

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

RAKEL PASSOS SIMÕES DANTAS

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A REATIVIDADE
VASCULAR E PARÂMETROS MORFOFUNCIONAIS DA AORTA DE RATOS
EXPOSTOS POR TRINTA DIAS AO CLORETO DE CÁDMIO**

VITÓRIA - ES

2025

RAKEL PASSOS SIMÕES DANTAS

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A REATIVIDADE
VASCULAR E PARÂMETROS MORFOFUNCIONAIS DA AORTA DE RATOS
EXPOSTOS POR TRINTA DIAS AO CLORETO DE CÁDMIO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alessandra Simão Padilha. Coorientador: Prof^o. Dr. Dalton Valentim Vassallo

VITÓRIA - ES

2025

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

S593e Simões, Rakel Passos, 1991-
EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A
REATIVIDADE VASCULAR E PARÂMETROS
MORFOFUNCIONAIS DA AORTA DE RATOS EXPOSTOS
POR TRINTA DIAS AO CLORETO DE CÁDMIO / Rakel
Passos Simões. - 2025.
(recurso não paginado). : il.

Orientadora: Alessandra Simão Padilha.
Coorientador: Dalton Valentim Vassallo.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Ácido elágico. 2. Cádmio. 3. Reatividade vascular. 4.
Disfunção endotelial. 5. Estresse oxidativo. I. Padilha, Alessandra
Simão. II. Vassallo, Dalton Valentim. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612



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

Ata da sessão de defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **RAKEL PASSOS SIMÕES**, candidata ao título de Doutora em Ciências Fisiológicas, realizada às 14:00h do vigésimo nono dia do mês de agosto do ano dois mil e vinte e cinco, na Universidade Federal do Espírito Santo, de forma híbrida. A presidente da Banca, Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Simão Padilha apresentou os demais membros da comissão examinadora, constituída pelos professores doutores: Glaucia Rodrigues de Abreu da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), Karolini Zuqui Nunes da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), Priscila Rossi de Batista da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM) e Camila Almenara Cruz Pereira da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) e Andressa Bolsoni Lopes da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes) e Sabrina Bertoli Rodrigues (Faculdade Novo Milênio) como suplentes internos e externos respectivamente. Em seguida, cedeu a palavra à candidata que em 50 minutos apresentou sua Tese intitulada **“EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR E PARÂMETROS MORFOFUNCIONAIS DA AORTA DE RATOS EXPOSTOS POR TRINTA DIAS AO CLORETO DE CÁDMIO”**. Terminada a apresentação da aluna, a presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. A presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e a presidente informou aos presentes que a Tese havia sido aprovada e que a aluna deve providenciar dentro do período de 90 dias, a versão final da Tese. A Presidente, então, deu por encerrada a sessão e lavrou a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
gov.br CAMILA ALMENARA CRUZ PEREIRA
Data: 26/09/2025 10:11:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

de 2025.

Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Simão Padilha
(PPGCF-Ufes) – Orientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br PRISCILA ROSSI DE BATISTA
Data: 25/09/2025 10:35:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª Dr^ª Priscila Rossi de Batista
(EMESCAM) – Titular externo

Prof^ª Dr^ª Camila Almenara Cruz Pereira
(UFOB) – Titular externo

Prof^ª. Dr^ª. Karolini Zuqui Nunes
(PPGCF - Ufes) – Titular interno

Prof^ª. Dr^ª. Glaucia Rodrigues de Abreu
(PPGCF - Ufes) - Titular interno



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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
GLAUCIA RODRIGUES DE ABREU - SIAPE 1172974
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 23/09/2025 às 17:38

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1207329?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
KAROLINI ZUQUI NUNES - SIAPE 1215940
Departamento de Enfermagem - DE/CCS
Em 24/09/2025 às 06:48

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1207469?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ALESSANDRA SIMAO PADILHA - SIAPE 2482917
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 30/09/2025 às 11:28

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1211487?tipoArquivo=O>

*Dedico este trabalho ao meu marido Abraão,
ao meu filho Arthur e aos meus pais, Luiz e
Ivete. Sem o amor, apoio e incentivo de vocês,
esta conquista não seria possível.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu sustento, meu refúgio e o dono da minha vida. Por me fortalecer nos dias difíceis, renovar minha esperança e me conduzir com amor e propósito até aqui.

Ao meu marido, Abraão, por ser minha calma nos meus dias de desespero quando tudo dava errado, por toda paciência, amor e incentivo em todos os momentos. Amo você!

Ao meu filho Arthur, minha fonte inesgotável de alegria e força. Você chegou e bagunçou tudo, a rotina, os planos, o sono, mas trouxe consigo um amor tão grande que transformou tudo para melhor. Sua risada é meu combustível, seus beijinhos me dão força e sua existência dá novo sentido a cada conquista. Obrigada por me lembrar todos os dias do que realmente importa. Mamãe ama muito você!

Aos meus pais, meu mais profundo agradecimento. Obrigada por abrirem mão de estarem juntos durante todos esses meses para que minha mãe pudesse estar ao meu lado, me ajudando com Arthur e demais atividades, me permitindo concluir essa etapa. Pai, obrigada por apoiar essa decisão com tanto amor e por enfrentar a distância e a solidão de tantos dias longe. Mãe, não há palavras que possam expressar minha gratidão por tudo o que você fez, sua leveza no dia a dia, seu cuidado comigo, Abraão e Tutu. Que privilégio tivemos por ter você conosco esse tempo. Pai e mãe, vocês são incríveis, obrigada pela força e por não me deixarem desistir. Amo vocês com todo meu coração.

À minha irmã, Maylla, Rah, Otávio e Livinha, agradeço pelo incentivo constante, pelas palavras de apoio e por todos os momentos de alegria que tornaram essa caminhada mais leve.

Aos meus sogros, Varli e Samuel, obrigada por todo carinho, momentos de alegria, apoio, e por cuidarem do Arthur com tanto carinho sempre que precisei.

Às minhas tias, Marta e Beth, minha rede de apoio fiel e generosa, obrigada por estarem sempre por perto, por cada café, cada almoço preparado com amor, e, principalmente, por cuidarem do Arthur nos dias em que precisei trabalhar. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse continuar. Amo vocês tias!

À Ale, por ser minha mãe científica ao longo desses anos, por ter depositado sua confiança em mim, por todos os ensinamentos, formas de apoio, pela paciência, e por sempre transmitir paz e tranquilidade nos

meus momentos de desespero. Obrigada por tudo Chefa, você é muito especial.

Ao Prof. Dalton, meu querido Chefe, por ter me recebido tão bem no LEMC, pelos conselhos e orientações, é admirável ver o seu amor pela pesquisa. Te agradeço por ter compartilhado comigo o conselho do seu querido Pai, e ter me feito “parar” pra depois seguir, como foi bom seu conselho! Obrigada por tudo Chefito. Você é muito especial e querido.

Agradeço à Ingridy, minha amiga e irmã mais nova de longa data. Obrigada por estar presente em tantos momentos ao longo desses anos, pelos desabafos, pelo ombro amigo, pelas parcerias e pelos dias de alegria. Sua amizade é um presente precioso na minha vida. Amo você neguinha.

À Renatinha, amiga com quem compartilho a experiência única da maternidade, obrigada por dividir comigo tantas dúvidas, inseguranças e, sobretudo, alegrias. Como é bom ter você nessa jornada! Sua presença é sempre acolhedora, e sua ajuda constante fez toda a diferença. Obrigada pela parceria também na vida científica, você foi essencial! Que nossa amizade continue muito além do LEMC.

À Carol Ximenes e à Sabrina, minha gratidão pelas conversas, pelas risadas e pelo apoio nos momentos de desespero. Que sorte a minha ter a amizade de vocês para além do LEMC. Vocês são muito especiais e queridas.

Ao TeamPadilha: À Lorraine e à Camilla, meu agradecimento especial por todos os momentos vividos dentro do laboratório, pelas parcerias verdadeiras ao longo desses anos, pelos longos e intermináveis dias de experimentos e novas levas. Sem o apoio, a paciência, parceria e a dedicação de vocês, eu não teria conseguido finalizar este projeto. Essa vitória também é de vocês, meninas! Obrigada pela amizade, por dividir as angústias e principalmente as alegrias, vocês são especiais pra mim. Ao Kevin, por estar sempre disposto a ajudar nos momentos mais caóticos dos experimentos, obrigada pela amizade. Ao Vini, pela troca valiosa sobre protocolos experimentais e criação de filhotes, que sempre renderam boas conversas. Ao Mateus pelo suporte nos dias de experimentos, tratamento e cuidado com os animais. E a João e Abner por toda ajuda no cuidado dos animais e nos experimentos.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LEMC pelas risadas e conversas, por toda ajuda, pelos momentos agradáveis, pelos almoços no RU e por deixarem tudo mais leve, Nina, Karolzinha, Julinha, Manu, Gabriel, Pietra, Larissa, Lais, Larissa Biazatti, Fernanda, Anna, Mônica e Jefferson, vocês são especiais!

Aos queridos professores do LEMC, Iva e Leo, minha gratidão por todos os ensinamentos ao longo desses anos e por serem inspirações como docentes e pesquisadores. As professoras Andressa e Karol Zuqui, que movimentaram o laboratório, trazendo mais alegria e contribuição científica.

Aos demais professores da pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFES, por todo conhecimento compartilhado, pelas excelentes aulas ministradas e por serem espelho pra mim, vocês foram fundamentais nessa caminhada.

Aos demais colegas da pós-graduação que sempre foram solícitos quando precisei, sempre me trataram com respeito e de certa forma contribuíram para meu desenvolvimento.

Aos Laboratórios Multiusuários: LHT, LHMI, LUCCAR e outros, ao Biotério Central, e os técnicos envolvidos, que foram essenciais para a realização deste trabalho, em especial ao Rodolpho, Dani, Mario, Viviane, Flavio, Tadeu... Obrigada pela parceria ao longo desses anos.

A UFES, CAPES, FAPES e CNPQ pelo apoio financeiro e por todas as oportunidades acadêmicas proporcionadas.

RESUMO

O cádmio (Cd) é um metal pesado tóxico amplamente presente no ambiente, cuja exposição crônica está associada a diversos efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular, incluindo hipertensão arterial e disfunção endotelial. O ácido elágico (AE), um polifenol natural com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e quelantes, tem sido apontado como um potencial agente protetor vascular. Este estudo investigou os efeitos do AE sobre as alterações cardiovasculares induzidas por exposição subcrônica ao CdCl₂ (100 ppm por 30 dias) em ratos Wistar. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Controle (Ct), Cd, AE e Cd+AE. O Cd foi administrado pela água de beber e o AE por gavagem (30 mg/kg/dia). A pressão arterial sistólica (PAS) foi monitorada semanalmente por pletismografia de cauda. Ao final do protocolo, a concentração sanguínea de Cd foi compatível com níveis observados em exposições ocupacionais humanas (31,15 ± 2,8 µg/L). Para avaliação da função vascular, anéis de aorta torácica foram montados em banho de órgãos e submetidos a protocolos com fenilefrina, acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS), com ou sem endotélio, e na presença de inibidores (L-NAME, apocinina, catalase, alopurinol e SOD). A exposição ao Cd reduziu o peso corporal, aumentou a PAS, elevou a reatividade à fenilefrina e comprometeu o relaxamento endotelial, efeitos associados à menor biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). Também foi observada maior deposição de colágeno e danos nas células endoteliais. O tratamento com AE preveniu essas alterações, restaurando a função endotelial, normalizando o tônus vascular e preservando os níveis de colágeno e a integridade das células endoteliais. Esses achados indicam que o AE exerce um efeito protetor significativo frente à toxicidade vascular induzida pelo Cd, mostrando-se promissor como agente funcional na prevenção de doenças cardiovasculares.

Palavras- chave: ácido elágico, cádmio, reatividade vascular, disfunção endotelial, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal widely present in the environment, and its chronic exposure is associated with several deleterious effects on the cardiovascular system, including arterial hypertension and endothelial dysfunction. Ellagic acid (EA), a natural polyphenol with antioxidant, anti-inflammatory, and chelating properties, has been proposed as a potential vascular protective agent. This study investigated the effects of EA on cardiovascular alterations induced by subchronic exposure to CdCl₂ (100 ppm for 30 days) in Wistar rats. Animals were divided into four experimental groups: Control (Ct), Cd, EA, and Cd+EA. Cd was administered via drinking water, and EA was given by gavage (30 mg/kg/day). Systolic blood pressure (SBP) was monitored weekly using tail-cuff plethysmography. At the end of the protocol, blood Cd concentration was consistent with levels observed in human occupational exposure (31.15 ± 2.8 µg/L). To assess vascular function, thoracic aortic rings were mounted in organ baths and subjected to protocols with phenylephrine, acetylcholine (ACh), and sodium nitroprusside (SNP), with or without endothelium, and in the presence of inhibitors (L-NAME, apocynin, catalase, allopurinol, and SOD). Cd exposure reduced body weight, increased SBP, enhanced vascular reactivity to phenylephrine, and impaired endothelium-dependent relaxation, effects associated with reduced nitric oxide (NO) bioavailability and increased reactive oxygen species (ROS) production. Increased collagen deposition and endothelial cell damage were also observed. EA treatment prevented these changes, restoring endothelial function, normalizing vascular tone, and preserving collagen content and endothelial cell integrity. These findings indicate that EA exerts a significant protective effect against Cd-induced vascular toxicity and appears promising as a functional agent for the prevention of cardiovascular diseases.

Keywords: Ellagic acid; Cadmium; Vascular reactivity; Endothelial dysfunction; Oxidative stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS, FITOQUÍMICOS E POLIFENÓIS.....	16
1.2 ÁCIDO ELÁGICO	17
1.2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO NO ORGANISMO	20
1.2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÁCIDO ELÁGICO	21
1.3 CÁDMIO.....	25
1.3.1 EFEITOS DO CÁDMIO SOBRE OS DIVERSOS SISTEMAS.....	32
1.3.2 EFEITOS DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	34
1.3.3 ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO CÁDMIO.....	36
1.3.4 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA PELO CÁDMIO	38
2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	41
3. HIPÓTESE DO ESTUDO.....	42
4. OBJETIVO	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	44
6. RESULTADOS	62
7. DISCUSSÃO	92
8. CONCLUSÃO	120
9. ANEXO	123
10. REFERÊNCIAS.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ácido elágico livre (A) e glicosilado (B).	18
Figura 2. Fontes alimentares de ácido elágico	19
Figura 3. Propostas de vias para a conversão de ácido elágico em novas urolitinas. Em vermelho, o novo ramo catabólico (García-Villalba et al 2019)..	21
Figura 4. Fontes e vias de exposição ao cádmio. Elaboração própria com auxílio da ferramenta ChatGPT (OpenAI, 2025).....	27
Figura 5. Principais rotas de exposição ao Cádmio e seus efeitos tóxicos nas diferentes partes do corpo. Fonte: ROSSI (2022, p.23).	28
Figura 6. Alterações na estrutura óssea após intoxicação ambiental no século XX, no Japão, desenvolvendo a doença Itai-itai (DÖKMECI; ONGEN, 2009) .	29
Figura 7. Camadas da aorta (modificado de ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015; adaptado de ROSSI, 2022).	40
Figura 8. (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 conectivos e adiposo, sendo cortada em anéis de aproximadamente 4 mm.....	48
Figura 9. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems.	49
Figura 10. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do MLV com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (20 min) na tensão de 1g. B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10 ⁻⁷ M ou mais até atingir 80% do 2º KCl; J) Adição de acetilcolina (ACh) 10 ⁻⁵ M; L) Troca de solução Krebs-Henseleit e período de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.	50

Figura 11. Representação dos quadrantes para captura das imagens para análise (Elaborado pela própria autora) 60

