


Figura 6: Curvas concentração-resposta à fenilefrina de segmentos aórticos de ratos dos grupos Controle e Cádmio, após quatro semanas de exposição. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. Teste t-Student não pareado, * $p < 0,05$ vs Controle.

Tabela 3: Resposta máxima (Rmax) e Sensibilidade (pD_2) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Cádmio.

	Rmax (%)	pD_2
Controle (21)	102 ± 6	6.30 ± 0.16
Cádmio (25)	142 ± 5*	6.52 ± 0.80

Os Valores estão expressos em média e EPM. Os números de animais utilizados estão expressos entre parênteses. Teste t-Student não pareado, * $p < 0.05$ vs Controle.

4.6 MODULAÇÃO ENDOTELIAL DO TRATAMENTO POR 30 DIAS COM CLORETO DE CÁDMIO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS.

A remoção mecânica do endotélio em anéis dos grupos Controle (Figura 7 A) e Cádmio (Figura 7 B) aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos, aumentando a resposta máxima tanto do grupo Controle quanto do grupo Cádmio. Já a sensibilidade só foi aumentada pela remoção do endotélio no grupo Controle (Tabela 4).

A análise da diferença percentual abaixo da curva (% dAUC) mostrou que a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina em ratos tratados por trinta dias com cloreto de cádmio é significativamente menor quando comparados ao grupo Controle (% dAUC: Controle= 161 ± 27 % vs Cádmio= 46 ± 18 %, teste t-Student não-pareado, $p < 0.05$) (Figura 10 C).

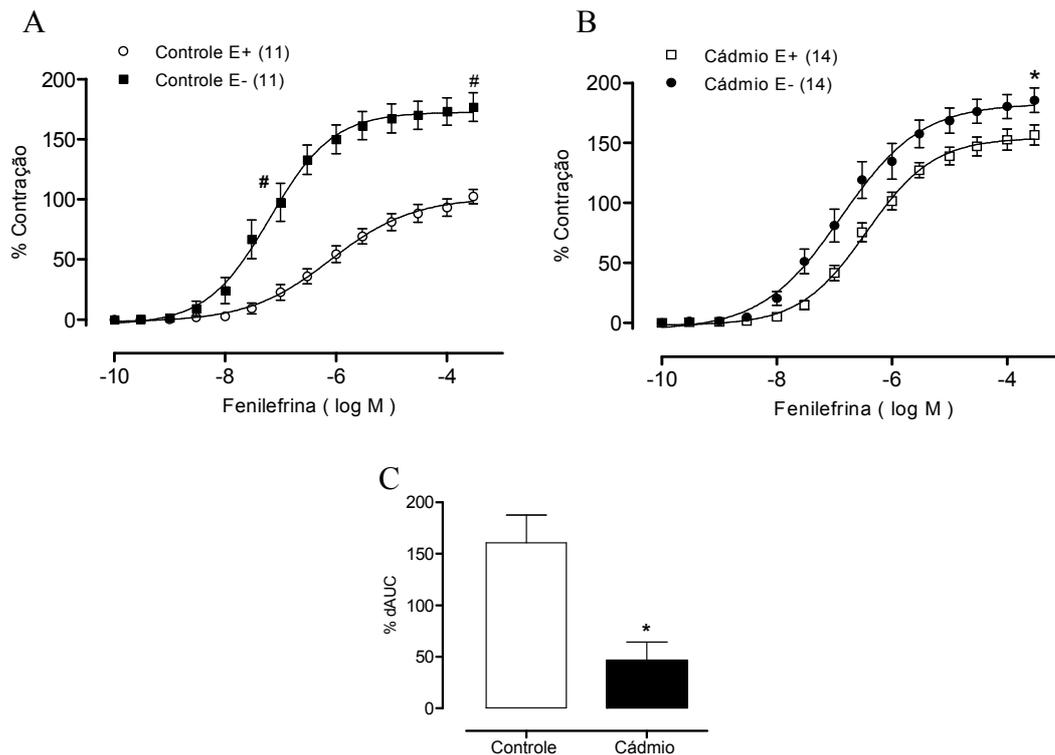


Figura 7: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: (A) Controle (E^+) e após a retirada do endotélio (E^-); (B) Cádmio (E^+) e após a retirada do endotélio (E^-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado. # $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Controle E^+ vs Controle E^- ; * $p < 0,05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$: Cádmio E^+ vs Cádmio E^- ; e % dAUC: Controle vs Cádmio.

Tabela 4: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis com (E^+) e sem endotélio (E^-) dos grupos Controle e Cádmio.

	$R_{m\acute{a}x}\%$	pD_2
Controle E+ (11)	102 ± 6	6.30 ± 0.16
Controle E- (11)	$177 \pm 12^{\#}$	$7.20 \pm 0.13^{\#}$
Cádmio E+ (14)	142 ± 5	6.52 ± 0.80
Cádmio E- (14)	$186 \pm 10^*$	6.84 ± 0.19

Os valores estão expressos como média e EPM. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. Teste T-Student não pareado, # $p < 0.05$ para $R_{m\acute{a}x}$ de vs Controle E^+ , * $p < 0.05$ vs para $R_{m\acute{a}x}$ de Cádmio E^+ .

4.7 EFEITO DO TRATAMENTO POR TRINTA DIAS COM CLORETO DE CÁDMIO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta à ACh. Ambos os grupos apresentaram relaxamento durante a curva de acetilcolina (Figura 8), com semelhante sensibilidade (Tabela 5). No entanto, o grupo Cádmio apresentou resposta máxima reduzida em relação ao grupo Controle (Tabela 5).

Tabela 5: Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) das curvas de relaxamento induzidos pela acetilcolina em aorta de ratos dos grupos Controle e Cádmio.

	R_{max} (%)	pD_2
Controle (12)	93 ± 4	7.00 ± 0.29
Cádmio (12)	$74 \pm 6^*$	6.87 ± 0.19

Os valores estão expressos como média e EPM do percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. Teste T-Student não pareado, * $p < 0.05$ para R_{max} vs Controle.

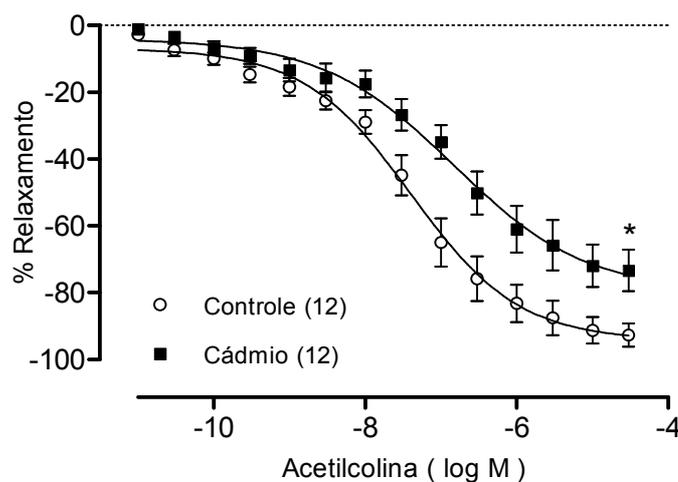


Figura 8: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos Controle e Cádmio. Os símbolos representam média \pm EPM expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Teste t-Student não-pareado para comparação de R_{max} e pD_2 . * $p < 0,05$ para R_{max} vs Controle.

4.8 EFEITO DO TRATAMENTO POR TRINTA DIAS COM CLORETO D CÁDMIO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado por meio da curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio, um doador de óxido nítrico, em anéis pré-contraídos com fenilefrina. O nitroprussiato de sódio induziu o relaxamento dos anéis isolados de aorta em ambos os grupos (Figura 9). Não foi observada diferença estatística entre os grupos Controle e Cádmio em relação à sensibilidade (pD_2) ou à resposta máxima (R_{max}) (Tabela 6).

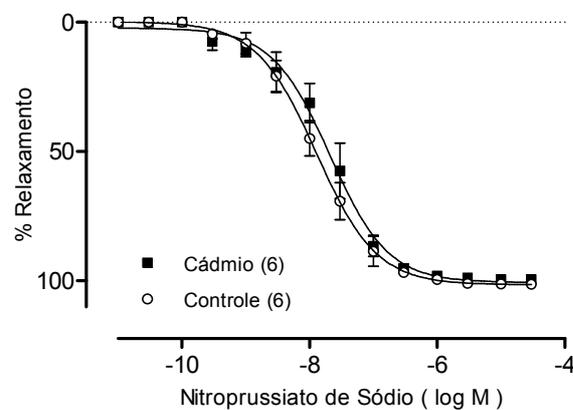


Figura 9: Curvas concentração-resposta ao Nitroprussiato de sódio para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar dos grupos: Controle e Cádmio. Os símbolos representam os valores, expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t-Student não-pareado, $p < 0.05$ vs Controle.

Tabela 6: Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) das curvas de relaxamento independente do endotélio induzidas pelo nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Cádmio.

	R_{max} (%)	pD_2
Controle	103 ± 1	8.06 ± 0.21
Cádmio	104 ± 2	7.63 ± 0.14

Os valores estão expressos como média e EPM do percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Os números de animais utilizados para cada grupo foi de seis animais. Teste T-Student não pareado para comparação entre R_{max} e pD_2 . $p > 0.05$ para R_{max} e pD_2 vs Controle.

4.9 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS COM CLORETO DE CÁDMIO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que a exposição ao cádmio induz um aumento da resposta máxima à fenilefrina. A remoção do endotélio aumentou a reatividade em ambos os grupos, mas esse aumento ocorreu em menor magnitude no grupo Cádmio, indicando que o tratamento com cádmio levou à redução da função endotelial. Para verificar a influência dos fatores endoteliais na resposta à fenilefrina, investigamos algumas vias de agentes vasoativos derivados do endotélio.

4.9.1 Participação da via do óxido nítrico na exposição por trinta dias com cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Para avaliar a participação do óxido nítrico, utilizamos o inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase, L-NAME (100 μ M). A adição desse inibidor aos anéis isolados de aorta provocou aumento da reatividade à fenilefrina em ambos os grupos (Tabela 7, Figuras 10A e 10B). Para melhor análise do resultado, foi calculada a diferença percentual das áreas abaixo das curvas (% dAUC) (Figura 10C). Foi evidenciado então que o aumento da reatividade à fenilefrina provocado pelo L-NAME ocorreu em menor magnitude no grupo Cádmio (%dAUC Controle: 88 ± 14 % vs Cádmio 44 ± 10 %, teste t-Student não-pareado, $p < 0.05$). Este resultado sugere uma redução da biodisponibilidade de óxido nítrico nos anéis isolados de aorta de ratos do grupo exposto ao metal.