Figura 12. Avaliação do ganho de peso dos animais ao longo das semanas de tratamento. Número amostral está indicado entre parênteses. Valores expressos por média $\pm$ EPM; ANOVA duas vias e pós-teste de Tukey: * $p < 0,05$ vs Ct; # $p < 0,05$ - vs Cd; & $p < 0,05$ vs AE. 63

Figura 13. Média da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de pletismografia de cauda em ratos dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE, ao longo das semanas de exposição e/ou tratamento. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias e pós teste Tukey. * $p < 0,05$ vs Ct; # $p < 0,05$ vs AE e Cd+AE; & $p < 0,05$ vs Cd, semana 0. 64

Figura 14. Avaliação da integridade funcional do MLV da aorta ao KCl (75 mM) nos grupos Ct, Cd, Cd+AE e AE. Os resultados (média $\pm$ EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA uma via. $p > 0,05$... 65

Figura 15. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica nos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses. Valores expressos em média e EPM. ANOVA duas vias, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ - vs Ct, AE e Cd+AE..... 66

Figura 16. Participação do endotélio vascular na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica nos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com endotélio e os respectivos grupos após remoção do endotélio (E-); (E) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) para comparação entre os grupos. Valores expressos em média e EPM, número de animais representado entre parênteses. ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs curva controle correspondente. ANOVA uma via e pós-teste de Bonferroni foi usado na dAAC, * $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE..... 68

Figura 17. Resposta dilatadora induzida pela ACh em anéis de aorta dos grupos Ct, AE, Cd e Cd+AE. Valores expressos em média e EPM, expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. ANOVA duas vias, pós-teste de Tukey. # $p < 0,05$ - vs Ct; * $p < 0,05$ - vs Ct, AE e Cd+AE. Número de animais representado entre parênteses. 70

Figura 18. Curva de relaxamento ao NPS em anéis de aorta dos grupos Ct, AE, Cd e Cd+AE com o endotélio mecanicamente removido para avaliação do relaxamento independente do endotélio. Valores expressos como percentual do relaxamento após pré-contracção com fenilefrina. ANOVA duas vias, pós-teste de Tukey. $P > 0,05$. Número de animais representado entre parênteses. 71

Figura 19. Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 μ M) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos da aorta torácica dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com L-NAME e os respectivos grupos sem intervenção. Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta (dAAC%) para comparação entre os grupos (E). Valores expressos em média e EPM, número de animais representados entre parênteses. ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs curva controle correspondente. ANOVA uma via e pós-teste de Bonferroni foi usado na dAAC, * $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE. 73

Figura 20. Detecção “in situ” do NO em segmentos de aorta. (A) Fotomicrografias de fluorescência representam segmentos de aorta na presença da sonda fluorescente sensível ao NO 4,5-diaminofluoreceim (DAF-2DA) nos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. (B) Gráfico de barras demonstrando a análise semi-quantitativa dos níveis de fluorescência. Dados expressos como média $\pm$ EPM da densidade de fluorescência. Análise comparativa realizada por ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE. 74

Figura 21. Participação de ânion superóxido na reatividade vascular à fenilefrina de segmentos aorticos com exposição crônica ao cloreto de cádmio e/ou co-tratamento com AE. Efeito do varredor de ânion superóxido, SOD (150 U/ml), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com SOD e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados estão indicados entre parênteses. Os resultados (média $\pm$ EPM) da resposta à fenilefrina estão expressos em porcentagem da contração induzida por 75 mM KCl. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ - vs Cd. 76

Figura 22. Análise densitométrica do Western blotting para expressão da isoforma Cu/Zn-SOD (SOD1) (A) e isoforma mitocondrial Mn-SOD (SOD2) (B) na aorta de ratos dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica. (A) Bandas da isoforma Cu/Zn citosólica da enzima superóxido dismutase (SOD1) e (B) Bandas da Mn-SOD (SOD2) corrigidas pelo conteúdo de proteína total. Número de animais utilizados está indicado entre parênteses. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, entre a densidade das bandas. ANOVA uma via e pós teste de Fisher. Para (A) $p > 0,05$; (B) * $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE; # $p < 0,05$ vs Ct 77

Figura 23. Efeitos da exposição ao Cd e/ou AE sobre atividade antioxidante da SOD nos anéis de aorta de animais do grupo Ct, Cd, AE e Cd+AE. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs Ct, Cd e AE. 78

Figura 24. Participação de H_2O_2 na reatividade vascular à fenilefrina de segmentos aórticos com exposição ao Cd e/ou AE. Efeito da catalase (1000 U/mL) que degrada H_2O_2 em oxigênio e água, sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com catalase e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados estão indicados entre parênteses. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. $p > 0,05$ 79

Figura 25. Efeito do inibidor não seletivo da NADPH oxidase com Apocinina (30 μ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com Apocinina e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados indicados entre parênteses. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ - vs Cd. 80

Figura 26. Resultados da expressão proteica da subunidade NOX4 da enzima NADPH oxidase, por meio da técnica de Western Blotting, em segmentos de aorta torácica dos grupos Ct (n=6), Cd (n=5), AE (n=5) e Cd+AE (n=6). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a subunidade da NOX4, corrigidas pela proteína total. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, como relação entre a densidade das bandas da NOX4 e da α -actina. ANOVA uma via pós teste Fisher's LSD* $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE. 81

Figura 27. Efeito da Xantina oxidase (100 μ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com Alopurinol e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados estão indicados entre parênteses. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ 83

Figura 28. Detecção *in situ* de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em segmentos de aorta torácica. Imagens de fluorescência representativas de cortes transversais de aorta corados com diidroetídio (DHE) em animais dos grupos Controle (Ct), Cádmio (Cd), Ácido Elágico (AE) e Cádmio com co-tratamento com ácido elágico (Cd+AE). A coloração em vermelho indica a presença de ânion superóxido, enquanto a marcação em azul (DAPI) representa os núcleos celulares. O gráfico de barras apresenta a análise semiquantitativa da intensidade de fluorescência ao DHE, expressa em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O número de animais por grupo está indicado entre parênteses. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ versus Ct, AE e Cd+AE. 84

Figura 29. Resultados da expressão proteica do fator de transcrição mitocondrial NRF-1 (Fator Respiratório Nuclear-1), por meio da técnica de Western Blotting, em segmentos de aorta dos grupos Ct (n=6), Cd (n=6), AE (n=6) e Cd+AE (n=6). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, corrigidas pela proteína total. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, como relação entre a densidade das bandas. ANOVA uma via pós teste Fisher's LSD, * $p < 0,05$ vs Ct; AE e Cd+AE. 85

Figura 30. Análise dos níveis de TBARS. Efeitos da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico sobre os níveis de peroxidação lipídica. Os níveis de TBARS foram quantificados em anéis de aorta dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE, como indicador da peroxidação lipídica. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. 87

Figura 31. Análise dos níveis de AOPP. Efeitos da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico sobre os níveis de produtos finais de oxidação de proteínas (AOPP) na aorta. A quantificação foi realizada nos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via. $p > 0,05$ 88

Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura mostrando fotomicrografia representativa da estrutura endotelial de aorta de ratos dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. Barra de escala 10 μ m (ampliação de x1000) para imagens A, B, C e D. Barra de escala 5 μ m (ampliação de x3000) para imagens A1, B1, C1 e D1. ... 88

Figura 33. Efeito da exposição ao cádmio e ao ácido elágico por 30 dias na relação parede/lúmen e espessura íntima-média em segmentos da aorta torácica de ratos, coradas com hematoxilina e eosina. (A) Secção da aorta na objetiva de 4x, em escala de 500 μ m e (B) na objetiva de 40x, em escala de 50 μ m. As análises realizadas (C) razão parede/lúmen e (D) espessura íntima-média mensuradas nos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. Resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. Número de animais está indicado entre parênteses. 90

Figura 34. Efeito da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico por 30 dias sobre o conteúdo de elastina de segmentos da aorta torácica de ratos, coradas com Verhoeff Van Gieson. (A) Secção da aorta na objetiva de 4x, em escala de 500 μ m e (B) na objetiva de objetiva de 40x, em escala de 50 μ m. Resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. Número de animais está indicado entre parênteses. 91

Figura 35. Efeito da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico por 30 dias no conteúdo de colágeno nos segmentos da aorta torácica de ratos dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE, coradas utilizando a técnica Picrosirius. (A) Secção da aorta na objetiva de 4x, em escala de 500 μ m e (B) na objetiva de 40x, em escala de 50 μ m. Número de animais está indicado entre parênteses. (C) Gráfico com

percentuais da deposição de colágeno. Valores expressos em média $\pm$ EPM.
*p<0,05 vs Ct, AE e Cd+AE; #p<0,05 vs Cd+AE..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de Cd no sangue total de ratos dos grupos experimentais Ct, AE, Cd e Cd+AE após 30 dias de exposição. 62

Tabela 2. Peso corporal (g) ao longo das semanas de exposição ao cádmio e/ou ácido elágico. 63

Tabela 3. Valores médios da PAS dos animais dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE semanalmente ao longo dos 30 dias de exposição e/ou tratamento. 65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ACh: Acetilcolina

ATP: Trifosfato de adenosina

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry CAPES:

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX: Ciclooxigenase

COX-1: Isoforma da ciclooxigenase tipo 1

COX-2: Isoforma da ciclooxigenase tipo 2

Ct: Controle

Cu/Zn SOD; SOD1: Superóxido dismutase cobre/zinco

dAAC: Diferença da área abaixo da curva

DHE: Dihidroetídio

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FE: Fenilefrina

g: grama

Hg: Mercúrio

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

KCl: Cloreto de potássio

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

M: Molar

mg: miligramas

mL: mililitro

mM: milimolar

MLV: Músculo liso vascular

NADPH - Adenina dinucleotídeo fosfato

NPS: Nitroprussiato de sódio

nM: Nanomolar

NO: Óxido nítrico

NOS: NO sintase

eNOS: NO sintase endotelial

ONOO⁻: Peróxido de nitrito

O₂ •⁻: Ânion superóxido

OH•: Radical hidroxila

PGI₂: Prostaciclina

SOD: Superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

1. INTRODUÇÃO

1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS, FITOQUÍMICOS E POLIFENÓIS

A alimentação exerce papel fundamental na manutenção da saúde humana, havendo uma estreita relação entre o padrão alimentar e o estado geral de saúde. Nesse contexto, os alimentos que contêm ingredientes biologicamente ativos têm sido classificados como alimentos funcionais, devido à sua capacidade de promover efeitos fisiológicos benéficos e contribuir para a prevenção de diversas doenças crônicas (ALKHATIB et al., 2017). Entende-se por alimentos funcionais os alimentos naturais ou processados que possuam qualquer substância ou composto bioativo com a capacidade de proporcionar benefícios para a saúde e bem-estar dos indivíduos, além das necessidades nutricionais (WILSON et al., 2017). Enfim, promovem benefícios para a prevenção, manejo e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, contudo, não são considerados um nutriente essencial como as vitaminas e minerais encontrados nos alimentos de modo geral (EL GHARRAS, 2009; WILSON et al., 2017).

Nas últimas décadas, pesquisas vem apontando a importância de incluir alimentos funcionais na dieta para promoção da saúde e prevenção de doenças, e nesse contexto os fitoquímicos são fundamentais. Evidências epidemiológicas indicam uma relação inversa entre mortalidade por doenças cardiovasculares e dietas ricas em frutas, vegetais e nozes com alto teor de fitoquímicos (LARSSON et al., 2013; WANG et al., 2014). Os compostos fenólicos ou polifenóis são um vasto e heterogêneo grupo de fitoquímicos, os quais representam uma ampla classe de metabólitos secundários de plantas que apresentam diversas propriedades para sua defesa e sobrevivência contra raios ultravioleta, temperaturas incomuns, radicais livres, estresse ambiental, dentre outros (DI PIETRO et al., 2020; EL GHARRAS, 2009; GRAZIOLI et al., 2021).

Em virtude da sua característica química estrutural, o polifenol é um composto de grande interesse para os pesquisadores de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo, visto que apresenta anéis fenólicos em sua estrutura química,

os quais são capazes de reduzir as EROs assim como alguns substratos orgânicos e minerais. Isto é, seus benefícios estão intimamente ligados a sua propriedade antioxidante (DI PIETRO et al., 2020; EL GHARRAS, 2009; LEE et al., 2010). Por conseguinte, possui potencial de modular diferentes alvos na prevenção de doenças cardiovasculares como pressão arterial, lipídeos no sangue, função endotelial e plaquetária, bem como reduz a progressão da aterosclerose por meio da redução da inflamação, estresse oxidativo e dos níveis de colesterol LDL (DI PIETRO et al., 2020; LEE et al., 2010; SHARIF et al., 2020). Além disso, podem atuar como quelantes de metais e agentes antimutagênicos, anticarcinogênicos e antimicrobianos, bem como agente protetor ou reestabelecedor da função mitocondrial (GRAZIOLI et al., 2021; SHARIF et al., 2020). Os polifenóis estão presentes naturalmente no tecido vegetal de cereais, frutas, verduras e legumes, sendo responsáveis pelo aroma, coloração e sabor, e são organizados em cinco grupos: flavanóides, taninos, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas (DI PIETRO et al., 2020; GRAZIOLI et al., 2021; SHARIF et al., 2020; RODRIGO et al., 2014; GALANO et al., 2016).

1.2 ÁCIDO ELÁGICO

O AE é um polifenol pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis, é um composto bioativo, de ocorrência natural, derivado dos elagitaninos (ET). O AE está presente em numerosas frutas, vegetais e nozes, apresenta efeitos farmacológicos importantes e devido ao seu potencial terapêutico tem recebido crescente atenção na comunidade científica (EVTYUGIN; MAGINA; EVTUGUIN, 2020a; LORENZO et al., 2018; RÍOS et al., 2018). A formação do AE ocorre a partir dos ET, que são ésteres de glicose com AE, presentes nos alimentos que sob condições alcalinas ou ácidas (GALANO et al., 2015; HILLIS, 1971; J. MACIERZYNSKI, M. SOJKA, 2020; LANDETE, 2011) são hidrolisados e fornecem o ácido hexahidroxidifênico, este é espontaneamente rearranjado em AE. O AE pode ser encontrado na forma de ET na composição da parede celular vegetal, na membrana celular como AE e nas plantas em sua forma livre (GALANO et al., 2015; LANDETE, 2011). O AE pode se apresentar nas formas livre, glicosilada (Figura 1) e na forma de ETs. A proporção de AE livre é variável

de acordo com o tipo de alimento, e altas temperaturas durante o processamento do alimento pode ocasionar hidrólise de ETs, aumentando o conteúdo de AE livre (ABE, 2008).

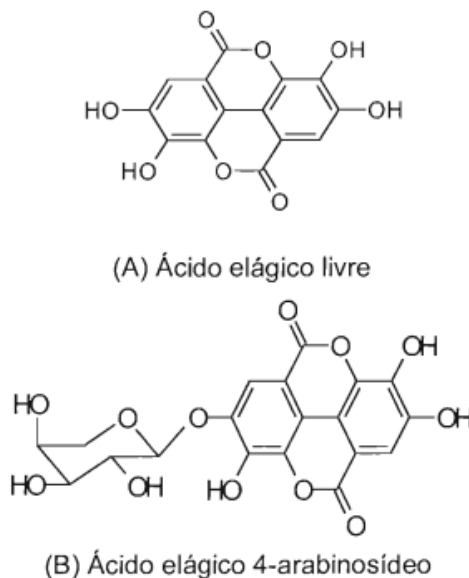


Figura 1. Estrutura do ácido elágico livre (A) e glicosilado (B).

O AE livre é uma molécula altamente estável, sua estrutura química contém quatro anéis representando o domínio lipofílico, e uma fração hidrofílica com quatro grupos hidroxila e dois grupos lactona, que desempenham um papel importante em sua atividade biológica. Esses dois grupos lactona são receptores de ligação de hidrogênio e os grupos hidroxila atuam como doadores de hidrogênio, aumentando a capacidade antioxidante da molécula ao doar um átomo de hidrogênio e estabilizar elétrons desemparelhados, protegendo assim as células contra danos oxidativos (GARCIA-NINO et al., 2015; TOKUTOMI et al., 2018; ZUCCARI et al., 2020b).

O AE é encontrado na forma de taninos hidrolisáveis chamados elagitânicos em diversas fontes alimentares como morangos, mirtilos, amoras (DANIEL et al., 1989; SEERAM N.P., LEE R., 2004), framboesa, chá verde, uvas (BOBINAIT et al., 2018; NEVES; STRINGHETA; GÓMEZ-ALONSO, 2018), manga (GUPTA et al., 2022; RIBEIRO, SCHIEBER, 2010), camu-camu (FRACASSETTI et al., 2013), romã (FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011; GONZÁLEZ-SARRÍAS et

al., 2015), goiaba (DOS SANTOS et al., 2017), nozes (FUKUDA et al., 2003; NEVES; STRINGHETA; GÓMEZ-ALONSO, 2018) e noz-pecan (VILLARREAL-LOZOYA; LOMBARDINI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; XU et al., 2020). Outras fontes de AE na nutrição humana são os alimentos à base de frutas contendo elagitaninos, produtos processados de plantas, geléias, sucos, doces de compotas (GARCIA-VILLALBA et al., 2015), e vinhos envelhecidos em barril de carvalho, ocorrendo transferência dos elagitaninos da madeira para o vinho (MENA et al., 2015).



Figura 2. Fontes alimentares de ácido elágico. Fonte: própria.

O conteúdo de AE e elagitaninos são variáveis entre os alimentos e alguns estudos descrevem as concentrações desses compostos em diferentes fontes. Em 100g de peso fresco de amora e framboesa é possível encontrar 330mg de elagitaninos (KOPONEN et al., 2007), a goiaba possui total de elagitaninos/AE de 57,2-306 mg/Kg (peso seco) (DOS SANTOS et al., 2017), um copo de suco de romã ou 100 g de framboesa podem fornecer aproximadamente 300 mg de AE, quatro nozes fornecem 400 mg de AE, uma porção de 100 g de morango possui aproximadamente 70 mg de AE (LORENZO et al., 2019), 100 g de manga pode fornecer 120 mg de AE (SOONG; BARLOW, 2006), um quilo de jabuticaba apresenta 3,11 g de AE (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012), um quilo de Noz-pecan possui um teor de 21 a 86.4 mg de AE (MALIK et al., 2009).

1.2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO NO ORGANISMO

Os fitoquímicos estão presentes nos alimentos como ETs e AE. Além disso, o AE pode estar comumente conjugado com uma unidade glicosídica, como a glicose, ou formando parte da estrutura química de ETs poliméricos nos alimentos (LARROSA; TOMAS-BARBERAN; ESPIN, 2006). Os alimentos são ingeridos, porém, os ETs não são absorvidos diretamente pelo trato gastrointestinal por apresentarem alto peso molecular, desta forma, não atingem a circulação em concentrações efetivas, sendo metabolizados em compostos menores (RAIMUNDO et al., 2021).

Após a ingestão, os ETs e AE são submetidos ao ácido estomacal que pode hidrolisar esses compostos. Estudos em humanos e modelos animais observaram que alimentos ricos em ETs são hidrolisados e no estômago e/ou intestino delgado ocorre formação de AE (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2013; SEERAM et al., 2005). No intestino delgado o AE é hidrolisado e metabolizado pela microbiota intestinal de humanos e outros mamíferos em urolitinas (Uros) (SEERAM et al., 2005; SELMA et al., 2018). Essas são formadas pela remoção de um dos grupos lactona presente no AE, seguida por reações de desidroxilação, levando a perda de grupos OH de forma sequencial com a formação das urolitinas D, C, A e B (CERDÁ et al., 2003; TOMÁS-BARBERÁN et al., 2017).

Os principais metabólitos formados a partir do AE incluem urolitina A, urolitina B e isourolitina A. Também foram identificados outros metabólitos intermediários derivados da urolitina M5, a primeira produzida a partir do AE pela abertura de um anel lactona e sua descarboxilação (ESPÍN et al., 2013). As urolitinas são facilmente absorvidas pelo organismo (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2015; SAVI et al., 2017), obtendo concentrações significativas no plasma, urina (CERDÁ et al., 2003; SEERAM N.P., LEE R., 2004), tecidos e fezes (ESPÍN et al., 2013).

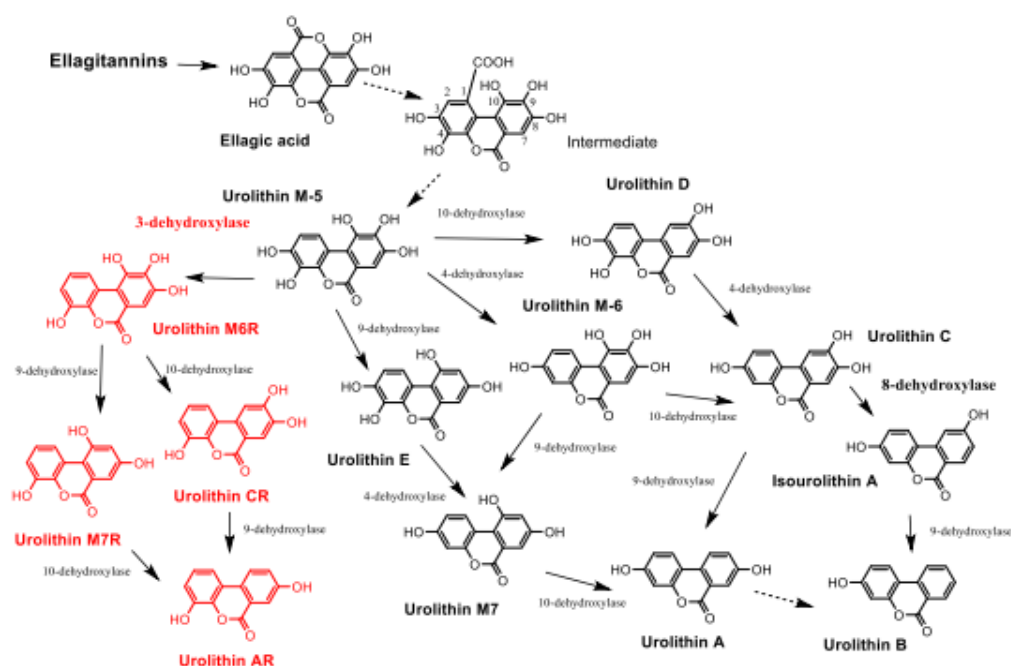


Figura 3. Propostas de vias para a conversão de ácido elágico em novas urolitinas. Em vermelho, o novo ramo catabólico (García-Villalba et al 2019).

1.2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÁCIDO ELÁGICO

Diversas propriedades profiláticas e terapêuticas estão relacionadas ao AE, e por isso, pode ser considerado um composto biologicamente ativo promissor pois além de atuar em diferentes doenças, apresenta efeitos farmacológicos em vários sistemas de modelos *in vitro* e *in vivo*. Os benefícios desse polifenol têm sido estudados por vários autores que buscam elucidar as diversas atividades biológicas que o AE e seus derivados exercem em condições patológicas.

Muitos estudos demonstram que o AE tem efeitos consideráveis para a saúde, dentre seus muitos benefícios ele previne, abranda ou retarda a progressão de doenças neurodegenerativas (BOGGIA, 2020; GUPTA et al., 2021; JAVAID, N.; SHAH, M.; RASUL, 2021; KIASALARI et al., 2017), cardiovasculares (BRAGANÇA et al., 2022; JORDÃO et al., 2017; SALINGER-MARTINOVIC, SONJA; COSIC, VLADAN; STOJILJKOVIC, 2021; YÜCE et al., 2007), diabetes (ALTINDAG, F.; RAGBETLI, M.; OZDEK, 2021; AMOR et al., 2020; POLCE et al., 2018) e câncer (DAHIYA et al., 2019; GUPTA et al., 1994; HARIKRISHNAN et al., 2019; YOUSUF et al., 2020). Além de apresentar efeitos nefroprotetores (LIU et al., 2020; NEAMATALLAH et al., 2020), antifibrótico (LI et al., 2021),

antialérgico (ALVES et al., 2013) , antidepressivo (GUPTA et al., 2019), antiaterosclerótico (CUI; CHEN; SHEN, 2017; MELE et al., 2016; ZHAO et al., 2019), osteogênico (WARDHANA et al., 2020), antimicrobiano (AL-MUGDADI et al., 2019; PULJULA et al., 2020; SAVIC, 2019), antiparasitário (AMINU et al., 2017; SOH; WITKOWSKI; AL, 2009), antifúngico (ASCACIO-VALDÉS, 2013), antiviral (ACQUADRO et al., 2020; PROMSONG, 2018), cicatrizante (GÜL et al., 2022; YUNIARTI; PRIMARIZKY; LUKISWANTO, 2018) além de protetor e despigmentante da pele (DAHL et al., 2013; KASAI et al., 2006; ORTIZ-RUIZ et al., 2016).

O AE atua como um fitoquelante natural, exercendo efeitos protetores contra a toxicidade induzida por metais, metaloides e íons metálicos (BIDANCHI et al., 2022; BJORKLUND; OLIINYK; LYSIUK, 2020; EVTYUGIN; MAGINA; EVTUGUIN, 2020a; KONTOGHIORGHES, 2020; PRZEWLOKA; SHEARER, 2002; SAHA et al., 2016). A maioria dos benefícios a saúde proporcionada pelo AE e seus metabólitos (urolitinas) tem sido associado à sua grande atividade antioxidante, ao atuar no estresse oxidativo (ALFEI; MARENGO; ZUCCARI, 2020; CECI et al., 2018; RÍOS et al., 2018), seu potencial anti-inflamatório (CORNÉLIO FAVARIN et al., 2013; ZHOU et al., 2019) e sua capacidade de quelar metais (GALANO; FRANCISCO MARQUEZ; PÉREZ-GONZÁLEZ, 2014).

Diversos estudos tem demonstrado os efeitos benéficos do AE na saúde humana e suas atividades terapêuticas em várias doenças (SHARIFI-RAD et al., 2022). Trabalhos mostram que o AE potencializa a eficácia da quimioterapia e radioterapia ao aumentar a sensibilidade de células tumorais (AHIRE et al., 2017; CECI et al., 2018). No sistema nervoso, atua como neuroprotetor e antidepressivo, melhorando memória e aprendizado por meio da modulação de vias monoaminérgicas e GABAérgicas (GUPTA et al., 2021). Além disso, reduz o estresse oxidativo cerebral e previne déficits cognitivos em modelos de demência (BANSAL; YADAV; KUMAR, 2017).

Em pacientes diabéticos a ingestão de suco de romã (250mL/dia) por 12 semanas constatou redução dos níveis de marcadores inflamatórios (SOHRAB et al., 2017). Ratos com diabetes induzida e elevada pressão arterial ingeriram por quatro semanas o extrato de romã (100 e 300mg/kg), este foi capaz de aumentar produção de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase

(SOD), catalase (CAT) e glutathione redutase (GSH) e assim reverter os efeitos da diabetes induzida e reduzir a pressão arterial (MOHAN; WAGHULDE; KASTURE, 2010). O estudo de Liu e colaboradores observou que o AE exerce seu efeito renoprotetor através da supressão da via de sinalização NOX4/JAK/STAT, e dessa forma protege o tecido de lesão por isquemia-reperfusão em ratos (LIU et al., 2020). Outro estudo observou que em ratos com toxicidade renal induzida por cisplatina, o tratamento com AE foi capaz de neutralizar os marcadores de lesão renal, os indicadores de estresse oxidativo e restaurar a degeneração do tecido renal (NEAMATALLAH et al., 2020).

Diversos estudos têm investigado os benefícios do AE e de seus metabólitos, como as ETs e urolitinas, sobre a função vascular. De Nigris e colaboradores (NIGRIS et al., 2005, 2007) demonstraram que a exposição de células endoteliais humanas aos ETs promoveu aumento da expressão da eNOS, indicando uma melhora na biodisponibilidade de NO, um mediador essencial para o tônus vascular e a saúde endotelial. Em continuidade, Papoutsis et al. (2008) observaram que os ETs também foram capazes de inibir a agregação plaquetária e a adesão de monócitos às células endoteliais, além de reduzir a expressão de moléculas pró-aterogênicas como ICAM-1 e VCAM-1, que facilitam a migração de células inflamatórias para a parede vascular.

Complementando essas evidências, estudos in vivo reforçam os efeitos vasoprotetores do AE e de seus metabólitos em diferentes modelos experimentais. Cui, Chen e Shen (2017), por exemplo, relataram que a administração de urolitina A (3 mg/kg/dia) por doze semanas em ratos submetidos à lesão aórtica induzida e dieta hipercolesterolêmica resultou em redução significativa de lipídios plasmáticos, Ang II e melhora da lesão na aorta (CUI; CHEN; SHEN, 2017). Kannan e Quine (2011) demonstraram que o pré-tratamento com AE (15 mg/kg) por dez dias, reduziu a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos com hipertensão induzida por isoproterenol (KANNAN; QUINE, 2011).

Além disso, o estudo de Berkban et al. (2015) mostrou que o AE (15 mg/kg, por cinco semanas) foi capaz de restaurar a biodisponibilidade de NO em ratos hipertensos por L-NAME, aumentando a atividade da eNOS e reduzindo o estresse oxidativo por meio da inibição da subunidade p47phox da NADPH

oxidase (BERKBAN et al., 2015a). Dados semelhantes foram observados por Jordão et al. (2017), que relataram melhora da função endotelial e redução da pressão arterial em ratos hipertensos tratados com AE (10 e 30 mg/kg/dia) por cinco semanas (JORDÃO et al., 2017).

O AE exerce seus efeitos antioxidantes por meio de ações primárias e secundárias, e isso o classifica como um antioxidante de múltiplas funções. Sua proteção química antioxidante se enquadra em dois modos de ação, antioxidantes primários (ou tipo I) que previnem oxidação agindo como varredores de radicais livres, e antioxidantes secundário (ou tipo II), que age indiretamente, ativando vias antioxidantes e retardando o processo de oxidação (GALANO et al., 2015). A capacidade do AE de eliminar radicais livres está relacionada a sua propriedade antioxidante intrínseca. Isso ocorre, pois, sua estrutura química possui quatro grupos funcionais hidroxila e dois grupos funcionais lactona que atuam como receptor e doador de hidrogênio, respectivamente (KAHKONEN; AL, 2012; QIU; AL, 2013). Essas características químicas permitem que o AE elimine uma grande variedade de EROs e ERNs, possibilitando a eliminação de $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2 , $ONOO^-$ (NUGROHO et al.; 2014), e assim proteger importantes moléculas contra os radicais livres (ALFEI; MARENGO; ZUCCARI, 2020).

O AE apresenta potente ação antioxidante, sendo capaz de regular positivamente a expressão de mRNA de importantes vias antioxidantes, como Nrf2, GPX1 e HO-1, conforme demonstrado por Zhang e colaboradores (2022). A ativação do fator de transcrição Nrf2, que atua como sensor do estresse oxidativo, promove a indução de genes antioxidantes e ocorre em resposta ao aumento das EROs (BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2017; DING et al., 2014a), regulando, entre outras enzimas, a heme oxigenase-1 (HO-1) (YAN et al., 2018). Além disso, o AE contribui para o aumento da atividade de enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além de favorecer a ação de antioxidantes biológicos não enzimáticos (PERFORMANCE et al., 2024; ZHANG et al., 2022). Em relação à sua atividade anti-inflamatória, o AE atua reduzindo a atividade do fator nuclear-kB (NF-kB), além de inibir enzimas pró-inflamatórias como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e o citocromo P-450, mecanismos que colaboram para a modulação de

processos inflamatórios associados ao estresse oxidativo (EL-SHITANY; EL-BASTAWISSY; EL-DESOKY, 2014; KUMAR et al., 2012). Por fim, outro mecanismo de ação relevante do AE é sua capacidade de quelar metais, o que contribui para a redução do estresse oxidativo induzido por metais tóxicos ao limitar sua biodisponibilidade e impedir seus efeitos prejudiciais no organismo (GALANO; FRANCISCO MARQUEZ; PÉREZ-GONZÁLEZ, 2014).