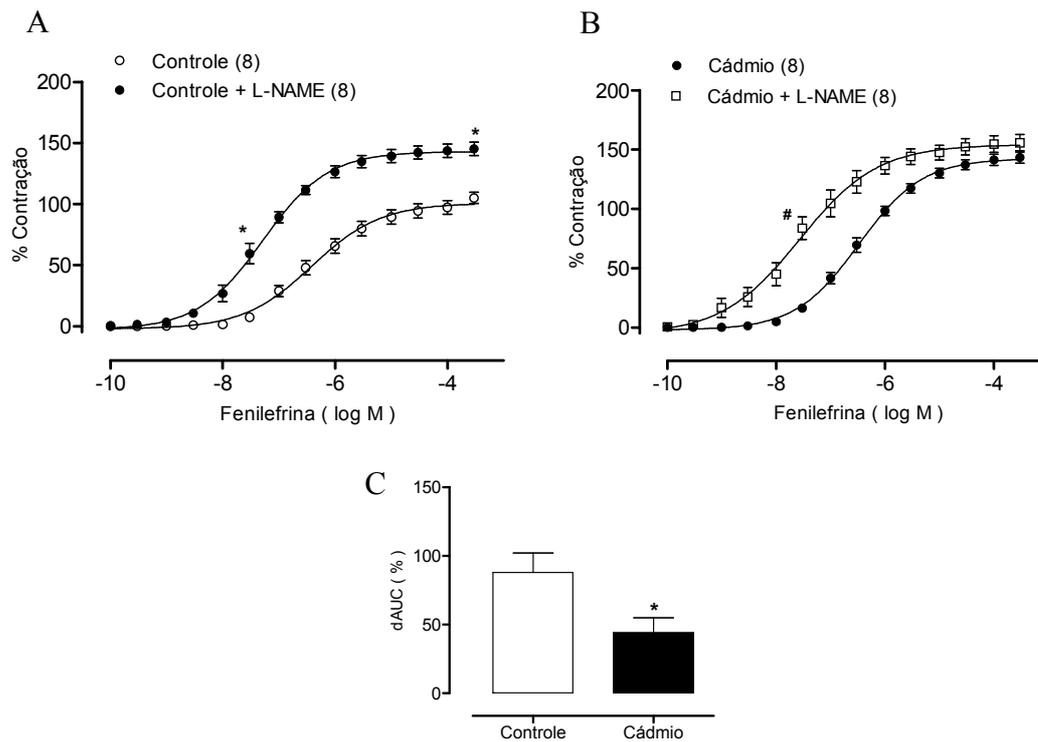


Figura 10: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de L-NAME. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado para comparação de R_{max} e pD_2 . * $p < 0,05$ para pD_2 e R_{max} : Controle vs Controle L-NAME; # $p < 0,05$ para pD_2 e R_{max} : Cádmio vs Cádmio L-NAME e % dAUC: Controle vs Cádmio.

Tabela 7: Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Cádmio.

	R_{max} (%)	pD_2
Controle	102 \pm 5	6.30 \pm 0.16
Controle L-NAME	145 \pm 5 [#]	7.31 \pm 0.13 [#]
Cádmio	142 \pm 5	6.52 \pm 0.80
Cádmio L-NAME	156 \pm 7	7.65 \pm 0.26 [*]

Os valores estão expressos como média e EPM. Foram utilizados oito animais por grupo. Teste T-Student não pareado para comparação de R_{max} e pD_2 , # $p < 0.05$ para R_{max} vs e pD_2 Controle. * $p < 0.05$ para pD_2 vs Cádmio.

4.9.2 Participação de espécies reativas de oxigênio na exposição por trinta dias com cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Sabe-se que a biodisponibilidade de óxido nítrico pode ser reduzida por espécies reativas de oxigênio, aumentando assim a contração vascular. Diante disso, investigamos a influência das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil à fenilefrina em ratos expostos ao cádmio. A exposição dos anéis de aorta à enzima superóxido dismutase (SOD, 150 U/ml) não modificou a reatividade à fenilefrina em anéis do grupo Controle. Já no grupo Cádmio, a remoção enzimática do ânion superóxido reduziu a resposta máxima aos valores observados no grupo Controle (Figura 11, Tabela 8).

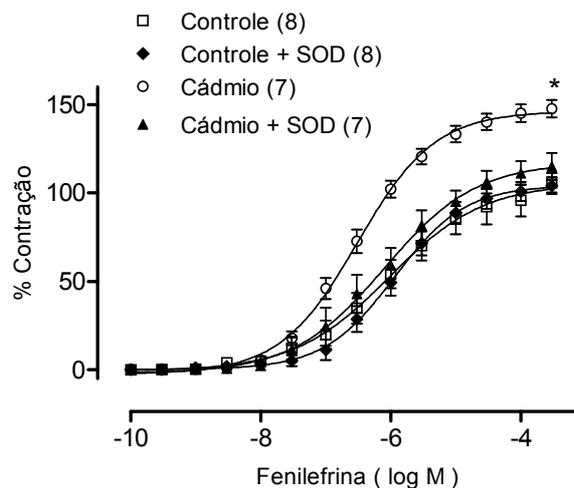


Figura 11: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da enzima superóxido dismutase (SOD) em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle e Cádmio. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado para comparação de pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$. * $p < 0,05$ para $R_{m\acute{a}x}$: Cádmio vs Cádmio + SOD.

Tabela 8: Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da enzima Superóxido Dismutase.

	Rmax (%)	pD_2
Controle (8)	102 ± 5	6.30 ± 0.16
Controle SOD (8)	104 ± 5	5.95 ± 0.18
Cádmio (7)	142 ± 5	6.52 ± 0.80
Cádmio SOD (7)	115 ± 8*	6.18 ± 0.28

Os valores estão expressos como média e EPM. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. Teste T-Student não pareado para comparação de Rmax e pD_2 Controle vs Controle + SOD; Cádmio vs Cádmio + SOD, * $p < 0.05$ para Rmax vs Cádmio. SOD: superóxido dismutase.

Sabemos que o peróxido de hidrogênio pode apresentar uma ação vasoconstritora, além de influenciar em outras vias de agentes vasoativos. Investigamos, então, a participação do peróxido de hidrogênio na reatividade à fenilefrina de aorta de ratos tratados com cádmio. Para tal, aos anéis de aorta foi adicionada a enzima catalase (1000 U/ml), que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio formando oxigênio e água. A adição da catalase não modificou a resposta contrátil à fenilefrina de anéis provenientes de ratos do grupo Controle. No entanto, a remoção catalítica do peróxido de hidrogênio reduziu significativamente a resposta máxima à fenilefrina em anéis do grupo Cádmio, alcançando valores observados em anéis do grupo Controle (Figura 12, Tabela 9).

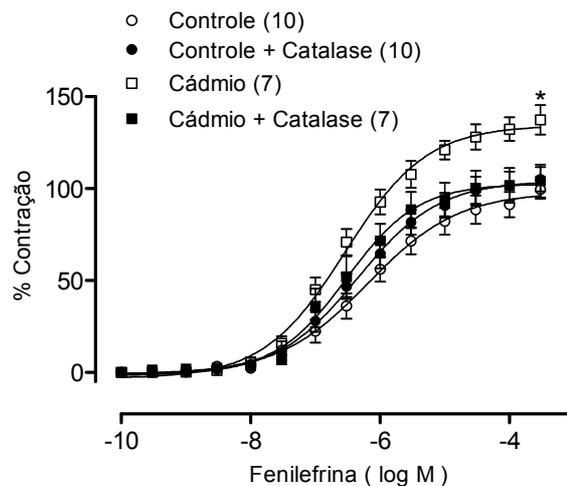


Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da enzima catalase em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle e Cádmio. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado para comparação de Rmax e pD₂ Controle vs Controle + Catalase; Cádmio vs Cádmio + Catalase. *p < 0,05 para Rmáx: Cádmio vs Cádmio + Catalase.

Tabela 9: Sensibilidade (pD₂) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não da enzima Catalase.

	Rmax (%)	pD ₂
Controle (10)	102 \pm 5	6.30 \pm 0.16
Controle + Catalase (10)	105 \pm 7	6.34 \pm 0.13
Cádmio (7)	142 \pm 5	6.52 \pm 0.80
Cádmio + Catalase (7)	104 \pm 9*	6.51 \pm 0.15

Os valores estão expressos como média e EPM. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. Teste T-Student não pareado para comparação de Rmax e pD₂ Controle vs Controle + Catalase; Cádmio vs Cádmio + Catalase, *p < 0.05 vs Cádmio.

A NADPH oxidase é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio do organismo. Para analisar a influência da NADPH oxidase na resposta contrátil à fenilefrina em ratos expostos ao cádmio, utilizamos a apocinina (0,3 μ M), um inibidor não-seletivo da NADPH oxidase. A apocinina não alterou a pD₂ das curvas de

fenilefrina dos grupos, mas reduziu a resposta máxima em ambos os grupos experimentais (Tabela 10, Figura 13A e B). Para melhor visualização, calculamos a porcentagem da diferença da área abaixo das curvas dos gráficos (% dAUC Controle: 17 ± 5 % vs Cádmio: 39 ± 4 %, teste t-Student não-pareado, $p < 0.05$) (Figura 13C). Dessa forma, observa-se que a redução da reatividade à fenilefrina após a adição da apocinina ocorreu em maior magnitude nos anéis do grupo Cádmio.