Considerando seus mecanismos de ação antioxidante e os efeitos protetores já demonstrados, o AE desponta como uma estratégia promissora frente a diferentes agentes agressivos, incluindo poluentes ambientais e substâncias com elevado potencial oxidante. Nesse contexto, destaca-se seu possível papel na atenuação dos efeitos tóxicos induzidos por metais pesados, especialmente o Cd, cuja exposição tem sido amplamente associada a distúrbios cardiovasculares mediados por estresse oxidativo.

1.3 CÁDMIO

O Cd é um metal pesado altamente tóxico, não essencial para o organismo e quando exposto, tem efeitos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (CHOU et al., 2023). É um elemento químico de número atômico 48 e peso molecular 112,411 u, pertence ao grupo 12 da Tabela Periódica. Trata-se de um metal de transição branco prateado, dotado de propriedades como maleabilidade, ductilidade, além de apresentar considerável resistência química e mecânica (DUFFUS, 2002; RUSSEL, 2004), sendo resistente a corrosão. O termo “cádmio” origina-se do latim *cadmia*, em alusão à calamita, uma forma natural de carbonato de zinco (TARAKINA; VERBERCK, 2017).

O Cd está presente no ambiente tanto por meio de fontes naturais quanto antropogênicas. O aumento das concentrações de Cd por fontes naturais no ambiente vivo (atmosfera, solo e água) incluem o processo gradual de erosão do solo, desintegração física e química de rochas, atividade vulcânica, incêndios florestais, e até mesmo as minas de zinco, chumbo e cobre contribuem para a liberação desse metal na atmosfera (CASADO et al., 2008; SUHANI et al., 2021; KUBIER et al., 2020).

Contudo, a principal contribuição para a contaminação ambiental por Cd advém de fontes antropogênicas, especialmente de atividades industriais e agrícolas. Estima-se que as ações humanas sejam responsáveis pela liberação de cerca de 5.000 a 13.000 toneladas de cádmio anualmente no ambiente (JOMOVA et al., 2025). O Cd é amplamente utilizado na fabricação de baterias recarregáveis de níquel-cádmio (Ni-Cd), em estabilizantes de cloreto de polivinila (PVC) e pigmento para tintas. Também é empregado na galvanoplastia, onde protege componentes de aço contra a corrosão (SATARUG et al., 2003). Além disso, o Cd possui a capacidade de absorver nêutrons, característica que o torna útil em aplicações nucleares, como em reatores e em materiais de controle ou blindagem contra radiações ionizantes (KRISHNAPPA et al., 2023). É ainda utilizado na produção de células solares fotovoltaicas, especialmente na forma de telureto de cádmio (CdTe), para geração de energia solar (SCHAEFFER et al., 2023). O Cd também está presente em fertilizantes fosfatados amplamente utilizados na agricultura, contribuindo para a contaminação do solo e de produtos agrícolas (ATSDR, 2012; WHO, 2010). A incorporação desses fertilizantes ao solo eleva os níveis de Cd disponíveis para absorção pelas plantas, especialmente aquelas com maior capacidade de bioacumulação do metal. Entre elas, destacam-se o tabaco, utilizado na fabricação de cigarros e charutos, cereais como o arroz, o cacau, principal ingrediente do chocolate, além de diversos vegetais folhosos (BARRAZA et al., 2017; ATSDR, 2012). Esses alimentos, ao entrarem na cadeia alimentar humana, contribuem para a exposição não ocupacional ao Cd, principalmente por via oral.

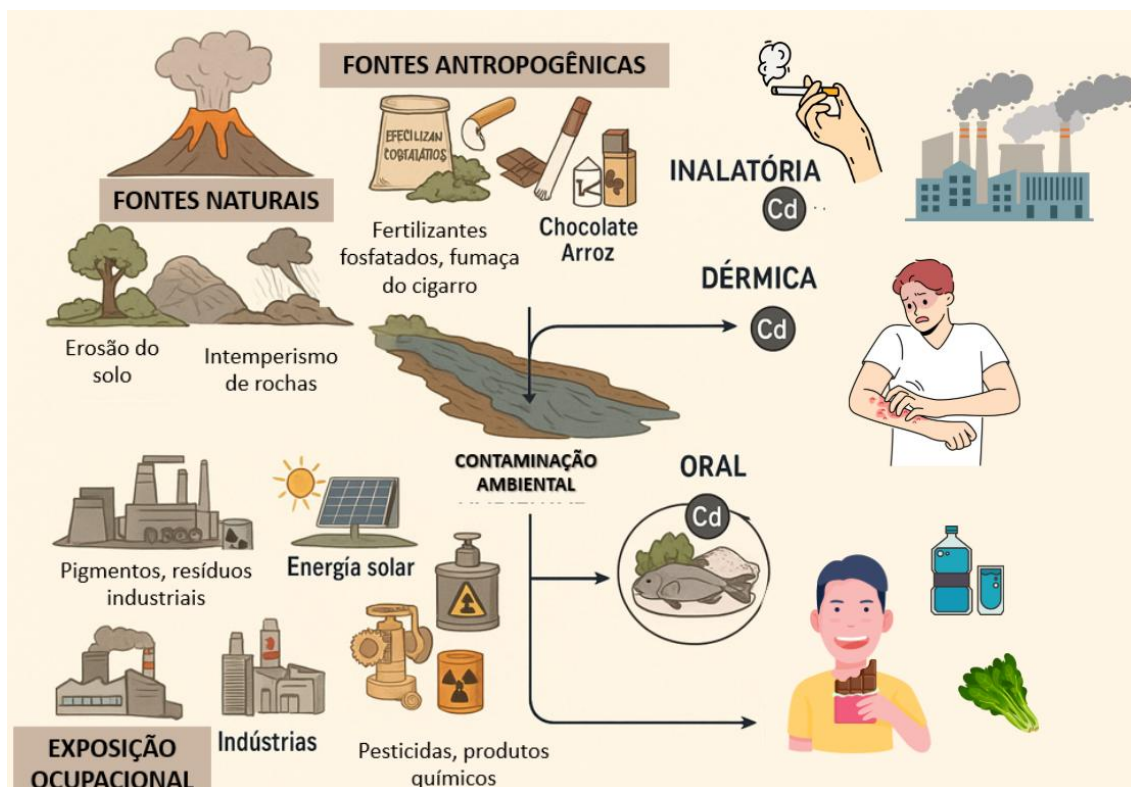


Figura 4. Fontes e vias de exposição ao cádmio. Elaboração própria com auxílio da ferramenta ChatGPT (OpenAI, 2025).

Além da ingestão de alimentos contaminados, a exposição ocupacional representa uma das principais vias de intoxicação por Cd em seres humanos, ocorrendo principalmente pela inalação de vapores e poeiras contendo o metal em ambientes industriais (DE ANGELIS et al., 2017). Diversas atividades industriais, como fabricação de pesticidas, fundição de metais, refinarias de petróleo, indústria química e de baterias estão associadas à liberação de Cd e à exposição humana a metais pesados (MITRA et al., 2022). Trabalhadores envolvidos em processos como mineração, soldagem, produção de pigmentos ou em qualquer etapa da cadeia produtiva que utilize o cádmio como matéria-prima ou o gere como subproduto estão entre os mais suscetíveis à contaminação. Nesses indivíduos, a principal via de absorção é a inalatória, seguida pela via gastrointestinal e, em menor proporção, pela via cutânea (WHO, 1992). A exposição crônica em ambientes ocupacionais pode levar a concentrações sanguíneas de Cd significativamente mais elevadas do que as observadas na população geral, com valores que variam entre 2 e 50 µg/L (HASSLER; LIND; PISCATOR, 1983; JURDZIAK et al., 2018; ZHOU et al., 2016).

Além da contaminação direta dos trabalhadores, as atividades industriais representam uma ameaça ambiental significativa, pois contribuem para a liberação de Cd no solo e nos recursos hídricos das regiões vizinhas. Essa contaminação ambiental afeta não apenas os ecossistemas locais, mas também representa um risco à saúde humana por meio da cadeia alimentar, uma vez que o Cd pode se acumular em organismos aquáticos destinados ao consumo humano, bem como contaminar fontes de água potável (SATARUG, 2018). Organismos aquáticos podem absorver Cd de água contaminada e acumulá-lo em seus tecidos (BORRELL et al., 2016; CHIARELLI; MARTINO; ROCCHERI, 2019; LIU et al., 2019), o que intensifica os riscos de exposição humana por meio da alimentação.

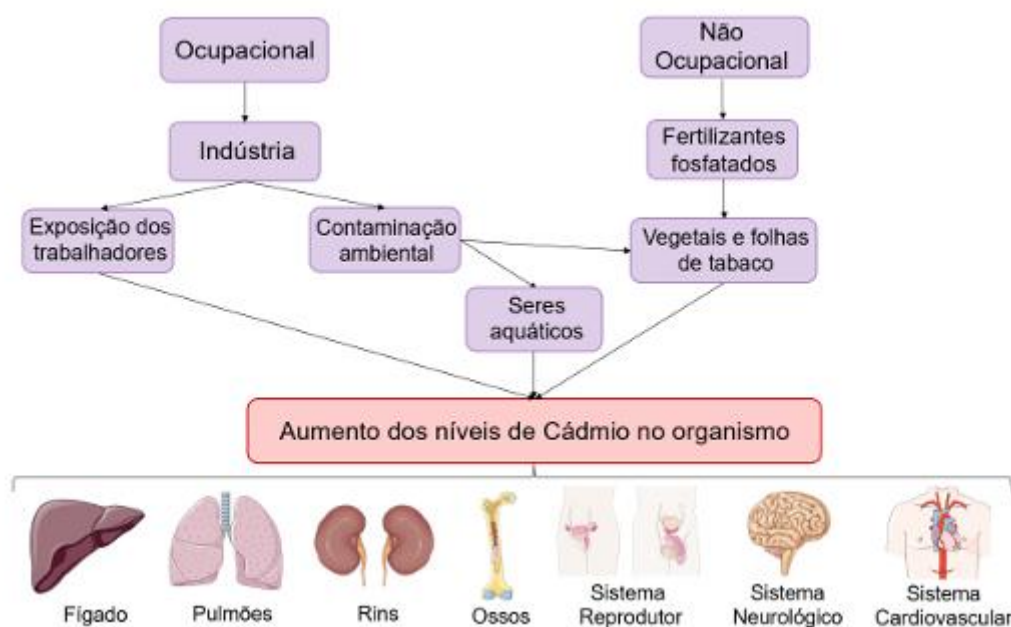


Figura 5. Principais rotas de exposição ao Cádmiio e seus efeitos tóxicos nas diferentes partes do corpo. Fonte: ROSSI (2022, p.23).

Nesse contexto, é relevante discutir os impactos dos desastres ambientais associados à contaminação ambiental por metais pesados, como o cádmio. Um dos casos mais emblemáticos de intoxicação ambiental por cádmio foi registrado no Japão, no século XX, com o surgimento da doença conhecida como *itai-itai*. Essa condição foi associada à intensa atividade de mineração de zinco na região do rio Jinzu, cuja poluição comprometeu áreas agrícolas extensas. A água contaminada, utilizada para irrigação de plantações, resultou na contaminação

de alimentos como arroz, vegetais e peixes. A exposição crônica ao cádmio por meio do consumo desses alimentos levou ao desenvolvimento de quadros clínicos severos na população local, caracterizados por dor óssea intensa, osteoporose, osteomalácia, descalcificação esquelética grave, alta taxa de fraturas, distorção de ossos longos, fraturas espontâneas, anemia, tosse e insuficiência renal progressiva, levando à morte (NISHIJO et al., 2017; REYES-HINOJOSA et al., 2019).



Figura 6. Alterações na estrutura óssea após intoxicação ambiental no século XX, no Japão, desenvolvendo a doença Itai-itai (DÖKMECI; ONGEN, 2009)

No Brasil, eventos recentes reforçam a vulnerabilidade socioambiental frente à exposição a metais pesados. Os rompimentos das barragens de Fundão, em Mariana (2015), e do Córrego do Feijão, em Brumadinho (2019), ambos em Minas Gerais, despejaram mais 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração nos cursos d'água, atingindo diretamente o rio Doce e o rio Paraopeba, importantes rios que abastecem cidades do Espírito Santo e Minas Gerais (DUARTE et al., 2021). Foram identificados níveis elevados de ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al) e Cd tanto em amostras de água e sedimentos quanto em organismos aquáticos (CIONEK et al., 2019; DUARTE et al., 2021). Organismos

aquáticos têm a capacidade de absorver Cd presente na água contaminada, acumulando-o em seus tecidos ao longo do tempo (CHIARELLI; MARTINO; ROCCHERI, 2019; LIU et al., 2019). Esse processo de bioacumulação representa uma via relevante de exposição humana, especialmente por meio do consumo de pescados oriundos de ambientes impactados.

O Cd presente no ambiente pode entrar no corpo humano por diferentes vias: inalação de ar contaminado, ingestão de alimentos e líquidos poluídos e em menor proporção, por absorção dérmica (DOCCIOLI et al., 2024; TCHOUNWOU et al., 2012). Uma vez absorvido, o Cd apresenta baixa taxa de excreção, promovendo acúmulo progressivo principalmente nos rins, fígado e pulmões (TAI et al., 2022). Entretanto, sob condições de exposição crônica, o Cd pode se depositar em tecidos como ossos, intestinos, coração e grandes vasos, como a aorta, desencadeando uma série de alterações morfofuncionais e patológicas (TAI et al., 2022). Estudos conduzidos por Faroon (2012) demonstrou que os níveis de cádmio no sangue e na urina são significativamente mais elevados em fumantes e trabalhadores expostos ocupacionalmente quando comparados à população geral. A concentração média de cádmio no sangue de fumantes é três vezes maior do que a de não fumantes (ATSDR, 2008), evidenciando o tabagismo como uma fonte importante e adicional de exposição sistêmica ao metal. O Cd é absorvido por pessoas ocupacionalmente expostos principalmente pela respiração, já na população não exposta ocupacionalmente a absorção de Cd ocorre pela ingestão de água, alimentos contaminados e pela inalação passiva da fumaça do cigarro (GOYAL et al., 2021; KNOELL; WYATT, 2021). A inalação da fumaça do cigarro resulta numa absorção de Cd de 25%, já o consumo de água e alimentos contaminados promovem absorção de 5 a 10% desse metal. Um cigarro pode aumentar a concentração de Cd em 0,1 – 0,2 µg/L no sangue (LEE et al., 2020; SHARIAT et al., 2019). Cada cigarro contém aproximadamente 1–2 µg de Cd, dos quais 40–60% são absorvidos pelos pulmões durante o fumo e entram na corrente sanguínea. Como o fumante pode absorver 1–3 µg de Cd/dia em comparação com o não fumante, que absorve apenas 1 µg de Cd da dieta, essa diferença coloca os fumantes em maior risco de efeitos tóxicos relacionados à exposição a esse metal pesado, incluindo doenças cardiovasculares (AMARIEI et al., 2014; MATOVIĆ et al., 2011).

O Cd não exerce função biológica essencial no organismo, motivo pelo qual não há sistemas específicos desenvolvidos para sua absorção, transporte ou entrada nas células. No entanto, devido à sua similaridade iônica com metais essenciais como ferro (Fe^{2+}), zinco (Zn^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), o Cd é capaz de utilizar, de forma oportunista, os sistemas de transporte desenvolvidos para esses elementos. Dentre os principais mediadores desse processo, destaca-se o transportador de metais divalentes 1 (DMT1), amplamente expresso em tecidos como intestino e fígado. Além do DMT1, outras proteínas de transporte também participam da captação celular de Cd, como canais de cálcio, transportadores de zinco ZIP8 e ZIP14, transportadores de aminoácidos (Cd-cisteína) e endocitose de complexos Cd-metalotioneína (Cd-MT) também podem facilitar a entrada de Cd^{2+} em determinados tecidos, reforçando o caráter inespecífico e potencialmente tóxico de sua internalização (KLAASSEN et al., 2009; FUJISHIRO et al., 2019; HIMENO; FUJISHIRO, 2021).

Depois de absorvido, o Cd se liga a albumina e é levado para o fígado, estimulando a síntese de MT, esta proteína tem ação protetora do organismo, é rica em cisteína e possui alta afinidade por metais essenciais e não-essenciais (CAI et al., 2010; NORBERG et al., 2004). É formado o complexo MT-Cd, que permanece armazenado no fígado, com o passar do tempo esse complexo é liberado do fígado para a corrente sanguínea em pequenas frações, então, as células do túbulo proximal reabsorvem este complexo por endocitose, os lisossomos das células tubulares degradam esse complexo MT-Cd, liberando íons Cd^{2+} para a circulação (NORDBERG; JIN; NORDBERG, 1992), o Cd livre estimula a síntese de nova metalotioneína renal, o Cd se liga à MT recém-sintetizada nas células renais, formando novos complexos, e assim ocorre sua ação tóxica (FRIBERG, 2019), a formação desse complexo dificulta a sua excreção renal (KLAASSEN et al., 2009). Além disso, o organismo humano não dispõe de mecanismos eficientes para a excreção do cádmio, o que favorece seu acúmulo progressivo nos tecidos ao longo da vida. Sua meia-vida biológica é extremamente longa, estimada em 15 a 30 anos, o que contribui para sua persistência no corpo e potencial toxicidade crônica (THEVENOD et al 2013). Com base nos níveis urinários de Cd variando entre 5 e 10 μg por grama de creatinina, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu como limite

seguro de ingestão semanal desse metal a quantidade de 7 µg por quilograma de peso corporal (WHO, 1992). No Brasil, a única diretriz oficialmente estabelecida é a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7), do Ministério do Trabalho e Emprego, que integra o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO). Essa norma define um Indicador Biológico de Exposição Excessiva (IBE/EE) para o Cd baseado na concentração urinária, estabelecendo o limite de 5 µg de Cd por grama de creatinina como valor de referência para monitoramento em trabalhadores (NR 7, 2022). Embora o Cd possa ser detectado em diversos tecidos do corpo humano, os principais biomarcadores utilizados na vigilância biológica são as concentrações do metal no sangue total e na urina de 24 horas. A dosagem urinária é reconhecida como um marcador de exposição cumulativa, refletindo a carga corporal de longo prazo (Nordberg et al., 2007). Em contraste, a concentração sanguínea reflete exposições mais recentes, ocorridas nos últimos meses, e, embora não haja um limite oficial adotado no Brasil, a literatura internacional considera 5 µg/L como o valor máximo aceitável, conforme recomendado pelo Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais - ACGIH (2007 (ACGIH, 2007).

A ausência de uma regulamentação nacional padronizada se reflete também na prática clínica laboratorial. Diversos laboratórios de análises clínicas no Brasil adotam faixas de referência variáveis para o Cd sanguíneo, que variam de 0 a 10 µg/L. Alguns desses laboratórios utilizam como referência o valor de 5 µg/L proposto pelo ACGIH, evidenciando a inconsistência e a falta de uniformidade nos critérios de avaliação adotados (BEHRING, 2025; FLEURY, 2025; PARDIN, 2025).

1.3.1 EFEITOS DO CÁDMIO SOBRE OS DIVERSOS SISTEMAS

Evidências epidemiológicas e experimentais indicam que a exposição crônica ao Cd em seres humanos pode estar associada ao desenvolvimento de neoplasias, caracterizando-o como um agente potencialmente carcinogênico (ALI HUSSEIN et al., 2024; NAGATA et al., 2013; NAWROT et al., 2015; TARHONSKA et al., 2022; WAALKES, 2003). Entre os órgãos mais afetados estão o fígado

(CASALINO et al., 2002), os pulmões (LAMPE et al., 2008), os rins (BERNARD, 2004; SATARUG, 2018; SATARUG; VESEY; GOBE, 2017; ZHANG et al., 2024), os ossos (REYES-HINOJOSA et al., 2019; STAESSEN et al., 1999) e os sistemas reprodutores masculino e feminino (CHARLES et al., 2021; KUMAR; SHARMA, 2019; OLIVEIRA et al., 2023; THOMPSON; BANNIGAN, 2008).

O Cd pode se acumular no fígado ao longo do tempo e desencadear lesões hepáticas, além disso, nível elevado de Cd no sangue foi associado ao desenvolvimento de fibrose e esteatose hepática (ALSHAMMARI et al., 2021; HAN et al., 2022). Os pulmões representam outro importante órgão-alvo da toxicidade induzida pelo Cd, a exposição crônica a esse metal pode resultar no desenvolvimento de fibrose pulmonar progressiva, além de comprometer significativamente a função respiratória, contribuindo para o surgimento de doenças pulmonares obstrutivas (LI et al., 2022; LI et al., 2017).

A exposição ao Cd pode provocar danos ao sistema nervoso central, uma vez que o metal aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica, facilitando sua penetração no tecido neural. Esse processo desencadeia respostas inflamatórias nas células neuronais, que podem resultar em lesões celulares permanentes (BRANCA; MORUCCI; PACINI, 2018). Por interferir no metabolismo celular de minerais essenciais como cálcio, magnésio, ferro, zinco e cobre, o Cd pode levar à desmineralização óssea e ao desenvolvimento de osteomalácia e osteoporose (CZECZOT., 2010; TCHOUNWOU et al., 2012). Em um estudo com ratas Wistar submetidas à exposição subaguda ao cádmio (100 ppm) por meio da água de beber, observou-se que o metal provocou alterações significativas no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), resultando em disfunções reprodutivas compatíveis com a síndrome dos ovários policísticos (SOP) e falência ovariana (DA COSTA et al., 2021). No entanto, entre todos os órgãos e sistemas comprometidos, o sistema cardiovascular tem se destacado como um dos principais alvos da toxicidade induzida pelo Cd (ALMENARA et al., 2022, 2013b; CHRISTINY et al., 2023; FILIPPINI; WISE; VINCETI, 2022; LIN; HAO; CHU, 2021; LIU et al., 2025; ROSSI et al., 2024; TELLEZ-PLAZA et al., 2012, 2013).

1.3.2 EFEITOS DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Os primeiros indícios do envolvimento do sistema cardiovascular na exposição ao Cd surgiram em 1919, quando Alsberg e Schwartz observaram que a exposição aguda ao Cd pela via subcutânea ocasionou uma coloração arroxeada nos testículos de ratos. Décadas depois, outros estudos identificaram uma hemorragia nos testículos (HOEY, 1966; KAR; DAS, 1960; PAŘÍZEK, 1956). Mas só a partir da década de 70 novos estudos finalmente esclareceram a origem desta hemorragia: ruptura das junções entre as células endoteliais de capilares e vênulas testiculares, com consequente aumento da permeabilidade testicular, edema e hemorragia (AOKI; HOFFER, 1978; FENDE; NIEWENHUIS, 1977; SACERDOTE; CAVICCHIA, 1983).

Desde então, o Cd tem sido associado a diversas alterações cardiovasculares. Ao que tudo indica, o aumento da concentração de Cd na urina tem relação direta com o aumento da incidência de doenças cardiovasculares (TELLEZ-PLAZA et al., 2013). Estudos demonstram que a exposição ao Cd está envolvida no surgimento de doenças como: acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca (TELLEZ-PLAZA et al., 2012), doença arterial periférica (NAVAS-ACIEN et al., 2004), aterosclerose (BARREGARD et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2019) e hipertensão (AFRIDI et al., 2010; ALMENARA et al., 2013b; DONPUNHA et al., 2011; TELLEZ-PLAZA; GUALLAR; NAVAS-ACIEN, 2018).

Entre os efeitos mais relevantes da exposição ao Cd, a hipertensão arterial se destaca como uma manifestação frequente, possivelmente associada à disfunção endotelial. Essa disfunção compromete a regulação do tônus vascular, elevando a resistência vascular periférica e contribuindo para o desenvolvimento e a persistência do estado hipertensivo (KOLLURU; SIAMWALA; CHATTERJEE, 2010; TRIGGLE et al., 2003). Um fator central nesse processo é o desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras produzidas pelo endotélio, o que resulta em aumento do tônus vascular e, conseqüentemente, na elevação da pressão arterial (DONPUNHA et al., 2011; KOLLURU et al., 2006; MARTYNOWICZ et al., 2004; SKOCZYNSKA; MARTYNOWICZ, 2005; ALMENARA et al., 2013; Rossi et al., 2024; ALMENARA et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2023). Além disso, a interação do Cd com os canais de cálcio voltagem-

dependentes é outro mecanismo importante envolvido na sua toxicidade vascular (BALARAMAN et al., 1989). A entrada do Cd^{2+} por meio desses canais pode alterar significativamente a sinalização intracelular do cálcio, promovendo aumento da contratilidade do MLV e assim vasoconstrição (SANGARTIT et al., 2014). O Cd é capaz de estimular o sistema nervoso simpático, contribuindo para aumento do tônus vasoconstritor (FADLOUN; LEACH, 1979). Paralelamente, esse metal reduz a disponibilidade de agentes vasodilatadores endoteliais, como o NO, agravando o desequilíbrio entre fatores constritores e dilatadores. Essas alterações favorecem o aumento do tônus vascular, contribuindo para o surgimento da hipertensão arterial sistêmica (DONPUNHA et al., 2011; MADRIGAL et al., 2019). Além disso, alterações na função tubular renal também têm sido associadas à elevação da pressão arterial relacionada à exposição ao Cd (SATARUG et al., 2005)

Estudos experimentais têm demonstrado de forma consistente que a exposição ao Cd, mesmo em diferentes concentrações, tempos de exposição e modelos experimentais, compromete de maneira significativa a função vascular. Almenara e colaboradores (2013), utilizando um modelo de exposição subcrônica a baixa concentração de Cd (100ppm, 30 dias) capaz de gerar níveis plasmáticos compatíveis com os observados em indivíduos expostos ocupacionalmente, identificaram uma acentuada redução da biodisponibilidade de NO na aorta de ratos. Esse comprometimento foi atribuído, principalmente, ao aumento da expressão da isoforma NOX2 da enzima NADPH oxidase, uma das principais fontes de EROs na parede vascular. Além disso, foi observada uma redução tanto na expressão quanto na fosforilação da eNOS, enzima responsável pela síntese de NO endotelial, contribuindo para o desequilíbrio redox e para a disfunção vascular observada (ALMENARA et al., 2013).

Rossi e colaboradores (2024) demonstraram que um curto período de exposição ao Cd (7 dias, 100 ppm na água de beber), com níveis plasmáticos semelhantes aos encontrados em fumantes, já é suficiente para induzir importantes alterações na função vascular de ratos Wistar. Os animais apresentaram aumento da PAS, maior reatividade à fenilefrina e prejuízo no relaxamento vascular. Essas alterações foram acompanhadas por acúmulo de H_2O_2 , redução da expressão da enzima antioxidante catalase e aumento da liberação basal de NO, indicando

um possível mecanismo compensatório diante do estresse oxidativo instaurado (ROSSI et al., 2024).

Mulher e colaboradores (2023) mostraram que a exposição *in vitro* ao Cd, na concentração de 5 μM , inferior àquela detectada na camada média da aorta de fumantes (ABU-HAYYEH et al., 2001), promoveu danos na arquitetura do endotélio de ratas. Além disso, houve aumento da produção e liberação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), redução da participação dos canais de potássio (K^+) e intensificação da via da angiotensina II na resposta contrátil à fenilefrina. Outro achado relevante foi o envolvimento dos receptores de estrogênio alfa ($\text{Er}\alpha$) na modulação da reatividade vascular, sugerindo que o Cd pode atuar como um metaloestrogênio, interferindo na sinalização hormonal vascular (Mulher et al., 2023)

De forma complementar, em modelo de exposição aguda, Angeli e colaboradores (2013) investigaram o efeito do Cd (10 μM) em anéis de aorta de ratos isolados, incubados por 45 minutos. A exposição resultou em aumento significativo da reatividade à fenilefrina, sem alteração na vasodilatação induzida por ACh ou NPS. A intensificação da resposta contrátil foi atribuída ao aumento na produção de EROs via NADPH oxidase (especialmente NOX2), com consequente redução da biodisponibilidade de NO. A co-incubação com apocinina (inibidor da NADPH Oxidase) e SOD foi capaz de atenuar esses efeitos, confirmando a mediação do estresse oxidativo na disfunção vascular induzida pelo metal (ANGELI et al., 2013).

1.3.3 ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO CÁDMIO

O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos pelo qual o Cd causa seus efeitos deletérios no vaso e tem relação direta com o surgimento de doenças cardiovasculares (HE et al., 2017). Os íons Cd apresentam elevada afinidade por macromoléculas que contêm pontes dissulfeto e grupamentos sulfidril ($-\text{SH}$), assim, compostos que são ricos nesses grupamentos, como a glutathiona (GSH) e metalotioneínas (MTs) atuam como importantes transportadores intracelulares de Cd. Dentro da célula, esse metal contribui para a geração de

EROs, que desencadeia um quadro de estresse oxidativo (GENCHI et al., 2020). O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre agentes oxidantes e a diminuição da eficiência do sistema de defesa antioxidantes do organismo (BOUCHMAA et al., 2018; PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014; XUE et al., 2020).

A superprodução de agentes oxidantes no organismo causa falhas nos sistemas de desintoxicação das células, e gera acúmulo de RONS (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), que são moléculas altamente reativas com um elétron desemparelhado. Essas falhas se acumulam e desempenham um papel importante no aparecimento do estresse oxidativo e inflamação, causando danos oxidativos severos ao DNA, em lipídios e proteínas, além de promover o envelhecimento celular e doenças (MA-ON et al., 2017; REUTER et al., 2010; VENKATARAMAN; KHURANA; TAI, 2013; ZEB, 2018). As EROs são produzidas a partir do oxigênio molecular como resultado do metabolismo celular fisiológico, são divididas em espécies radicalares e espécies não radicalares. O radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), ânion superóxido ($\text{O}_2 \cdot^-$) e radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) fazem parte do grupo de espécies radicalares, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3) e ácido hipocloroso (HOCl) compõem o grupo de espécies não radicalares. Fazem parte das espécies radicalares e não radicalares à base de nitrogênio o dióxido de nitrogênio ($\cdot\text{NO}_2$), o radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Os radicais são espécies instáveis e com alta reatividade, ao contrário dos não radicais que são menos reativos e mais estáveis com um tempo de meia-vida maior (APEL; HIRT, 2015; HALLIWELL, 2006).