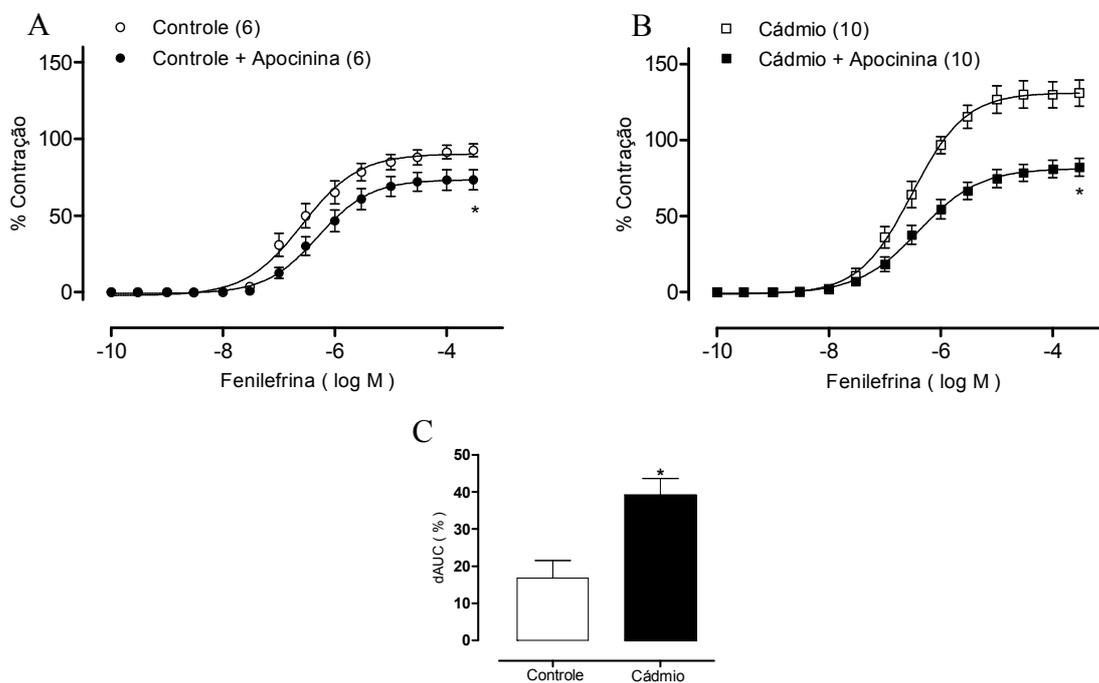


Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de apocinina em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmio (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de Apocinina. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado para R_{max} e pD_2 . # $p < 0,05$ para $R_{m\acute{a}x}$: Controle vs Controle Apocinina; * $p < 0,05$ para $R_{m\acute{a}x}$: Cádmio vs Cádmio Apocinina e % dAUC: Controle vs Cádmio.

Tabela 10: Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de apocinina.

	R_{max} (%)	pD_2
Controle (6)	102 ± 5	6.30 ± 0.16
Controle + Apocinina (6)	$79 \pm 9^{\#}$	6.44 ± 0.10
Cádmio (10)	142 ± 5	6.52 ± 0.80
Cádmio + Apocinina (10)	$90 \pm 6^*$	6.64 ± 0.08

Os valores estão expressos como média e EPM. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. Teste T-Student não pareado para comparar R_{max} vs pD_2 Controle vs Controle + Apocinina; Cádmio vs Cádmio + Apocinina, $^{\#}p < 0.05$ para R_{max} vs Controle, $^*p < 0.05$ para R_{max} vs Cádmio.

4.9.2.1 Expressão proteica da isoforma Cu/Zn da Superóxido Dismutase

A expressão da isoforma intracelular Cu/Zn da superóxido dismutase (SOD-Cu/Zn) foi quantificada através da técnica de Western Blot em segmentos aórticos de ratos dos grupos Controle e Cádmio. Não foi observada diferença estatística na expressão da isoforma SOD-Cu/Zn entre os grupos experimentais (Figura 14).

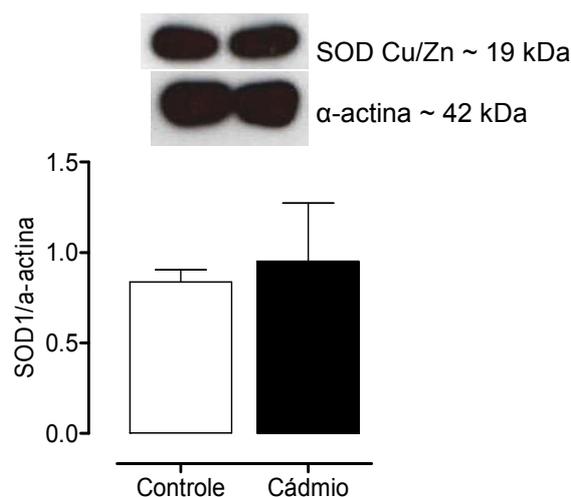


Figura 14: Resultados da expressão proteica da isoforma Cu/Zn da enzima superóxido dismutase (SOD1), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta abdominal dos grupos Controle ($n = 7$) e Cádmio ($n = 6$). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a isoforma Cu/Zn citosólica da enzima superóxido dismutase (SOD Cu/Zn) e a alfa-actina. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, entre a densidade das bandas da SOD-Cu/Zn e da α -actina. Teste t-Student não pareado, $p > 0,05$.

4.9.2.2 Expressão proteica da subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase

A expressão da subunidade gp91^{phox}, NOX2, foi avaliada através da técnica de Western Blot em segmentos de aorta abdominal de ratos Controle e Cádmio. Foi observada expressão aumentada dessa subunidade nos segmentos artérias de ratos expostos ao cádmio (Figura 15).

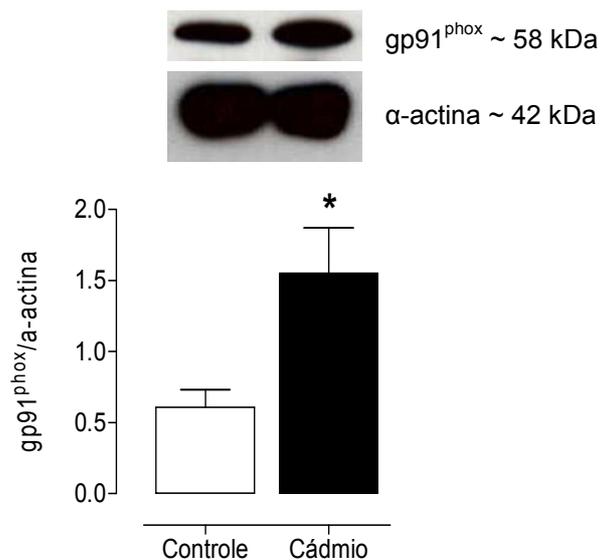


Figura 15: Resultados da expressão proteica da subunidade gp91^{phox} (NOX2) da enzima NADPH oxidase, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de aorta abdominal dos grupos Controle (n= 6) e Cádmio (n= 5). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a subunidade da gp91^{phox} e a alfa-actina. Os resultados estão expresos como média ± EPM, como relação entre a densidade das bandas da gp91^{phox} e da α-actina. Teste t-Student não-pareado, *p<0,05 vs Controle.

4.9.3 Participação da angiotensina II na exposição por trinta dias com cloreto de cádmio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Os resultados demonstrados anteriormente sugerem que a exposição ao cádmio estimula a expressão da NOX2, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio. A NOX2 pode ser estimulada por diversos fatores, dentre eles a angiotensina II. Avaliamos então, a participação da angiotensina II na reatividade à fenilefrina em anéis de aorta de ratos dos grupos Controle e Cádmio. A adição de enalapril (10 μM), um inibidor da enzima conversora de angiotensina I, não modificou a reatividade à fenilefrina em ambos os grupos experimentais (Figura 16, Tabela 11).

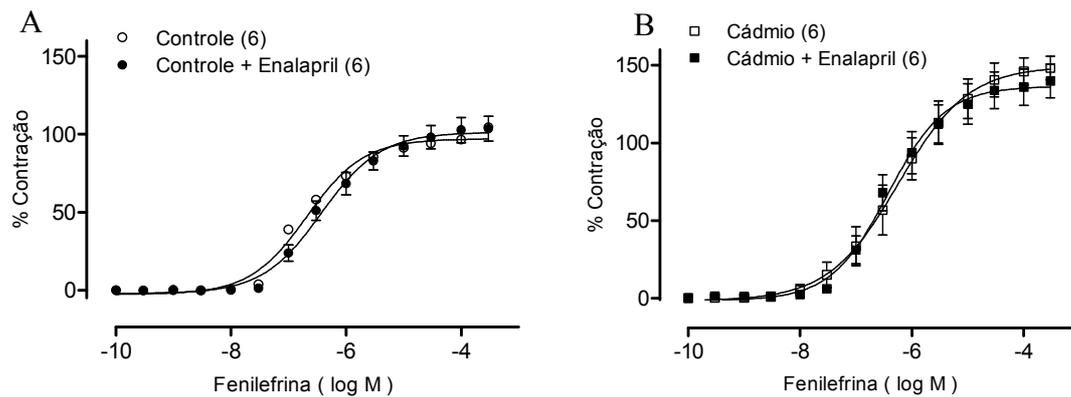


Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de enalapril em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmio (B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado para comparação de Rmax e pD_2 Controle vs Controle + Enalapril; Cádmio vs Cádmio + Enalapril. $p > 0.05$ para todas as comparações.

Tabela 11: Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de enalapril.

	Rmax (%)	pD_2
Controle	102 \pm 5	6.30 \pm 0.16
Controle + Enalapril	104 \pm 8	6.41 \pm 0.15
Cádmio	142 \pm 5	6.52 \pm 0.80
Cádmio + Enalapril	140 \pm 11	6.36 \pm 0.23

Os valores estão expressos como média e EPM. Foram utilizados 6 animais por grupo. Teste T-Student não pareado para comparação de Rmax e pD_2 : Controle vs Controle + Enalapril, Cádmio vs Cádmio + Enalapril. $p > 0.05$ para todas as comparações.

A adição de losartan (10 μ M), um antagonista de receptor AT1, teve resultados semelhantes à de enalapril, não havendo diferença estatística após a incubação do fármaco (Figura 17, Tabela 12). Esses resultados indicam que a angiotensina II apresenta biodisponibilidade e função normal, e provavelmente não seria responsável pelo estímulo excessivo da expressão de NOX2.