As principais fontes de EROs são: a NADPH oxidase, xantina oxidase, enzimas mitocondriais, lipoxigenases, mieloperoxidases e o desacoplamento da eNOS (FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006). O sistema enzimático de defesa é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Existe ainda o sistema não enzimático, formado por outras substâncias antioxidantes de origem endógena, como glutathione reduzida (GSH), coenzima Q10, metalotioneínas, ou adquiridas através da dieta (HE et al., 2017) como polifenóis, vitamina C e E, zinco. Por não ser um metal de Fenton, o Cd não tem capacidade de gerar radicais livres diretamente. No

entanto, ele libera outros metais de Fenton, como cobre e ferro, de seus estoques e permite que esses íons livres gerem EROs diretamente (CUYPERS et al., 2010; WAISBERG et al., 2003). Apesar de terem papel fisiológico como segundos mensageiros, as EROs em excesso podem reagir com moléculas estruturais e de sinalização, levando à peroxidação lipídica, oxidação proteica e dano ao DNA (BERTIN; AVERBECK, 2006; BOLISSETTY; JAIMES, 2013). O Cd depleta enzimas como a SOD e Catalase, diminuindo sua capacidade antioxidante (WAISBERG et al., 2003; WANG et al., 2004). No sistema cardiovascular, as EROs afetam a função das células endoteliais e musculares, causando redução da biodisponibilidade de NO, apoptose, proliferação celular, inflamação, remodelamento e aumento do tônus vascular (TANIYAMA; GRIENDLING, 2003).

O nível aumentado de EROs é caracterizado como um processo patológico, capaz de provocar estresse oxidativo (PIZZINO, 2017; SENONER; DICHTL, 2019). Diversos estudos têm demonstrado o quanto o estresse oxidativo induzido pela exposição ao Cd é prejudicial nos vasos sanguíneos. Segundo esses estudos, exposições agudas e crônicas ao Cd causam disfunção endotelial por aumento do estresse oxidativo, o que contribui para o surgimento de danos vasculares, inflamação, hipertensão e aterosclerose (ALMENARA et al., 2013; ROSSI et al., 2024; ALMENARA et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2019; SOMPAMIT et al., 2010; WOLF; BAYNES, 2007; YOOPAN et al., 2008).

1.3.4 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA PELO CÁDMIO

A aorta é classificada como uma artéria de condutância elástica devido à elevada concentração de fibras de elastina em sua túnica média e essa característica é relevante pois permite que a aorta suporte variações significativas no volume sanguíneo e altas pressões (PUGSLEYA; TABRIZCHI, 2014). As paredes da maioria dos vasos sanguíneos são organizadas em três camadas histológicas distintas: a túnica íntima, localizada mais internamente; a túnica média; e a túnica adventícia, mais externa. Cada uma dessas camadas apresenta uma composição específica de células e elementos do tecido conjuntivo, que

desempenham funções estruturais e funcionais complementares na manutenção da integridade vascular (LEHOUX, 2016).

A camada mais externa da aorta é a túnica adventícia ou externa, que é composta principalmente por miofibroblastos e fibroblastos, encarregados pela síntese da matriz extracelular fibroelástica (COEN; GABBIANI; BOCHATON-PIALLAT, 2011). Dentro da adventícia existem estruturas responsáveis por nutrir e inervar sua parede, são eles: vasa vasorum, nervi vasorum e vasos linfáticos (HALPER, 2018). A túnica média é a camada intermediária da aorta, possui as células musculares lisas, fibras de colágeno e elastina (HALPER, 2018). A túnica íntima é a camada mais interna da aorta, composta por uma camada de células endoteliais apoiada sobre uma membrana basal (PUGSLEYA; TABRIZCHI, 2014).

O endotélio vascular é formado por uma única camada de células que reveste internamente os vasos sanguíneos, posicionando-se entre o sangue circulante e o MLV. Essa estrutura desempenha papel essencial na manutenção da homeostase vascular, atuando na regulação do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária, controle da resposta inflamatória, prevenção da adesão e migração de leucócitos, além de limitar a proliferação de células musculares lisas (FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006; MONCADA; HIGGS; VANE, 1977).

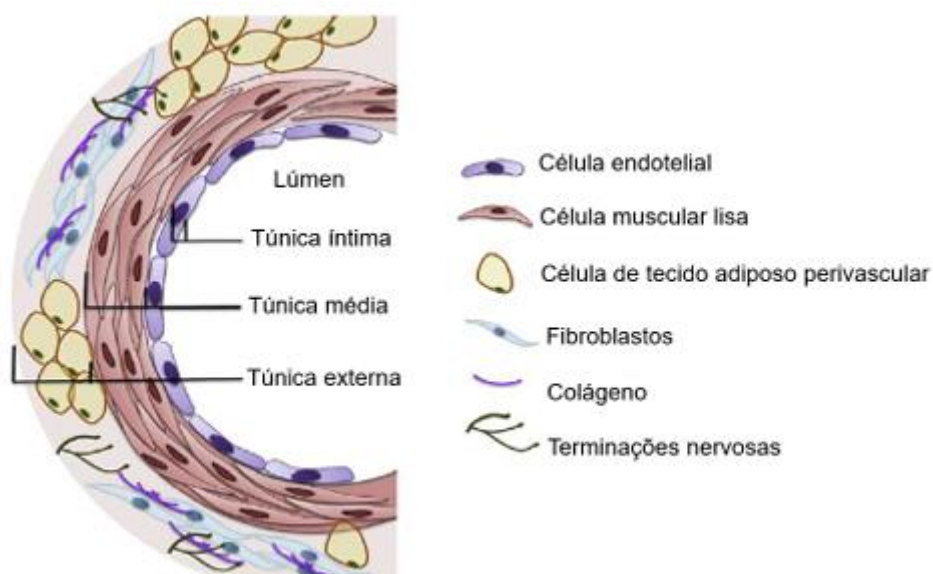


Figura 7. Camadas da aorta (modificado de ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015; adaptado de ROSSI, 2022).

Em condições fisiológicas, o endotélio contribui de forma decisiva para o tônus vascular, por meio da liberação de substâncias com efeitos vasoconstritores, como tromboxano A_2 (TXA_2), angiotensina II, endotelina e alguns metabólitos do oxigênio (CAHILL; REDMOND, 2016), e vasodilatadores, como os fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF), fatores de hiperpolarização endotelial (HDE), prostaglandinas como a PGI_2 e, sobretudo, o NO, amplamente reconhecido como o principal mediador da vasodilatação e elemento-chave para a homeostase vascular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). O NO é sintetizado pelas células endoteliais a partir da L-arginina, que, sob ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), é convertida em NO e L-citrulina (GRYGLEWSKI; PALMER; MONCADA, 1986; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A disfunção endotelial é definida como desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio vascular, estando relacionada ao aumento da produção de EROs e diminuição da capacidade antioxidante (SILVA et al., 2017). Estudos de reatividade vascular realizados em nosso laboratório encontraram disfunção endotelial na aorta de ratos Wistar (ALMENARA et al., 2013) e de camundongos ApoE^{-/-} (OLIVEIRA et al., 2018), tanto em exposição crônica (30 dias), como em exposição in vitro

(ANGELI et al., 2013) ao Cd. De fato, diversos trabalhos na literatura associam a exposição ao Cd com disfunção endotelial, pois a exposição ao metal aumenta a produção de EROs comprometendo a função endotelial (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; DONPUNHA et al., 2011; KUKONGVIRIYAPAN; KUKONGVIRIYAPAN, 2016; OLIVEIRA et al., 2018). Esse aumento na produção de EROs, frequentemente relatado após a exposição ao Cd, não apenas compromete a função endotelial, mas também desencadeia consequências celulares mais graves. Entre elas, destaca-se a indução de apoptose em diferentes tipos celulares da parede vascular, como células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos, processo esse que contribui diretamente para a progressão de lesões ateroscleróticas (DIAZ, 2021; MESSNER et al., 2016).

Essas evidências reforçam que a exposição ao Cd compromete a integridade do endotélio aumentando o risco de eventos vasculares como o desenvolvimento de lesão vascular, apoptose, inflamação, hipertensão e aterosclerose, evidenciando sua relevância como alvo terapêutico na prevenção de doença cardiovascular. Diante desse cenário, torna-se essencial a busca por estratégias terapêuticas capazes de prevenir ou atenuar os efeitos deletérios do cádmio sobre a função vascular. Nesse contexto, compostos naturais com propriedades antioxidantes, como os alimentos funcionais ricos em fitoquímicos e polifenóis, vêm ganhando destaque por seu potencial na modulação do estresse oxidativo e na proteção endotelial.

2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A exposição a metais pesados representa uma preocupação crescente em saúde pública, sendo decorrente de diversas fontes e ambientes, tanto ocupacionais quanto não ocupacionais. Entre esses metais, o cádmio destaca-se por sua elevada toxicidade, ocupando a sétima posição na lista das substâncias químicas mais perigosas associadas a doenças humanas. A exposição crônica ao cloreto de cádmio tem sido amplamente associada a uma série de efeitos deletérios à saúde, com destaque para o comprometimento do sistema cardiovascular. Estudos prévios demonstraram que o impacto da

exposição crônica ao Cd na água de beber compromete a função vascular em modelos experimentais, promovendo o aumento do estresse oxidativo, a redução da biodisponibilidade de NO e o desenvolvimento de hipertensão arterial (ALMENARA et al., 2013a; CRUZ et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2023) e aterosclerose (OLIVEIRA et al., 2019b).

Paralelamente, a crescente valorização da relação entre dieta, saúde e compostos bioativos tem impulsionado a investigação de alimentos funcionais como estratégias de prevenção e tratamento de doenças crônicas. Nesse contexto, os polifenóis têm recebido destaque, especialmente o AE, por apresentar diversas propriedades biológicas para prevenir e tratar doenças cardiovasculares induzidas pelos danos oxidativos causados pela exposição ao Cd. No entanto, os mecanismos moleculares e funcionais envolvidos nesses efeitos protetores ainda não estão completamente esclarecidos, especialmente no contexto da reatividade vascular. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de novos estudos para compreender se o AE pode preservar a função endotelial e a integridade vascular em condições de exposição subcrônica ao Cd, fornecendo evidências experimentais que sustentem seu potencial uso como nutracêutico protetor no contexto de doenças cardiovasculares associadas a exposição a metais pesados

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

A hipótese do presente estudo é que o ácido elágico pode impedir ou atenuar a disfunção endotelial e o aumento da pressão arterial, além de manter a homeostase vascular ao inibir o estresse oxidativo promovido pela exposição ao cloreto de cádmio.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito protetor do AE sobre a reatividade vascular em aorta de ratos expostos por 30 dias a baixa concentração de cloreto de cádmio

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar os níveis de Cd no sangue total de ratos expostos ao Cd e/ou AE por 30 dias;

Avaliar os efeitos do AE sobre a pressão arterial sistólica e a massa corporal de ratos submetidos à exposição ao Cd por 30 dias;

Investigar se o tratamento com AE é capaz de prevenir alterações na resposta contrátil e no relaxamento dependente e independente do endotélio em aortas de ratos expostos ao cloreto de Cd;

Avaliar se o tratamento com AE previne alterações da modulação endotelial na resposta contrátil em aorta isolada de ratos expostos ao Cd.

Analisar se o tratamento com AE previne o aumento do estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO em aorta isolada de ratos expostos ao metal;

Investigar o efeito do AE sobre a atividade da enzima antioxidante no tecido aórtico após exposição ao Cd por 30 dias;

Investigar se a exposição ao Cd altera a produção in situ de ânion superóxido e óxido nítrico em segmentos de aorta, e se o tratamento concomitante com AE é capaz de prevenir essas alterações;

Avaliar se o tratamento com AE previne possíveis alterações na expressão de proteínas relacionadas à via do estresse oxidativo em aorta de ratos expostos ao cloreto de Cd;

Investigar se exposição ao Cd induz alterações morfológicas nas células endoteliais da aorta de ratos e se o tratamento com AE é capaz de atenuar ou reverter tais alterações.

Avaliar se a exposição ao Cd promove alterações estruturais da parede da aorta de ratos, com ênfase no conteúdo e organização das fibras de colágeno e elastina, e a integridade morfológica geral das camadas vasculares, e se o tratamento com AE previne essas possíveis alterações

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com 12 semanas de idade (250 e 350 g). Esses animais foram cedidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES). Tais animais foram mantidos em gaiolas (4 animais por gaiola) sob condições controladas de temperatura (22-24°C) e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água potável e à ração padrão para roedores.

O uso e cuidado desses animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016) e normas estabelecidas pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991), e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA 20/ 2020).

5.2 MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos denominados: Controle (Ct), Ácido Elágico (AE), Cádmio (Cd), Cádmio mais Ácido Elágico (Cd+AE).

- Grupo Controle (Ct): recebeu água potável para beber e NaOH 0,1M via gavagem
- Grupo Ácido Elágico (AE): recebeu ácido elágico (30 mg/Kg/dia) preparado em NaOH 0,1M via gavagem por 30 dias
- Grupo Cádmio (Cd): exposto por 30 dias ao cloreto de cádmio (100 ppm via água de beber) e NaOH 0,1M via gavagem
- Grupo Cádmio mais Ácido Elágico (Cd+AE): exposto por 30 dias ao cloreto de cádmio (100 ppm) na água de beber e ácido elágico (30 mg/Kg/dia) preparado em NaOH 0,1M via gavagem por 30 dias

As doses administradas por gavagem (NaOH 0,1M e ácido elágico 30 mg/Kg/dia) foram ajustadas ao peso do rato duas vezes por semana.

5.3 SELEÇÃO DE DOSE E PREPARAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO

A dose de AE utilizada neste estudo foi de 30 mg/kg/dia, administrada por via oral. Esta dose foi selecionada com base em estudos prévios que demonstraram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios benéficos em diferentes modelos experimentais (DING et al., 2014b; GOUDARZI et al., 2018; JORDÃO et al., 2017). Em estudo conduzido por Mansouri et al. (2020), a dose de 30 mg/kg apresentou maior eficácia anti-inflamatória quando comparada a doses menores (10 e 15 mg/kg), sendo, portanto, considerada a mais eficaz.

A formulação do AE foi preparada na concentração de 30 mg/mL, conforme recomendação do fornecedor e evidências da literatura, que indicam aumento da solubilidade do composto em meio alcalino. Diversos autores relataram que o AE é pouco solúvel em água, mas apresenta solubilidade significativa em soluções de hidróxido de sódio (NaOH) em concentrações entre 0,01 e 1 M (ROSILLO et al., 2011; ZUCCARI et al., 2020). Assim, optou-se pela solubilização do AE em NaOH 0,1 M, concentração considerada eficaz para solubilização completa (ALTAMIMI et al., 2021, 2022).

Para garantir a homogeneidade da suspensão e facilitar a administração por gavagem, foi adicionado carboximetilcelulose (CMC) a 0,5%, conferindo maior viscosidade à solução. A CMC atuou como veículo inerte e estabilizante, prevenindo a sedimentação do AE e permitindo a administração precisa e uniforme da dose ao longo de todo o protocolo experimental.

5.4 SOLUÇÃO DE CLORETO DE CÁDMIO

Nesse trabalho, utilizamos o modelo de exposição já descrito em estudo anterior de nosso laboratório (ALMENARA et al., 2013), no qual os ratos foram expostos ao cádmio via água de beber a 100ppm (100 mg/L). Conforme apresentado por Almenara e colaboradores (2013), após os trinta dias de exposição ao cloreto de cádmio, os animais apresentaram concentração sanguínea média de Cd de 40.3 µg/L. Estudos têm demonstrado que pessoas expostas ocupacionalmente apresentam concentração sanguínea de cádmio que podem variar de 2 a 50 µg/L (JURDZIAK et al., 2018; ZHOU et al., 2016). Assim, nosso modelo experimental mimetizou a concentração sanguínea encontrada em pessoas expostas ocupacionalmente.

5.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.5.1 Peso corporal dos animais

Foi investigado se o tratamento com Cd e/ou AE interferiu no ganho ponderal normal dos animais. Para isso, os ratos foram pesados semanalmente até o dia da realização do experimento.