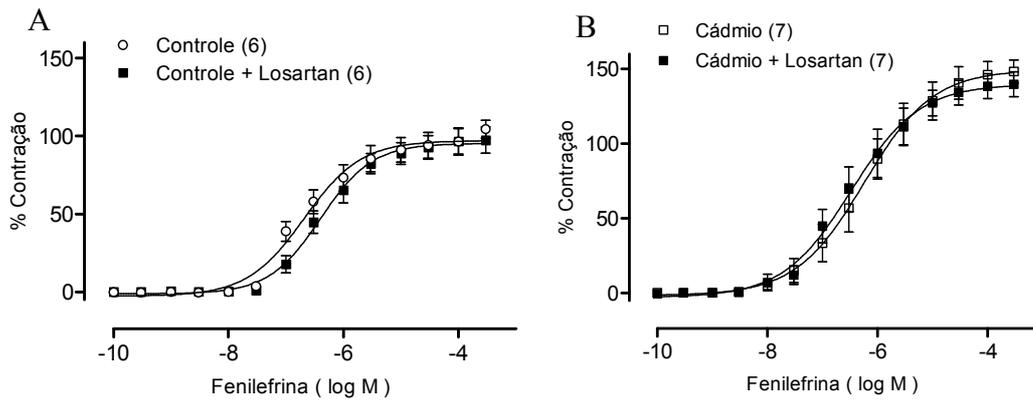


Figura 17: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de losartan em segmentos de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Cádmio (B). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não-pareado para comparação entre Rmax e pD_2 : Controle vs Controle + Losartan; Cádmio vs Cádmio + Losartan.

Tabela 12: Sensibilidade (pD_2) e Resposta máxima (Rmax) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de losartan.

	Rmax (%)	pD_2
Controle (6)	102 \pm 5	6.30 \pm 0.16
Controle + Losartan (6)	106 \pm 11	6.31 \pm 0.13
Cádmio (7)	142 \pm 5	6.52 \pm 0.80
Cádmio + Losartan (7)	135 \pm 9	6.52 \pm 0.20

Os valores estão expressos como média e EPM. Os números de animais utilizados estão representados entre parênteses. Teste T-Student não pareado para comparação de Rmax e pD_2 Controle vs Controle Enalapril, Cádmio vs Cádmio Enalapril. $p > 0.05$ para todas as comparações.

5 DISCUSSÃO

Nossos principais achados demonstraram que o cádmio, em concentrações similares às aquelas encontradas em populações ocupacionalmente expostas (Roels *et al.*, 1982; Hassler *et al.*, 1983), induz aumento da pressão arterial sistólica e disfunção endotelial em aorta de ratos. Essa disfunção pode ser decorrente do aumento da produção de ânion superóxido, com conseqüente diminuição da biodisponibilidade de NO. Corroborando tais achados, também foi observado um aumento da expressão de NOX-2, uma possível fonte dessa espécie reativa de oxigênio. A seguir, discutiremos separadamente os resultados relatados em nosso estudo.

5.1. CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CÁDMIO

A exposição ao cádmio pode ocorrer por meio da ingestão de alimentos contaminados com o metal. Essa contaminação dos alimentos pode ser devido ao despejo de resíduos industriais diretamente no solo, em águas que irriguem esse solo ou usadas na dieta, ou ainda em rios onde habitam crustáceos comuns na dieta da população local. Além disso, fertilizantes fosfatados apresentam cádmio em sua constituição e contaminam solos e conseqüentemente alimentos cultivados nestes. A média de obtenção de cádmio por meio dos alimentos de áreas não-contaminadas é de 10 a 40 µg, já para áreas contaminadas essa média passa para centenas de µg de cádmio por dia (WHO, 1992).

O uso de fertilizantes fosfatados também é responsável pela contaminação de folhas de tabaco e a taxa de absorção pela via pulmonar é cerca de dez vezes maior que a da via do trato gastrointestinal. Diante disso, e juntando-se ao fato de que as folhas de tabaco são capazes de acumular altos níveis de cádmio do solo, a fumaça de cigarro é a principal forma de exposição ao cádmio pela população geral, levando fumantes a apresentarem concentração sanguínea de cádmio quase três vezes maior que a concentração encontrada em não-fumantes (1.58 µg/L para fumantes vs 0.47 µg/L para não-fumantes) (ATSDR, 2008).

Indústrias de exploração e refino de metais, fábricas de baterias níquel-cádmio, manufaturas de fertilizantes fosfatados contribuem para o aumento do conteúdo de cádmio no sangue de seus trabalhadores. A concentração sanguínea média de cádmio em trabalhadores expostos ocupacionalmente é de 5 a 50 µg/L. Essa elevada concentração de cádmio tem sido associada ao aparecimento de câncer e disfunção renal irreversível (Roels et al, 1982).

A ATDRS estabeleceu como limite de segurança a concentração sanguínea de cádmio de 5 µg/L. Em nosso modelo experimental detectamos a concentração média de cádmio de 40.3 µg/L no sangue total de ratos expostos ao metal. Mesmo ultrapassando o limite de segurança estabelecido pela ATDRS, a concentração de cádmio do sangue total de ratos expostos ainda se encontra na faixa de valores encontrados em populações expostas ocupacionalmente. Assim, nosso modelo experimental mimetizou a exposição ocupacional ao cádmio permitindo que estudássemos seus efeitos sobre a função vascular.

5.2 EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E A MASSA CORPORAL

De acordo com a IV Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, indivíduos com valores menores que 120 mmHg de pressão arterial sistólica (PAS), e 80 mmHg de pressão arterial diastólica (PAD) são considerados normotensos. Indivíduos com valores entre 130-139 mmHg de PAS e 85-90mmHg de PAD são classificados como pré-hipertensos e valores acima destes últimos descritos indicam hipertensão arterial.

Em nosso modelo experimental, expusemos ratos durante trinta dias ao cloreto de cádmio via água de beber e acompanhamos semanalmente sua pressão arterial sistólica através da pletismografia de cauda, uma técnica não invasiva de aferição de PAS em ratos acordados. Segundo os dados obtidos, a pressão arterial sistólica dos ratos expostos ao cádmio sofreu aumento, observado desde o sétimo dia de tratamento. Já os ratos do grupo controle, que receberam água destilada por trinta dias, não apresentaram variações na PAS durante todo o tratamento. Assim,

observamos que a exposição ao cádmio, nessa concentração, leva ao aumento da PAS até valores consideráveis de hipertensão arterial.

O ganho de massa corporal também foi alterado pela exposição ao cádmio. Ao final dos trinta dias de exposição, ratos do grupo Cádmio apresentavam em média 40 g a menos que os do grupo controle.

Estudos anteriores já observaram aumento de pressão arterial em animais expostos ao cádmio. Perry e Erlanger (1982) observaram ratos expostos ao cádmio na dieta a 0,1 e 1 mg/L durante 3, 5, 10 e 14 meses. Em todos os grupos expostos ao cádmio, a pressão arterial sistólica estava elevada em 15 a 20 mmHg quando comparado ao respectivo grupo controle.

Sompamit e colaboradores (2010) relataram aumento de pressão arterial sistólica, diastólica e média em camundongos após oito semanas de exposição ao cloreto de cádmio via água de beber (100 mg/L). A redução do ganho de peso também foi observada nesse estudo, associada a níveis aumentados de Malondialdeído (MDA). O MDA é um marcador de peroxidação lipídica, podendo esse processo ser responsável pela redução do ganho de massa na exposição ao cádmio. Resultados semelhantes foram encontrados em ratos expostos a injeções intraperitoneais de CdCl_2 1 mg/kg/dia, durante quinze dias (Gökalp *et al*, 2009). Aumento da pressão arterial sistólica, redução do ganho de massa corporal e aumento dos níveis de malondialdeído também foram evidenciados nesse modelo experimental. Apesar da associação entre aumentados níveis de MDA e redução do ganho de massa corporal ser frequente em modelos experimentais de exposição ao cádmio, ainda não se sabe ao certo os mecanismos envolvidos nesse processo.

Como mencionado acima, o tratamento por 30 dias com cádmio induziu a um aumento de pressão arterial sistólica. No entanto, diversos fatores podem estar relacionados a este aumento de PAS, dentre eles, possíveis modificações na função do endotélio vascular. No entanto, a literatura carece de estudos que relacionem as ações tóxicas do cádmio com modificações da função endotelial, especialmente em concentrações próximas às encontradas em indivíduos expostos ocupacionalmente. Além disso, como relatado anteriormente, a intoxicação por cádmio promove aumento dos níveis de MDA, relacionando-o assim, a fatores pré-ateroscleróticos, processo que ocorre em artérias de grande calibre como a aorta. Diante disso, o presente estudo procurou analisar também, a reatividade de anéis de aorta de ratos expostos a baixa concentração de cloreto de cádmio durante trinta dias.

5.3 EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA

A fenilefrina, ao se ligar ao seu receptor α_1 no músculo liso vascular, ativa a proteína Gs e esta por sua vez, ativa a fosfolipase C, que promove a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) em inositol 1,4,5trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ estimula a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), resultando em aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, fosforilação da cadeia leve da miosina e aumento da mobilização do cálcio através de canais da membrana e todos esses processos contribuem para a contração do músculo liso vascular (Horowitz et al, 1996)

No presente estudo, observamos que a exposição ao cádmio durante 30 dias, promoveu aumento da reatividade à fenilefrina em anéis isolados de aorta. Já a resposta ao KCl não foi alterada pela exposição ao metal. Resultados diferentes foram encontrados em outros estudos. Tzotzes e colaboradores (2007) observaram que a exposição intramuscular ao cádmio 0,5 mg/kg/dia durante 120 dias aumentou a reatividade ao KCl, mas não alterou a resposta contrátil à fenilefrina em ratos. Já em camundongos, a exposição ao cádmio via água de beber durante oito semanas, na mesma concentração utilizada em nosso estudo, reduziu a reatividade à fenilefrina (Sompamit *et al*, 2010; Donpunha *et al*, 2011) . As concentrações sanguíneas de cádmio quantificadas por esses autores (60,5 $\mu\text{g/L}$ e 50,3 $\mu\text{g/L}$ respectivamente) foram superiores aos níveis de cádmio no sangue total de nossos animais expostos (40,3 $\mu\text{g/L}$). Os resultados conflitantes provavelmente devem-se às diferenças temporais e de exposição ao cádmio. Dessa forma, sugere-se que os efeitos do cádmio sobre a reatividade vascular a fenilefrina em anéis de aorta parece depender da concentração do metal e do tempo de exposição.

5.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

Para avaliar os efeitos do cádmio sobre o relaxamento dependente do endotélio, realizamos curvas concentração-resposta a acetilcolina em anéis pré-contraídos com fenilefrina. Sabemos que a ligação da acetilcolina com receptores

muscarínicos no endotélio vascular leva ao aumento da concentração intracelular de cálcio, o que ativa diversos mecanismos que estimulam a produção de prostaciclina, NO e fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Essas substâncias irão causar hiperpolarização do músculo liso vascular subjacente, levando ao relaxamento do vaso (Rattmman, 2009) (Figura 18). Dessa forma, torna-se evidente a necessidade da integridade do endotélio vascular para uma adequada resposta a acetilcolina. Já o NPS é um doador direto de NO para células musculares lisas, levando à estimulação da Guanilato ciclase solúvel nas células do músculo liso vascular. O NO age por diversos mecanismos levando à hiperpolarização das células musculares lisas e por fim ao vasorelaxamento.

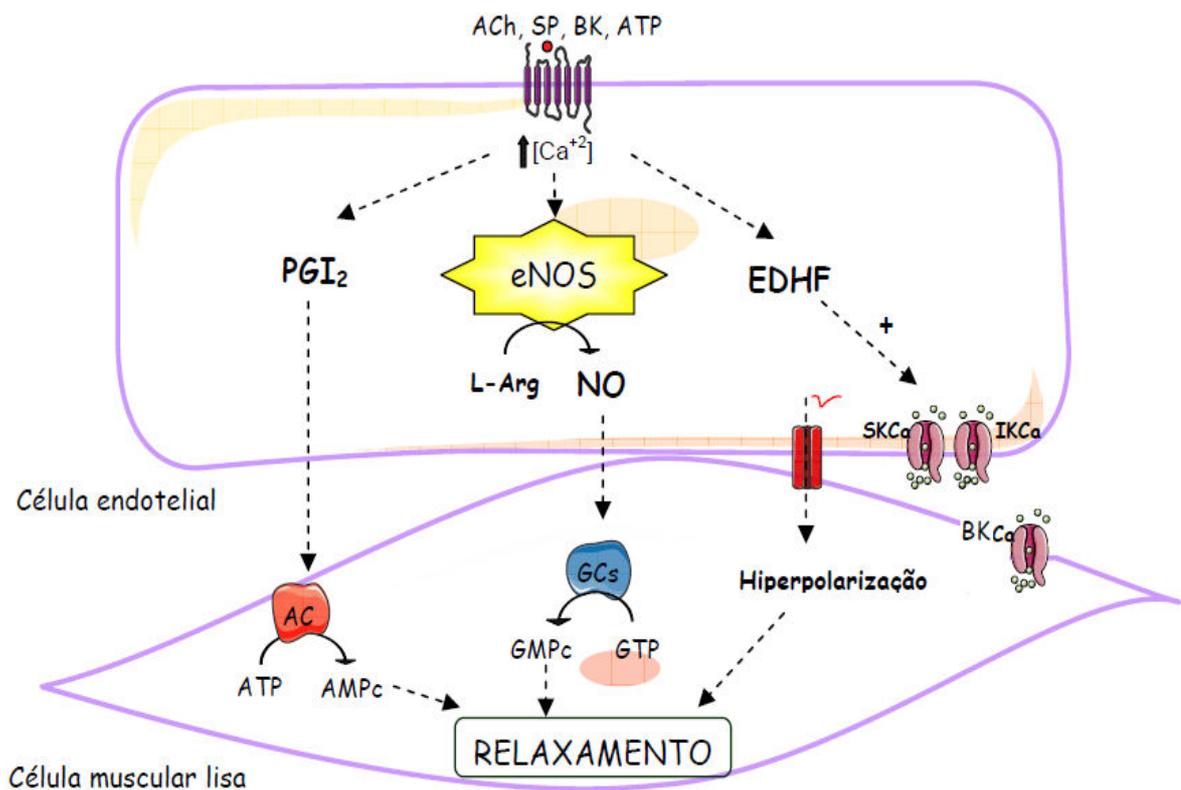


Figura 18: Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI₂), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca²⁺. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização. (modificado de Rattmann, 2009).

Em nosso estudo, observamos que a exposição ao cádmio reduziu a resposta vascular à acetilcolina, evidenciado pela redução da resposta máxima. Já a resposta vasodilatadora independente do endotélio não foi alterada pelo metal.

Sompamit e colaboradores (2010) relataram redução do relaxamento à acetilcolina e ao NPS em camundongos após oito semanas de exposição ao CdCl₂ 100 mg/L via água de beber. Resultados semelhantes foram obtidos por Donpunha e colaboradores (2011).

Em ratos Sprague-Dawle expostos a baixas concentrações de CdCl₂ (10 e 50 ppm) via água de beber durante três meses, a reatividade à acetilcolina estava reduzida, evidenciada pela redução do EC50. No entanto, animais expostos e não expostos ao cádmio apresentaram resposta semelhante ao NPS. Esses dados corroboram um estudo realizado com ratos Wistar expostos ao metal por injeções intraperitoneais (1 mg/kg/dia) durante quinze dias (Gökalp et al, 2009). Em tal modelo de exposição, a reatividade à acetilcolina foi revertida após a adição de L-arginina, substrato da óxido nítrico sintase, sugerindo que a indução da redução do relaxamento dependente do endotélio envolve perda da função da enzima produtora de NO. Novamente os resultados conflitantes podem ser justificados por diferenças nos modelos experimentais e concentração resultante de cádmio no sangue.

Os resultados discutidos até então sugerem que o cádmio interfere na função endotelial, reduzindo a liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio. Para investigar a modulação endotelial nas respostas vasculares a fenilefrina, o endotélio vascular dos animais foi lesado por ação mecânica. A retirada do endotélio aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos experimentais, porém, a amplitude dessa resposta foi menor nos animais expostos ao metal, evidenciada pela redução da %dAUC observada nos anéis do grupo Cádmio.

Durante muito tempo se pensou no endotélio apenas como uma barreira física entre o sangue e o músculo liso vascular. Hoje já se sabe que este tecido, formado por células epiteliais pavimentosas, apresenta propriedades sintéticas e metabólicas, atuando em diversas funções vitais do organismo. Dentre estas funções podemos citar a manutenção do tônus vascular e da hemostase; participação em respostas inflamatórias e imunológicas e regulação do crescimento vascular (Carvalho, 2001). Como já mencionado, o tônus do músculo liso vascular é extensamente controlado pelo endotélio por meio da produção e liberação de substâncias vasodilatadoras e

vasoconstritoras. O desequilíbrio da biodisponibilidade destes agentes vasoativos pode afetar o tônus vascular e assim, a pressão arterial (Vanhoutte, 2009).

Os mecanismos pelo qual o cádmio altera a reatividade vascular ainda são pouco conhecidos. Neste sentido, o estudo propôs investigar algumas vias que poderiam esclarecer a ação vascular desse metal em anéis de aorta de ratos.

5.5 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO CÁDMIO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA

5.5.1 Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a via do Óxido Nítrico

O NO é o vasodilatador mais importante derivado do endotélio. Apresenta-se na forma gasosa, o que permite livre difusão através das membranas celulares. Suas ações abrangem a regulação do crescimento vascular, inibição da adesão e agregação plaquetária e manutenção do tônus vascular (Moncada *et al*, 1991) (Figura 19).

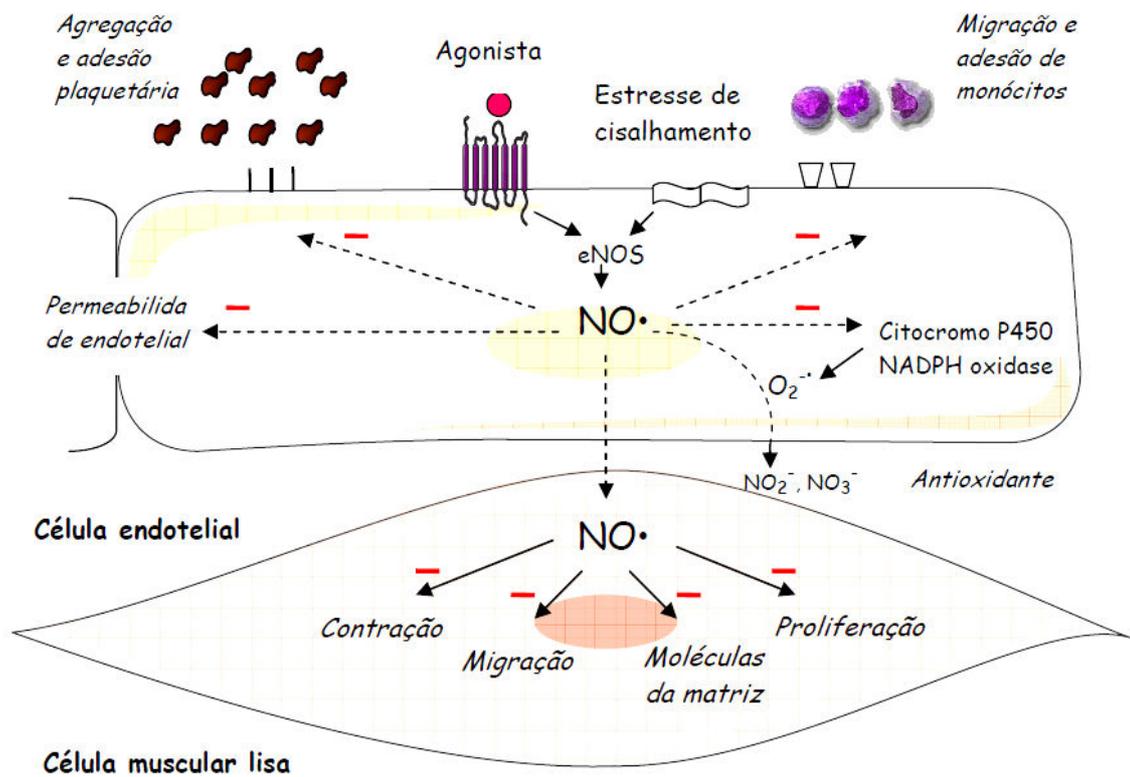


Figura 19: Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular. (modificado de Rattmann, 2009).