5.5.2 Verificação da pressão arterial sistólica

A mensuração indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada em todos os animais no primeiro dia de tratamento e, posteriormente, uma vez por semana ao longo dos 30 dias experimentais, conforme descrito por Grizzo & Cordelline (2008). As aferições foram conduzidas por meio do método de pletismografia de cauda, utilizando o equipamento IITC Life Science (23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA, EUA). Para minimizar interferências relacionadas ao

estresse, os animais passaram por um período prévio de aclimação de três dias ao procedimento. Em cada avaliação, foram realizadas três mensurações consecutivas por animal, e o valor final da PAS foi obtido pela média aritmética dessas três leituras.

5.5.3 Determinação de cádmio nas amostras de sangue

O sangue dos animais foi coletado por punção da artéria aorta abdominal no momento da eutanásia. As amostras foram armazenadas em tubos heparinizados isentos de metais, a fim de evitar contaminação, e conservadas a -80°C até a realização das análises. A quantificação dos níveis séricos de cádmio foi realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, modelo Agilent 7850), com limite de detecção de $0,24\text{ }\mu\text{g/L}$. As análises foram conduzidas no Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

5.5.4 Avaliação da reatividade vascular em aorta torácica

Ao final do período experimental de 30 dias, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma associação de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A profundidade anestésica foi confirmada pela ausência de reflexos. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação. Em seguida foram coletadas amostras de sangue, órgãos e segmentos da aorta torácica para as análises subsequentes.

Após a remoção, a aorta torácica descendente foi imediatamente transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs modificada, mantida a 4°C , composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,17; NaHCO_3 24; glicose 11; e EDTA 0,01. Em seguida, o tecido conectivo e adiposo aderido à aorta foi cuidadosamente removido. O vaso foi então seccionado em aproximadamente seis anéis cilíndricos, com cerca de 4 mm de comprimento cada (Figura 3). Os anéis foram montados em sistemas de banho de órgãos contendo solução Krebs-Henseleit, mantida à temperatura de $36,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e continuamente aerada com uma mistura gasosa carbogênica

composta por 95% de O_2 e 5% de CO_2 . O pH da solução foi mantido em 7,4 ao longo de todo o experimento.

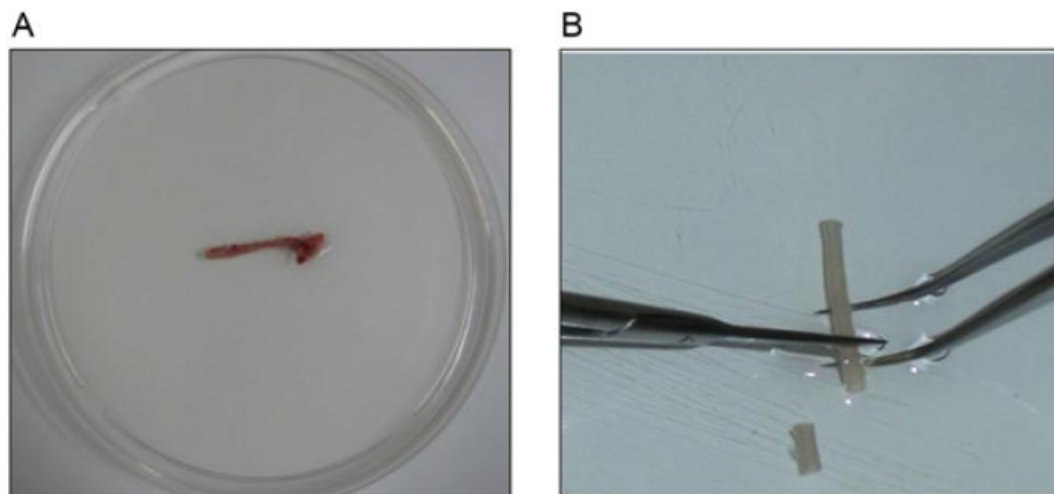


Figura 8. (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos conectivos e adiposo, sendo cortada em anéis de aproximadamente 4 mm.

Dois fios de aço inoxidável, moldados em forma de triângulo, foram inseridos paralelamente através do lúmen dos segmentos de aorta. Um dos triângulos foi fixado na base do banho de órgãos, enquanto o outro foi conectado verticalmente a um transdutor de força isométrica (TSD125C, CA, EUA). Esse transdutor estava acoplado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Barbara, CA, EUA), permitindo o registro das alterações de força geradas pelas mudanças no tônus vascular (Figura 4).

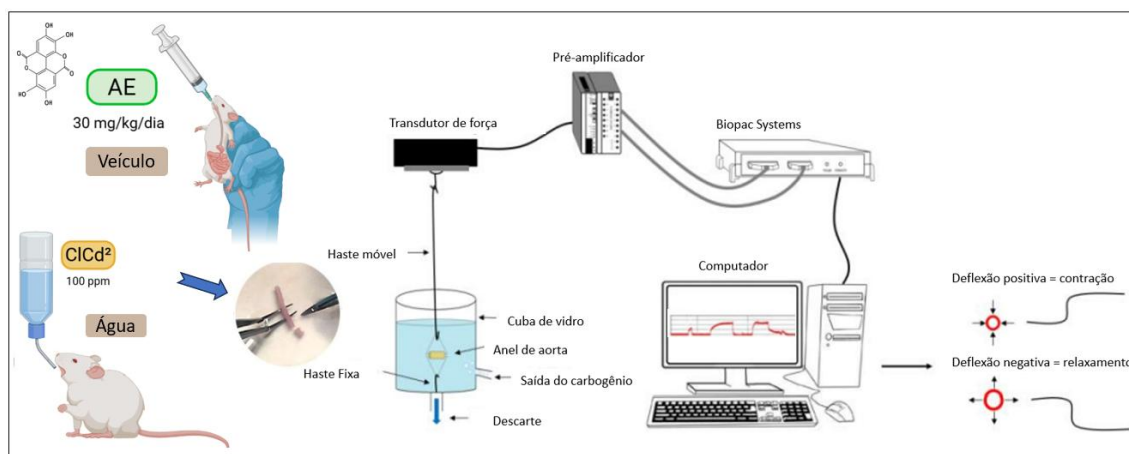


Figura 9. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems.

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão basal de 1 g, a qual foi reajustada quando necessário durante o período de estabilização de 30 minutos. A integridade funcional do músculo liso vascular foi avaliada por meio da contração induzida por despolarização com cloreto de potássio (KCl, 75 mM). Os anéis que apresentaram uma força contrátil inferior a 1 g em relação ao valor basal foram descartados. Aqueles que responderam adequadamente foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit e deixados em repouso por mais 30 minutos. Em seguida, uma nova dose de KCl (75 mM) foi administrada para obtenção da contração máxima do músculo liso vascular, sendo avaliada após 30 min.

Os anéis foram novamente lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit até restabelecerem a tensão basal de 1,0 g. Após 30 minutos de estabilização, os segmentos foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio. Para isso, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (10^{-7} a 10^{-6} M), agonista $\alpha 1$ -adrenérgico, até atingirem um platô correspondente a 70-80% da contração máxima induzida por KCl. A seguir, foi administrada uma dose única de acetilcolina (ACh, 10^{-5} M), um agonista muscarínico, e o relaxamento obtido foi utilizado como indicador da integridade endotelial (Figura 5 I, J e L).

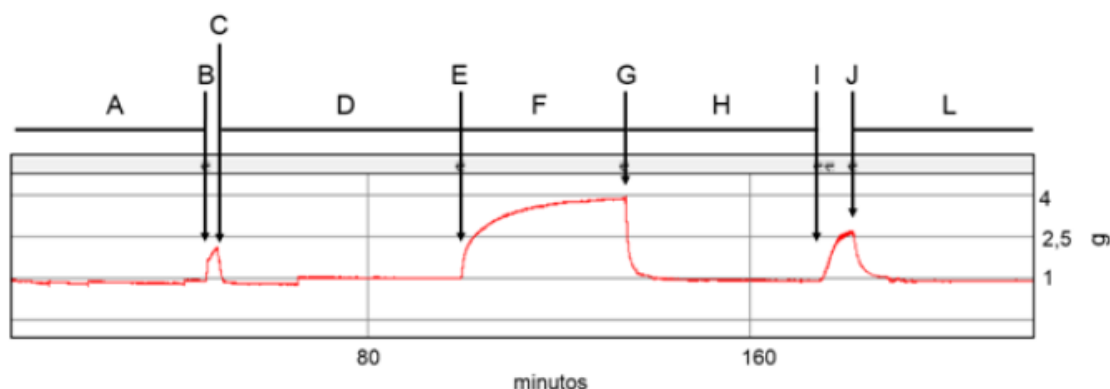


Figura 10. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do MLV com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (20 min) na tensão de 1g. B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-7} M ou mais até atingir 80% do 2º KCl; J) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M; L) Troca de solução Krebs-Henseleit e período de estabilização antes das incubações (30 min). O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.

5.5.5 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio e/ou ácido elágico por 30 dias na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para avaliar os mecanismos envolvidos na resposta vasoconstritora à fenilefrina após a exposição ao cloreto de cádmio e/ou ácido elágico, os segmentos de aorta torácica foram incubados com diferentes fármacos moduladores de vias relacionadas ao estresse oxidativo e à biodisponibilidade de óxido nítrico. Os fármacos utilizados foram: L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil éster, 100 μ M), inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS); apocinina (30 μ M), inibidor não seletivo da enzima NADPH oxidase; superóxido dismutase (SOD, 150 U/mL), antioxidante enzimático que converte ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2); Catalase (1000 U/mL), enzima que decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio; e Alopurinol (100 μ M), inibidor da enzima xantina oxidase.

Um anel de cada animal foi mantido sem incubação com fármacos, servindo como controle para comparação das respostas obtidas. Em alguns segmentos,

o endotélio foi mecanicamente removido a fim de avaliar os efeitos induzidos pelo cádmio e/ou ácido elágico na participação da modulação endotelial. Após 30 minutos de incubação com os respectivos fármacos, foi realizada a avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina, por meio de curvas concentração-resposta cumulativas (10^{-12} a 10^{-4} mol/L). As variações de força geradas em resposta a cada concentração foram registradas e analisadas para determinar o perfil de reatividade vascular.

5.5.6 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio e/ou ácido elágico por trinta dias na resposta vasodilatadora dependente do endotélio

A função vasodilatadora dependente do endotélio foi avaliada por meio do relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh), um agonista muscarínico. Para isso, segmentos de aorta com endotélio preservado foram previamente contraídos com fenilefrina (10^{-7} a 10^{-6} mol/L) até atingir um platô correspondente a aproximadamente 80% da contração máxima obtida com KCl (75 mM). Em seguida, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à ACh (10^{-12} a 10^{-4} mol/L), a fim de avaliar a capacidade de relaxamento endotelial.

Adicionalmente, em outro conjunto de segmentos com endotélio íntegro, foi realizada a pré-incubação com L-NAME (100 μ M), um inibidor não seletivo do óxido nítrico sintase (NOS), por 20 minutos antes da contração com fenilefrina, em seguida, curvas concentração-resposta cumulativas à ACh (10^{-12} a 10^{-4} mol/L) foram realizadas, a fim de avaliar a capacidade de relaxamento endotelial na presença do inibidor não seletivo da NOS. Esse protocolo teve como objetivo investigar a contribuição do NO na resposta vasodilatadora mediada pela ACh.

5.5.7 Efeito da exposição ao cloreto de cádmio e/ou ácido elágico por trinta dias na resposta vasodilatadora independente do endotélio

A reatividade vasodilatadora independente do endotélio foi avaliada utilizando o nitroprussiato de sódio (NPS), um doador direto de óxido nítrico. Para esse

experimento, os segmentos aórticos com endotélio removido foram pré-contraindidos com fenilefrina até alcançar um platô de aproximadamente 80% da contração induzida pelo KCl. Em seguida, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas ao NPS (10^{-12} a 10^{-4} mol/L). Esse protocolo permitiu investigar a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular de forma independente da função endotelial, permitindo a comparação entre os grupos tratados com Cd, AE ou ambos

5.5.8 Detecção in situ de óxido nítrico por fluorescência com DAF-2 DA

A detecção in situ de NO foi realizada por meio da sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), conforme descrito previamente e com adaptações de protocolos anteriores (KOJIMA et al., 1998; LOBATO et al., 2011). Após a dissecação, os segmentos da aorta torácica foram embebidos em meio de inclusão para criotomia Tissue-Tek® OCT (Bayer) e armazenados a -80°C até a realização dos cortes histológicos. As amostras foram seccionadas em criostato (Killik®, Easy Path) com espessura de 10 μm e os cortes foram montados em lâminas silanizadas para microscopia (Precision Glass Line®).

As lâminas contendo os cortes foram incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos para a fusão e remoção do excesso de OCT. Em seguida, os cortes foram lavados com aproximadamente 400 μL de tampão fosfato (PBS 0,1 M) contendo CaCl_2 (0,45 mM) para remoção completa do meio de inclusão. Posteriormente, os cortes foram incubados com DAF-2 DA (8 μM) diluído em PBS 0,1 M com CaCl_2 , em câmara escura, a 37°C por 30 minutos. Após esse período, os cortes foram lavados novamente com tampão fosfato com CaCl_2 para eliminar o excesso da sonda fluorescente. Em seguida, os cortes foram corados com DAPI (1:1000 em PBS) para marcação nuclear, com incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagens subsequentes com PBS (intervalos de 5 minutos), o excesso de líquido foi cuidadosamente removido com papel absorvente, e aplicou-se meio de montagem (glicerina 6%) antes da colocação das lamínulas. As imagens foram adquiridas em microscópio

de fluorescência invertido Leica DM 2500, utilizando filtro de excitação em 568 nm, acoplado à câmera Leica DFC 310 FX. As configurações de aquisição foram mantidas constantes para todos os grupos experimentais. A intensidade média da fluorescência foi calculada a partir de quatro imagens de segmentos de aorta de cada animal, utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

5.5.9 Detecção in situ de ânion superóxido com DHE

A produção de $O_2^{\bullet-}$ na parede vascular foi avaliada in situ por meio da sonda fluorescente dihidroetídio (DHE; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e foi adaptada a partir do protocolo descrito por Nunes e colaboradores (NUNES et al., 2014). Após dissecação, os segmentos de aorta torácica foram embebidos em meio de inclusão para criotomia Tissue-Tek® OCT (Bayer) e armazenados a -80°C até o momento da crio-seção.

As amostras foram cortadas em criostato (Killik®, Easy Path) com espessura de $10\ \mu\text{m}$ e transferidas para lâminas silanizadas (Precision Glass Line®). As lâminas com os cortes foram colocadas em estufa a 37°C por 30 minutos para fusão do meio de inclusão. Após esse período, os cortes foram lavados com tampão Krebs-HEPES (pH 7,4), contendo CaCl_2 (0,45 mM) e glicose (0,2 g/100 mL), a fim de remover o excesso de OCT. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de DHE ($2\ \mu\text{M}$), preparada em tampão Krebs-HEPES acrescido de glicose (0,2 g/100 mL), CaCl_2 (0,45 mM) e fenilefrina ($10^{-6}\ \text{M}$), por 30 minutos a 37°C , em câmara escura. A adição de fenilefrina teve como objetivo estimular a modulação nitrérgica, promovendo a produção endógena de espécies reativas de oxigênio. Após a incubação com DHE, os cortes foram lavados com tampão Krebs-HEPES com glicose e, em seguida, incubados com solução de DAPI (1:1000 em PBS) por 10 minutos à temperatura ambiente para marcação nuclear. As lâminas foram então lavadas duas vezes com Krebs-Hepes, deixado sobre as lâminas por 5 minutos, e o excesso de líquido foi removido cuidadosamente com papel absorvente. O meio de montagem (glicerina a 6%) foi então aplicado para a colocação das lâminas.