O NO é produzido pelas células endoteliais a partir da oxidação da L-arginina a NO e L-citrulina, por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na presença dos cofatores, a nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida (NADPH), a tetrahydrobiopterina (BH₄), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e flavina mononucleotídeo (FMN) (Palmer *et al*, 1987; Moncada *et al*, 1991). A produção de NO é estimulada por diversos fatores químicos, como catecolaminas, serotonina, bradicinina e histamina; e forças mecânicas, como o estresse de cisalhamento. Existem três isoformas conhecidas da NOS, a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS) são ditas constitutivas e dependentes de cálcio para ativação. Já a isoforma induzível (iNOS), é expressa em grandes quantidades em processos inflamatórios, e sua ativação independe do aumento da concentração de cálcio intracelular (Xie *et al*, 1994). A eNOS é a principal fonte de NO nos vasos,

sendo constituída por dois monômeros idênticos de 134kDa unidos pelo grupamento heme (Forstermann *et al*, 1994; McCabe *et al*, 2000).

O NO produzido pelas células endoteliais se difunde rapidamente para as células musculares lisas onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, promovendo aumento da concentração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o que ativa a proteína quinase G (PKG). A PKG ativa canais para K^+ dependentes de Ca^{2+} , estimula a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, fosforila a cadeia leve da miosina tornando-a menos sensível ao Ca^{2+} e aumenta a saída de cálcio da célula pelo trocador Na^+/Ca^{2+} (Lincoln *et al*, 2001). Além disso, o NO ativa diretamente canais de K^+ (Vanhoute, 2000). Todos esses mecanismos contribuem para a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} e assim, levam ao relaxamento do músculo liso vascular. (Moncada *et al*, 1991; Lincoln *et al*, 2001).

Como mencionado anteriormente, foi observada uma redução do relaxamento à ACh após a exposição ao Cádmi. Sugere-se que tal redução seja decorrente da diminuição da liberação ou biodisponibilidade de NO. Portanto, para avaliar a participação deste fator vasodilatador, também, sobre a resposta contrátil à fenilefrina foi incubado um inibidor não-seletivo da NOS, L-NAME (100 mM), em anéis de aorta provenientes de ratos dos grupos Controle e Cádmi. O L-NAME aumentou a reatividade à fenilefrina em ambos os grupos, mas esse aumento ocorreu em menor magnitude no grupo exposto ao cádmio. Este resultado sugere que a exposição ao cádmio durante trinta dias reduz a biodisponibilidade de NO e sua ação sobre o músculo liso vascular.

Martynowics e colaboradores (2004) expuseram ratos ao $CdCl_2$ 50 ppm via água de beber. Ao final de doze semanas de exposição, diversos agentes vasoativos foram quantificados no soro e na aorta desses animais. Seus dados demonstraram reduzida biodisponibilidade NO em aorta de ratos expostos ao metal. Contradizendo esse achado, Sompamit e colaboradores (2010) relaram aumento da concentração de nitrito/nitrato na urina de camundongos expostos ao cádmio.

A redução da biodisponibilidade do NO é um dos mais importantes fatores associados com doenças vasculares (Stroes *et al*, 1998; Forstermann e Munzel, 2006). A reação do NO com EROs, principalmente ânion superóxido, produz substâncias tóxicas como o peroxinitrito ($ONOO^-$) e radicais hidroxila; além de inibir a atividade biológica do NO, levando à um prejuízo na resposta de relaxamento

derivado do endotélio (Kerr *et al*, 1999). Dito isso, estudamos a contribuição das EROs no aumento da resposta à fenilefrina em ratos expostos ao cádmio.

5.5.2 Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a via dos radicais livres

A espécies reativas de oxigênio (EROs) são metabólitos do oxigênio que, por apresentarem um ou mais elétrons desemparelhados, são altamente instáveis e reativos (Harrison e Gongorra, 2009). As principais EROs são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $O_2^{\cdot-}$ é formado pela redução univalente do oxigênio molecular e pode ser reduzido a H_2O_2 e O_2 pela SOD, mas sua reação com o NO ocorre mais rapidamente levando à produção de $OONO^{\cdot}$ e à redução da vasodilatação dependente do endotélio. Já o H_2O_2 é mais estável, pode ser hidrolizado pela catalase ou glutathiona peroxidase, mas pode levar à formação de outros radicais mais instáveis como OH^{\cdot} (Touyz e Schffrin, 2000).

Para investigar a influência do ânion superóxido no aumento da reatividade à fenilefrina induzido pelo cádmio, utilizamos a enzima SOD, que aboliu o aumento da reatividade à fenilefrina, promovido pelo cádmio. A catalase, enzima responsável pela degradação do H_2O_2 a O_2 e água, teve o mesmo efeito sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos expostos ao cádmio. Esses resultados evidenciam que a exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio promove estresse oxidativo. Diversos estudos corroboram estes achados, relatando aumento da biodisponibilidade de ânion superóxido em animais expostos ao metal (Sompamit *et al*, 2010; Donpunha *et al*, 2011).

As EROs são difundidas através das membranas celulares e podem danificar o DNA e outras macromoléculas, comprometendo a integridade estrutural e funcional das células. Em contrapartida, as EROs são essenciais para processos fisiológicos importantes como regulação e sinalização, além da digestão celular (Touyz e Schffrin, 2000). Dessa forma, para garantir o bom funcionamento das células torna-se necessário um balanço da atividade de enzimas oxidantes e antioxidantes, e um desequilíbrio nestas vias leva ao estresse oxidativo (Grienling *et al* 2000, 2003).

A SOD representa a principal defesa celular contra $O_2^{\cdot-}$ e $OONO^-$. Três isoformas da SOD foram identificadas: a SOD cobre/zinco presente no citosol (Cu/Zn SOD, SOD1), a isoforma mitocondrial, que contém manganês em sua estrutura (MnSOD, SOD2) e a isoforma extracelular, que também apresentam cobre e zinco em sua estrutura, produzida por fibroblastos e células gliais (Strâlin *et al*, 1995).

Para investigar a influência da exposição ao cádmio sobre a expressão da enzima SOD e a participação desta no aumento do estresse oxidativo, avaliamos a expressão da isoforma SOD1, presente do citosol. A expressão dessa enzima foi semelhante entre os grupos experimentais. Corroborando esse resultado, Obara e colaboradores (2011) estudaram as alterações promovidas pela exposição ao cádmio em cultura de células COS-7 e não encontraram diferenças estatísticas na expressão da SOD1 ou SOD2 de células expostas ou não ao metal. Entretanto, células expostas ao cádmio apresentaram redução da expressão da isoforma extracelular da SOD.

Já Ozturk e colaboradores (2009) observaram aumento da atividade da enzima SOD em ratos expostos ao metal por gavagem 15mg/kg/dia durante sessenta dias. Resultado semelhante foi encontrado em ratos tratados durante quinze e trinta dias com 15 ppm de $CdCl_2$ via água de beber. Os animais expostos apresentavam níveis aumentados de RNAm para SOD em homogeneizados de coração (Ferramola *et al*, 2011).

Dentre as enzimas oxidantes, a NADPH oxidase é a mais importante, sendo a única via enzimática que produz $O_2^{\cdot-}$ como função primária, para este agir como segundo mensageiro. A estrutura comum da NADPH oxidase consiste em sete domínios transmembrana e um domínio citosólico, que compreendem os sítios de ligação da NADPH e FAD. Essa região é conhecida como citocromo b558, o qual é composto de duas subunidades, gp91phox e p22phox (Griendling *et al*, 2000). Subunidades homólogas da gp91phox foram descritas, originando a família Nox da NADPH oxidase, que compreende de sete membros, Nox1 a 5 e Duox1 e 2. No entanto, cada membro da família Nox da NADPH oxidase parece exercer um efeito biológico específico e requer diferentes subunidades para sua ativação. Estas enzimas têm a capacidade de transportar elétrons através da membrana plasmática e gerar ânions superóxido (Figura 20). A Nox2, compreendida pela gp91phox, é expressa principalmente em fagócitos, em células endoteliais e do músculo liso vascular. Esta isoforma é instável sem a subunidade p22phox e necessita das

subunidades p47phox, p67phox e Rac1/2 para sua total ativação (Montezano e Touyz, 2012). As EROs derivadas da Nox, têm sido implicadas em uma variedade de doenças vasculares, incluindo hipertensão (Koh et al, 2009).

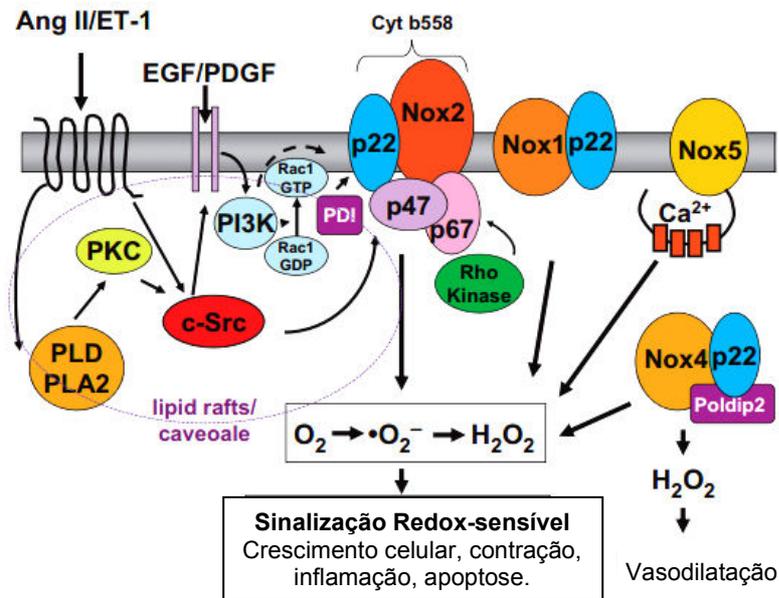


Figura 20: Células Endoteliais possuem pelo menos quatro isoformas funcionais da Nox: Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5. Subunidades regulatórias diferem entre as isoformas de Nox. O protótipo da nicotinamida adenina dinucleotíneo fosfatase contendo gp9phox, Nox2, requer p22phox, p47phox, p67phox e p40phox para sua total ativação. As outras Nox são reguladas por proteínas regulatórias específicas. De modo geral, moléculas sinalizadoras como PKC, c-Src, PI3K, PLD e fosfolipase A2 levam a ativação das oxidases. Enquanto a ativação endotelial das Nox1, 2 e 5 pode induzir dano oxidativo e injúria celular, a Nox4 pode ter uma função protetora. (Modificado de Touyz e Briones, 2011)

Para investigar a participação do ânion superóxido liberado pela NADPH oxidase na reatividade vascular de ratos expostos ao cádmio, utilizamos a apocinina, um inibidor não-seletivo dessa enzima oxidante. A incubação da apocinina reduziu a resposta contrátil à fenilefrina de ambos os grupos, mas essa redução ocorreu em menor magnitude no grupo cádmio, sugerindo aumento da atividade da enzima no grupo exposto. Corroborando esse achado, a expressão da isoforma NOX2 estava aumentada em homogêneos de aorta de ratos do grupo Cádmio.

Expressão aumentada de NOX2, bem como da subunidade p47phox da NADPH oxidase também foram encontradas em homogêneos de coração de ratos expostos ao cádmio durante 30 dias (Ferramola et al 2011).

Portanto, o aumento de espécies reativas de oxigênio, evidenciado por meio de diversos bloqueios farmacológicos de sua produção, pode reduzir a biodisponibilidade de NO.

5.5.3 Efeito da exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio sobre a via da angiotensina II

A NADPH oxidase pode ter sua expressão aumentada por diversos estímulos como o estresse de cisalhamento, a endotelina I e a angiotensina II. A angiotensina II faz parte de um eixo endócrino conhecido como Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). A síntese de angiotensina II abrange uma série de reações bioquímicas que iniciam com a produção e liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. A renina é uma enzima proteolítica que cliva o angiotensinogênio, produzido no fígado, em angiotensina I. Esta última é convertida em angiotensina II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Costerousse, 1992). Além do SRA sistêmico, já foi demonstrado que há produção local de angiotensina II em diversos tecidos, incluindo rim, coração, cérebro e o próprio endotélio vascular. Assim, considera-se a angiotensina II como um fator vasoconstritor derivado do endotélio (Krieger e Santos, 1998).

A ligação da angiotensina II ao seu receptor AT1 presente no músculo liso vascular, ativa a fosfolipase C (PLC), levando à produção de IP3 e DAG que agem por diversos mecanismos elevando as concentrações intracelulares de cálcio, o que culmina na contração da célula muscular lisa (Khalil et al, 1995).

Além da ação direta sobre o músculo liso vascular, a angiotensina II regula o tônus dos vasos por meio da promoção do estresse oxidativo. Estudo prévio mostrou que a angiotensina II aumenta a liberação de $O_2^{\cdot-}$ pelo estímulo da atividade da enzima NADPH oxidase em cultura de células musculares lisas (Griendling et al 1996). Outros pesquisadores demonstraram que a hipertensão induzida pela angiotensina II em ratos Sprague-Dawley está associada ao aumento de $O_2^{\cdot-}$ (Rajagopalan et al, 1996). Em adição, Doughan e colaboradores (2008) mostraram que este peptídeo, estimulando a NADPH oxidase, aumentou a produção de $O_2^{\cdot-}$ e ONOO⁻ em células endoteliais aórticas bovinas.

Para investigar se o cádmio afeta a via da angiotensina II e se esta estaria contribuindo para o aumento da reatividade à fenilefrina induzida pelo cádmio, utilizamos o losartan, antagonista de receptores AT1, e o enalapril, inibidor da ECA. A incubação dessas drogas não modificou a resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos, indicando não-participação da angiotensina II no aumento da reatividade promovida pelo cádmio. Embora, tanto o losartan quanto o enalapril não tenham modificado a reatividade à fenilefrina em ambos os grupos, não podemos descartar a hipótese de que a angiotensina II estaria estimulando a expressão da NADPH oxidase, pois não realizamos co-incubação de fármacos que bloqueiam a ação da angiotensina II e a ação da NADPH oxidase (losartan + apocinina)

Apesar dos níveis sanguíneos de cádmio observados em nosso estudo estar muito acima dos preconizados como seguros pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1992), estes níveis são encontrados em trabalhadores expostos. Os efeitos da exposição ao cádmio a níveis de exposição ocupacional evidenciados pelos presentes dados são preocupantes, incluindo disfunção endotelial e hipertensão. Diante disso, se mostra necessária a maior fiscalização do ambiente de trabalho por órgãos responsáveis, para controlar a exposição a este metal e prevenir seus efeitos deletérios sobre o organismo humano. Além disso, os mecanismos propostos para a ação do cádmio possibilitam o desenvolvimento de terapias que amenizem os efeitos da intoxicação por este metal, a exemplo do uso de antioxidantes ou inibidores da NADPH oxidase.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento com o cádmio promoveu aumento da concentração sanguínea deste metal, em níveis similares aos encontrados na população exposta ocupacionalmente, com concomitante aumento da pressão arterial sistólica. Além disso, o tratamento com o cádmio reduziu a liberação de NO e promoveu aumento da liberação de ROS, provavelmente via NADPH oxidase. Esses efeitos foram acompanhados de aumento da expressão da NOX2. Estes resultados sugerem que o aumento de ROS pode contribuir para a redução da biodisponibilidade de NO, levando ao aumento da reatividade à fenilefrina e redução do relaxamento à acetilcolina.

Em suma, estes resultados sugerem que a exposição ao cádmio pode promover disfunção endotelial que, por sua vez, pode contribuir para inflamação, injúria vascular e desenvolvimento de aterosclerose. Assim, nossos resultados fortalecem a hipótese de que os indivíduos expostos ao cádmio podem apresentar risco aumentado de hipertensão e outras doenças relacionadas.

7 REFERÊNCIAS

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 2007.

Afridi HI, Kazi TG, Kazi NG, Jamali MK, Arain MB, Sirajuddin, Baig JA, Kandhro GA, Wadhwa SK, Shah AQ. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and non smokers hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension*. 2010; 24: 34-43.

Alsberg CL, Schwartz, EW. Pharmacological action of cadmium. *Journal of Pharmacological Experimental Therapy*. 1919; 13: 504-505

Angeli JK, Ramos DB, Casali EA, Souza DO, Sarkis JJ, Stefanon I, et al. Gadolinium increases the vascular reactivity of rat aortic rings. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*. 2011; 44: 445-452.

Angeli JK. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009.113f. Tese de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Aoki A, Hoffer AP. Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biology of Reproduction*. 1978; 18: 579-91.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Public Health Statement For Cadmium. 2008.

Balaraman R, Gulati OD, Bhatt JD, Rathod SP, Hemavathi KG. Cadmium-induced hypertension in rats. *Pharmacology*. 1989; 38: 226-34.

Beltrán AE, Briones AM, Garcia-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Álvarez Y, Alonso MJ, Martínez-González J, Salaices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 2009; 27: 141-154.

Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*. 2006; 88: 1549-59.

Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. *Circulation Research*. 2000; 87: 840-844.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Research*. 2005; 68: 26-36.

Cannon III RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the Endothelium. *Clinical Chemistry*. 1998; 44: 1809-1819.

Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2001; 8:76-88.

Copes R, Clark NA, Rideout K, Palaty J, Teschke K. Uptake of cadmium from Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in British Columbia oyster growers. *Environmental Research*. 2008; 107: 160–169.

Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz M. Vascular smooth muscle cell NA(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *American Journal of Hypertension*. 2005; 18: 81-87.

Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld J, Smeets K. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 2010; 23: 927-40.

Donpunha W, Konungviriyapan U, Sompamit K, Pakdeechote P, Konungviriyapan V, Pannangpetch P. Protective effect of ascorbic acid on cadmium-induced hypertension and vascular dysfunction in mice. *Biometals*. 2011; 24: 105-115.

Doughan A, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Mitochondrial Dysfunction. *Circulation Research*. 2008; 102: 488-496.

Eum KD, Lee MS, Paek D. Cadmium in blood and hypertension. *Science of the Total Environment*. 2008; 15; 147-53.

Fadloun Z, Leach GD. The effects of Cd²⁺ on the myogenic activity and the responsiveness of the rat portal vein to perimural stimulation, noradrenaline and potassium ions [proceedings]. *Brazilian Journal of Pharmacology*. 1980; 68:181-182.

Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an Update. *Clinical Science*. 2009; 117: 139-155.

Fende PL, Niewenhuis RJ. An electron microscopic study of the effects of cadmium chloride on cryptorchid testes of the rat. *Biology of Reproduction*. 1977; 16: 298-305

Ferramola ML, Antón RI, Anzulovich AC, Giménez MS. Myocardial oxidative stress following sub-chronic and chronic oral cadmium exposure in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011; 32: 17-26.

Förstermann U, Munzel T, Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. From Marvel to menace. *Circulation*. 2006; 113: 1708-1714.

Förstermann U, Closs EL, Pollock JS, Nakane M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994; 23: 1121-1131.

Friberg L, Elinder CG, Kjellström T, Nordberg GF. Cadmium and health, a toxicological and epidemiological appraisal. Vol. II. Effects and response, Cleveland, Ohio, CRC Press. 1986; 303 pp.

Friberg L, Piscator M, Nordberg G, Kjellström T. Cadmium in The Environment. 2^a Ed. Cleveland, Ohio, *Circulation Press*. 1974; 248 pp.

Frolich JC, Förstermann U, Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. Advanced Prostaglandin. *Tromboxane and Leukotriene Research*. 1989; 19: 211-215.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*.1980; 288: 373-6.

Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009; 302: 148-158.

Gökalp O, Ozdem S, Donmez S, Dogan M, Demerin H, Kara HY, Sutcu R, Cicek E, Ozer MK, Delibas N. Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in cadmium-hypertensive rats. *Toxicology and Industrial Health*. 2009; 25: 447-453.

Gonçalves L, Alves ME, Intrator S. Feema apura vazamento na Baía de Sepetiba. O Globo, Rio de Janeiro, 25/02/96, 1996; 34.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003; 108: 1912-1916.

Griendling KK, Lasségue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.1996; 36: 281-306.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*. 2000; 86: 494-501.

Griendling KK, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in Cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*.1994; 74: 1141-1148.

Grizzo LT, Cordelline S. Perinatal exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences*. 2008; 207-214.

Hamilton CA, Brosnam MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczack AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*. 2002; 40: 755-762.

Harrinson DG, Gongora MC. Oxidative stress and hyperension. *The Medical Clinicals of North America*. 2009; 93: 621-635.

Hassler E, Lind B, Piscator M. Cadmium in blood and urine related to present and past exposure. A study of workers in an alkaline battery factory. *British Journal of Industry and Medicine*. 1983; 40: 420-425.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan RG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological Reviews*. 1996; 76: 967-1003.

Houtman JP. Prolonged low-level cadmium intake and atherosclerosis. *Science of Total Environment*. 1993; 138:31-6

Inaba T, Kobayashi E, Suwazono Y, Uetani M, Oishi M, Nakagawa H, Nogawa K. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicology Letters*. 2005; 159: 192–201.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. International Agency for Research on Cancer. Monographs Evaluation of Carcinogenic Risks Chem Hum. 1993; 1–444.

Järup L, Bellander T, Hogstedt C, Spång G. Mortality and cancer incidence in Swedish battery workers exposed to cadmium and nickel. *Occupational and Environmental Medicine*. 1998; 55: 755-9.

Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nature Genetics*. 2003; 34: 326-9.

Kagamimori S, Naruse Y, Fujita T, Watanabe M, Nishino H, Shinmura T. Factors associated with blood pressure in females with heavy exposure to cadmium. *Bulletin of the Environmental Contamination Toxicology*. 1985; 35: 386-92.

Kazantzis G, Blanks RG, Sullivan KR. Is cadmium a human carcinogen? *IARC Science Publications*. 1992; 118: 435-46.

Kerr S, Brosnan J, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: Role of endothelium. *Hypertension*. 1999; 33: 1353-1358.

Khalil R, Menice CB, Wang CLA, Morgan KG. Phosphotyrosine-dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cells. *Circulation Research*. 1995; 76: 1001-1008.

Kitamura M, Hiramatsu N. The oxidative stress: endoplasmic reticulum stress axis in cadmium toxicity. *Biometals*. 2010; 23: 941-50.

Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein Protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 238: 215-220.

Knoflach M, Messner B, Shen YH, Frotschnig S, Liu G, Pfaller K, Wang X, Matosevic B, Willeit J, Kiechl S, Laufer G, Bernhard D. Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. *Circulation Journal*. 2011; 75: 2491-5

Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovascular Research*. 2009; 81: 649-659.

Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*. 2010; 30:1-13.

Kolluru GK, Tamilarasan KP, Geetha Priya S, Durgha NP, Chatterjee S. Cadmium induced endothelial dysfunction: consequence of defective migratory pattern of endothelial cells in association with poor nitric oxide availability under cadmium challenge. *Cell Biology International*. 2006; 30: 427-38.

Krieger EM, Santos RAS. Angiotensinas. Aspectos fisiológicos. *Hipertensão*. 1998; 1: 7-10.

Lampe BJ, Park SK, Robins T, Mukherjee B, Litonjua AA, Amarasiriwardena C, Weisskopf M, Sparrow D, Hu H. Association between 24-hour urinary cadmium and pulmonary function among community-exposed men: the VA Normative Aging Study. *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116:1226-30.

Lemos NB, Angeli JK, Faria TdO, Ribeiro Junior RF, Vassallo DV, Padilha AS, Stefanon I. Low Mercury Concentration Produces Vasoconstriction, Decreases

Nitric Oxide Bioavailability and Increases Oxidative Stress in Rat Conductance Artery. *PLoS One*. 2012; 7(11): e49005

Lincoln T, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of Applied Physiology*. 2001; 91: 2001.

Martynowicz H, Skoczyńska A, Wojakowska A, Turczyn B. Serum vasoactive agents in rats poisoned with cadmium. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2004; 17: 479-85.

McCabe TJ, Fulton D, Romans LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "Calcium dependent" eNOS activation by phosphorylation. *The journal of biological chemistry*. 2000; 275 (9): 6123-6128.

Moncada M, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 1991; 43: 109-142.

Moncada M, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 1991; 43: 109-142.

Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*. 1977; 11: 323-44.

Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2012; 110: 87-94.

Navas-Acien A, Selvin E, Sharrett AR, Calderon-Aranda E, Silbergeld E, Guallar E. Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation*. 2004; 109: 3196-201.

Navas-Acien A, Silbergeld EK, Sharrett R, Calderon-Aranda E, Selvin E, Guallar E. Metals in urine and peripheral arterial disease. *Environmental Health Perspectives*. 2005; 113: 164-9.

Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friedmann JM. Cadmium. In: Handbook on the Toxicology of Metals (Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L, eds). Amsterdam: Elsevier. 2007; 445–486.

Nordberg GF. Cadmium and health in the 21th century-historical remarks and trends for the future. *Biometals*. 2004; 17: 485-9.

Nordic Council of Ministers (NCM). Cadmium Review. 2003.

Nriagu J, Pacyna JM. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*. 1988; 333: 134-139.

Nriagu JO. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*. 1989; 338: 47-48.

Obara A, Kamiya T, Izumi M, Hara H, Yamada H, Adachi T. Extracellular-superoxide dismutase expression in COS7 cells exposed to cadmium chloride. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2011; 34: 1443-7.

Ozturk IM, Buyukakilli B, Balli E, Cimen B, Gunes S, Erdogan S. Determination of acute and chronic effects of cadmium on the cardiovascular system of rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2009; 19: 308-317.

Pacyna JM, Pacyna EG. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews*. 2001; 9: 269-298.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-6.

Perry HM Jr, Erlanger MW. Effect of diet on increases in systolic pressure induced in rats by chronic cadmium feeding. *Journal of Nutrition*. 1982; 112: 1983-9.

Pimenta E, Oparil S. Prehypertension: epidemiology, consequences and treatment. *Nature Review Nephrology*. 2010; 6: 21-30.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison D. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996; 97: 1916-1923.

Rattmann YD, Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. 2009.145f. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

Roels H, Djubgang J, Buchet JP, Bernard A, Lauwerys RR. Evolution of cadmium-induced renal dysfunction in workers removed from exposure. *Scandinavian Journal of Work and Environmental Health*. 1982; 8: 191-200.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 1986; 250: 815-821.

Satarug S, Moore MR. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental Health Perspectives*. 2004; 112: 1099–1103.

Satarug S, Nishijo M, Ujjiin P, Vanavanitkun Y, Moore MR. Cadmium-induced nephropathy in the development of high blood pressure. *Toxicology Letters*. 2005; 157: 57-68.

Schwartz GG, Il'yasova D, Ivanova A. Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care*. 2003; 26: 468–470.

Simões MR, Ribeiro Júnior RF, Vescovi MVA, de Jesus HC, Stefanon I, Vassallo DV, Salaices M, Fiorese M. Acute lead exposure increases arterial pressure: role of renin-angiotensin system. *PLoS One*. 2011; 11;6 e 18730.

Skeegs LT, The existence of two forms of hyperensin. *The Journal of Experimental Medicine*. 1954; 100: 363.

Skoczynska A, Martynowicz H. The impact of subchronic cadmium poisoning on the vascular effect of nitric oxide in rats. *Human and Experimental Toxicology*. 2005; 24: 353-61.

Sompamit K, Kukongviriyapan U, Donpunha W, Nakmareong S, Kukongviriyapan V. Reversal of cadmium-induced vascular dysfunction and oxidative stress by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in mice. *Toxicology Letters*. 2010; 198: 77-82.

Sorahan T, Lancashire RJ. Lung cancer mortality in a cohort of workers employed at a cadmium recovery plant in the United States: an analysis with detailed job histories. *Occupational and Environmental Medicine*. 1997; 54: 194-201.

Sorahan T, Waterhouse JA. Mortality study of nickel-cadmium battery workers by the method of regression models in life tables. *British Journal of Industrial Medicine*. 1983; 40: 293-300.

Staessen JA, Buchet JP, Ginucchio G, Lauwerys RR, Lijnen P, Roels H, Fagard R. Public health implications of environmental exposure to cadmium and lead: an overview of epidemiological studies in Belgium. Working Groups. *Journal of Cardiovascular Risk*. 1996; 3: 26-41.

Staessen JA, Kuznetsova T, Roels HA, Emelianov D, Fagard R. Exposure to cadmium and conventional and ambulatory blood pressures in a prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium Study Group. *American Journal of Hypertension*. 2000; 13: 146-56.

Strålin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1995; 15: 2032-6.

Stroes E, Hijmering M, Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*. 1998; 438: 161-164

Subramanyam G, Bhaskar M, Govindappa S. The role of cadmium in induction of atherosclerosis in rabbits. *Industrial Health Journal*. 1992; 44: 177-80

Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fukatsu A, Hayashi T, Alp NJ, Channon MK, Yokoyama M, Kawashima S. A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2007; 27: 1632-1637.

Tanyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003; 42: 1075-1081.

Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Crainiceanu CM, Guallar E. Cadmium exposure and hypertension in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116: 51-6.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species and Hypertension: A complex association. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008; 10: 1041-1044.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology*. 2004; 122: 339-352.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews*. 2000; 52: 639-672.

Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ella SMN, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2003; 39: 249-267.

Tzotzes V, Tzilalis V, Giannakakis S, Saranteas T, Papas A, Mourouzis I, Mourouzis C, Zarros A, Pantos C, Cokkinos D, Carageorgiou H. Effects of acute and chronic cadmium administration on the vascular reactivity of rat aorta. *Biometals*. 2007; 20: 83-91.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 2005; 12: 1161-208.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica (Oxf)*. 2009, 196: 193-222.

Verougstraete V, Lison D, Hotz P. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2003; 6: 227-55.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. DBH VI. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2010; 17(1):4.

Watkin RD, Nawrot T, Potts RJ, Hart BA. Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 2003; 184: 157-78.

Weeks ME, Leicester HM. Discovery of elements. Pennsylvania: Journal of Chemical Education. 1968; 7^a ed: 896pp.

Whyte AL, Raumati, Hook G, Greening GE, Gibbs-Smith E, Gardner JP. Human dietary exposure to heavy metals via the consumption of greenshell mussel (*Perna canaliculus* Gmelin 1791) from the Bay of Islands, northern New Zealand. *Science of the Total Environment*. 2009; 407: 4348-4355.

Wolf MB, Baynes JW. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals*. 2007; 20: 73-81.

World Health Organization (WHO). Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva. 1993. (Technical Report Series 837).

World Health Organization (WHO). IPCS. Environmental Health Criteria 134 Cadmium. Geneva, 1992. 148pp.

Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1994; 56: 576-82.

Yanagisawa M, Kurihara S, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*. 1988; 322: 411-415.

Yiin SJ, Chern CL, Sheu JY, Lin TH. Cadmium induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. *Biometals*. 1999; 12: 353-9.

Yoopan N, Watcharasit P, Wongsawatkul O, Piyachaturawat P, Satayavivad J. Attenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. *Toxicology Letters*. 2008; 176: 157-161.