Após a incubação com DHE, os cortes foram lavados com tampão Krebs-HEPES com glicose e, em seguida, incubados com solução de DAPI (1:1000 em PBS) por 10 minutos à temperatura ambiente para marcação nuclear. As lâminas foram então lavadas duas vezes com Krebs-Hepes, deixado sobre as lâminas por 5 minutos, e o excesso de líquido foi removido cuidadosamente com papel absorvente. Foi utilizado meio de montagem à base de glicerina a 6% para a aplicação das lamínulas. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência invertido Leica DM 2500, utilizando filtro de excitação adequado para DHE, acoplado a uma câmera Leica DFC 310 FX. As configurações de captura foram as mesmas para todos os grupos experimentais. Para a análise quantitativa, foram selecionadas quatro imagens por animal, obtidas de diferentes regiões da aorta. A densidade média de fluorescência foi determinada com auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

5.5.10 Determinação de TBARS como Indicador de Estresse Oxidativo na aorta

A concentração plasmática de TBARS foi utilizada como marcador indireto da peroxidação lipídica. Esse processo consiste na oxidação de ácidos graxos presentes nas membranas celulares e em lipoproteínas, resultando na formação de diversos aldeídos, entre os quais o malondialdeído (MDA) é o principal. O MDA possui alta reatividade e pode interagir com DNA, RNA e outras biomoléculas, promovendo danos celulares. A quantificação do MDA baseia-se na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo corado cuja intensidade é proporcional ao grau de peroxidação lipídica. Os anéis de aorta armazenados a -80°C foram utilizadas. Essas amostras foram homogeneizadas e aquecidas a 95 °C por 15 minutos, após adição de 1% de TBA e 7% de ácido fosfórico. Em seguida, adicionou-se butanol e as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado, incubado na placa de 96 poços e lido a 540 nm, o protocolo foi adaptado de Ávila et al., (2021).

5.5.11 Avaliação dos Produtos de Oxidação Avançada de Proteínas (AOPP) em anéis de aorta de ratos

A formação de produtos finais de oxidação de proteínas (AOPP), marcadores de estresse oxidativo proteico, foi quantificada em homogenatos de anéis de aorta torácica de ratos, conforme protocolo adaptado Zovico et al., (2016). Segmentos de aorta de aproximadamente 4 mm foram homogeneizados em tampão fosfato (PBS, pH 7,4) contendo inibidores de protease. Após centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado para análise. Para a reação, alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços, seguidas da adição de 10 µL de ácido acético glacial e 10 µL de solução de iodeto de potássio (1,16 M). A mistura foi homogeneizada e incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi então lida a 340 nm em leitor de microplacas (SpectraMax®, Molecular Devices).

Os valores obtidos foram comparados a uma curva padrão de cloramina-T (0 a 100 µmol/L), sendo os resultados expressos como micromoles de cloramina-T equivalente por miligrama de proteína (µmol/mg). A concentração proteica dos homogenatos foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina bovina como padrão.

5.5.12 Avaliação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Anéis de aorta foram homogeneizados com o objetivo de quantificar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD). A atividade enzimática foi determinada por um método espectrofotométrico indireto, baseado na inibição da auto-oxidação da adrenalina em meio alcalino, conforme descrito por Marques et al., (2019), com adaptações. Nesse método, a adrenalina sofre auto-oxidação ao reagir com $O_2^{\bullet-}$, formando adrenocromo, um composto que apresenta pico de absorção em 480 nm. A presença de SOD inibe essa reação ao promover a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Dessa forma, a atividade da SOD é inversamente proporcional à formação de adrenocromo, sendo avaliada pela diminuição da

absorbância ao longo do tempo. Para o ensaio, cada poço da placa recebeu 185 µL de tampão glicina (pH alcalino), 5 µL da amostra, 5 µL de catalase (para eliminar o H₂O₂ gerado) e 5 µL de solução de adrenalina. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 405 nm por 17 minutos, com registros a cada 60 segundos. A concentração proteica das amostras foi determinada previamente pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, para padronização da atividade enzimática em função do conteúdo proteico.

5.5.13 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em anéis de aorta torácica de ratos

A MEV foi empregada com o objetivo de avaliar a morfologia superficial e a integridade do endotélio vascular, possibilitando a visualização de alterações estruturais finas. Para tanto, os segmentos de aorta torácica provenientes dos grupos Controle (Ct), Cádmio (Cd), Ácido Elágico (AE) e Cádmio + Ácido Elágico (Cd+AE) foram coletados, lavados com tampão fosfato (PBS) e abertos longitudinalmente. Após 10 minutos em PBS, os tecidos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5%. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, contendo ferricianeto de potássio a 3,8% e cloreto de cálcio (CaCl₂) a 2,5 mM. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em série crescente de acetona e posteriormente incluídos em resina epóxi Epon 812. Cortes ultrafinos foram obtidos em criostato e analisados por microscopia eletrônica de transmissão (Zeiss EM 10C, n=3 por grupo). Para a análise por MEV, os segmentos foram secos por meio do método do ponto crítico, metalizados com uma camada de ouro de 20 nm e analisados em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940, conforme descrito por dos Santos et al. (2012) e Ximenes et al. (2017).

5.5.14 Análise da expressão proteica por Western Blotting

Amostras de aorta torácica foram dissecadas e armazenadas a -80 °C até o momento das análises. Para extração das proteínas, foi adicionado tampão RIPA

suplementado com inibidores de protease e fosfatase (proporção 1:100) e passaram pelo processo de lise celular utilizando um homogeneizador ultrassônico. Após a homogeneização, as amostras passaram por centrifugação a 6.000 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi então reservado para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, empregando um espectrofotômetro com leitura a 595 nm. A concentração proteica das amostras foi determinada comparando-se a absorbância das amostras com uma curva padrão gerada a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Todas as leituras foram realizadas em duplicata.

Com base nos resultados da quantificação, foi calculado o volume necessário para carregar 40 µg de proteína por amostra, ajustando o volume final com tampão RIPA para uniformizar entre todas as amostras. Em seguida, alíquotas foram misturadas a tampão Laemmli 4X (composição: 0,5 mM ureia, 0,17 mM SDS, 39 µM ditiotretol, 0,01 M Tris e 0,5% azul de bromofenol) e aquecidas a 95 °C por 5 minutos. As amostras foram então aplicadas em géis de acrilamida Stain-Free de 7,5% ou 10% (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, BioRad, Hercules, CA, USA), previamente equilibrados em tampão de corrida (25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina, 0,1% SDS). Foi também adicionado um marcador de peso molecular de amplo espectro (6–180 kDa). A eletroforese foi conduzida em corrente constante de 100 V (PowerPac™ HC, Bio-Rad, Singapura) por cerca de 2 horas.

Posteriormente, o gel com as proteínas separadas foi ativado usando o sistema ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) utilizando um sistema de transferência líquida (TransBlot SD Cell, Bio-Rad, USA). O processo ocorreu a 8 °C, aplicando-se uma corrente de 100 V durante 1 hora, em tampão de transferência composto por 25 mM Tris, 190 mM glicina, 0,1% SDS e 20% metanol.

Após a transferência, as membranas foram reveladas no sistema ChemiDoc com luz UV para detecção da proteína total por tecnologia Stain-Free, sem a necessidade de corante. Após este processo, as membranas foram bloqueadas

por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação, em solução de TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado em pó, para reduzir ligações inespecíficas. Na sequência, foram incubadas por 18 horas a 8 °C com os anticorpos primários: anti-NRF-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology – 33771), SOD-1 (isoforma citosólica Cu/Zn-SOD; 1:100, Santa Cruz Biotechnology – 271014) e SOD-2 (MnSOD; 1:500; Santa Cruz Biotechnology – 133134).

As membranas foram então lavadas com solução de TBS-T a cada 10 minutos, totalizando 30 minutos de lavagem, para remoção do anticorpo primário excedente. Posteriormente, foram incubadas por 1 hora, sob agitação em temperatura ambiente, com anticorpos secundários conjugados à peroxidase (IgG anti-mouse ou anti-rabbit, na diluição 1:5000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Novamente, seguiram-se lavagens por 30 minutos em TBS-T para eliminar anticorpo secundário não ligado.

A detecção dos imunocomplexos foi realizada por quimioluminescência, expondo as membranas por 5 minutos ao reagente ECL (Bio-Rad - 1705060). As imagens das bandas foram obtidas usando o sistema ChemiDoc e quantificadas com o software ImageLab. Para normalização, os sinais específicos das proteínas de interesse foram divididos pela intensidade da faixa total de proteína total da mesma amostra, garantindo correção de eventuais diferenças na carga proteica. Os resultados foram expressos como a razão entre os sinais da proteína alvo e a proteína total corrigidos pela média do grupo Ct.

5.5.15 Análises morfométricas e histoquímicas dos anéis de aorta

Os segmentos da aorta torácica foram isolados, fixados em paraformaldeído 10% por 24h e armazenados em álcool 70% a temperatura ambiente até o momento do processamento (desidratação em diferentes concentrações de álcool e xilol). Após o processamento, a amostra foi incluída em parafina a 60°C, seccionada em cortes de 5 µm para montagem das lâminas e em seguida, foram armazenadas em estufa a 45-50°C por 24h para fixar a amostra na lâmina.

Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) avaliar a morfologia geral das células da túnica média e íntima e relação parede/ lúmen (razão entre a área da parede e a área do lúmen do vaso); Picrosirius Red (PRR) para verificar deposição de colágeno na túnica média; e Verhoeff-Van Gieson (VVG) para avaliar as fibras elásticas. O conteúdo de colágeno foi expresso como porcentagem da área corada, e a relação parede-lúmen foi calculada como a área da parede do vaso dividida pela área do lúmen. Para todas as análises a túnica adventícia não foi considerada.

Previamente a coloração, as lâminas foram submetidas à desparafinização com duração de 3 minutos em cada etapa: 3 banhos com Xilol, 1 banho em solução álcool/xilol (1:1), seguido de 2 banhos em álcool 100%, 1 banho em álcool 96% e lavagem em água corrente. Logo após, as lâminas foram coradas com os corantes de interesse e posteriormente seguiram para protocolo de pós-coloração: 1 banho em álcool 96% (1 minuto), 2 banhos em álcool 100% (1 minuto em cada), 1 banho em solução álcool/xilol (1:1) (3 minutos) e 3 banhos em xilol (3 minutos em cada), finalizando com a aplicação da lamínula.

As imagens foram obtidas com microscópio óptico trinocular Leica DM500 com sistema de fotodocumentação ICC50 HD por meio do software LAS EZ (Leica Application Suite Version 3.4.0, Copyright 2016, Switzerland) e as análises foram realizadas com o software ImageJ. Para análise, foi capturada uma imagem do quadrante superior direito e esquerdo, e inferior direito e esquerdo de 3 cortes distintos.

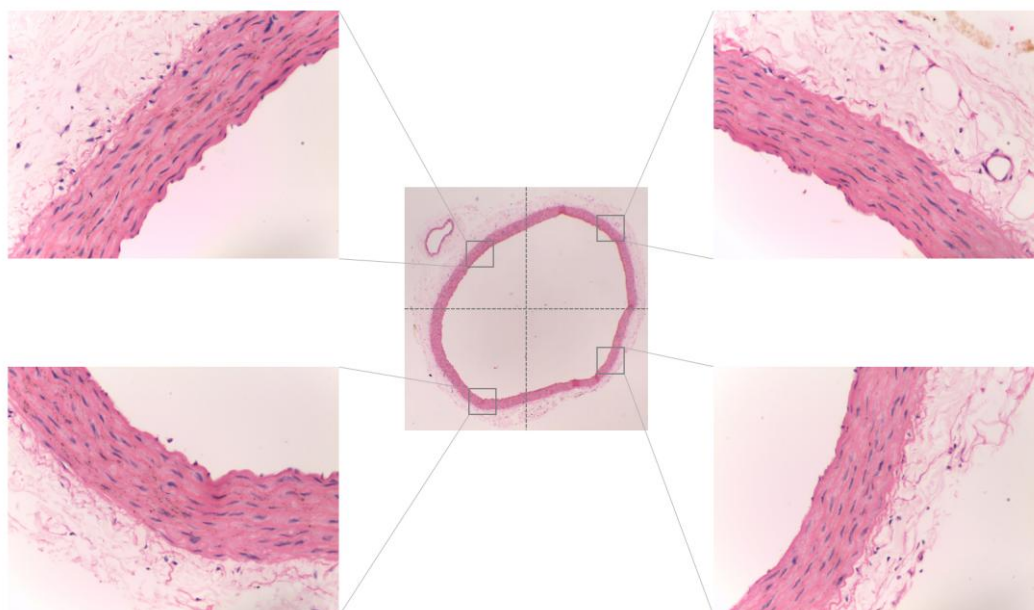


Figura 11. Representação dos quadrantes para captura das imagens para análise (Elaborado pela própria autora)

O processamento e as colorações das lâminas foram realizados no Laboratório Multiusuário de Histotécnicas (LHT) da Universidade Federal do Espírito Santo.

5.6 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), considerando o número de animais utilizados em cada protocolo experimental. O valor de “n” representa o número de animais por grupo e encontra-se indicado entre parênteses nas figuras e tabelas correspondentes. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro–Wilk, sendo confirmada a distribuição Gaussiana (normal) para todos os conjuntos de dados.

As respostas vasoconstritoras induzidas pela fenilefrina foram normalizadas com base na contração máxima provocada pelo KCl no respectivo anel de aorta, sendo expressas em porcentagem dessa contração. As respostas vasodilatadoras, tanto dependentes quanto independentes do endotélio, foram expressas como porcentagem de relaxamento em relação à tensão prévia gerada pela fenilefrina.

As curvas de reatividade vascular e os dados de pressão arterial sistólica foram comparados por meio de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), seguida de testes post hoc de Bonferroni ou Tukey, quando apropriado, para comparação entre as médias. Para análise da magnitude do efeito da remoção do endotélio ou da presença de fármacos moduladores sobre a vasoconstrição induzida pela fenilefrina, os resultados foram expressos como variação percentual da área abaixo da curva (Δ AAC), comparando-se as condições controle (sem fármaco) e experimental (com fármaco ou sem endotélio). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando os softwares Microsoft Excel® e GraphPad Prism®, versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

As análises histológicas dos anéis de aorta foram descritas de forma qualitativa e quantitativa. A quantificação foi realizada por análise de imagens em microscopia óptica, utilizando o software ImageJ. Os resultados quantitativos foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como nível de significância estatística.

5.7 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

4,5 diaminofluorescein (Sigma); Acetilcolina, cloridrato (Sigma); Ácido elágico, pureza 97% (AlfaAesar/ Thermo Fisher Scientific); Anticorpo anti- α -actina (Sigma); Alopurinol (Sigma); Albumina bovina (Sigma); Apocinina (Acetovanilona) (Sigma); Cloreto de potássio (Merck); Cloreto de Ca^{2+} dihidratado (Merck); Catalase (Sigma); Cloridrato de xilazina (Syntec); Cloridrato de cetamina (Syntec); Dihidroetídio (Sigma); Glicose (Merck); Hidróxido de sódio (Sigma); HEPES (SIGMA); N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma); Nitroprussiato de sódio dihidratado (Fluka); NOX4 (SAB1304615, Sigma); Fator respiratório nuclear-1 (NRF-1) (sc-33771, Santa Cruz); SOD1 (sc-271014, Santa Cruz); SOD2 (sc-133134, Santa Cruz).

6. RESULTADOS

6.1 Concentração sanguínea de cádmio

A determinação da concentração sanguínea de Cd no sangue total de ratos dos grupos experimentais Ct, AE, Cd e Cd+AE foi realizada após 30 dias de exposição. O grupo Cd apresentou $31,15 \mu\text{g/L} \pm 2,8 \mu\text{g/L}$ ($n=7$) de cádmio sanguíneo, o grupo Cd+AE ($n=4$) a concentração sanguínea de cádmio foi $29,67 \mu\text{g/L} \pm 2,15 \mu\text{g/L}$, enquanto os animais do grupo Ct ($n=8$) e grupo AE ($n=8$) apresentaram concentrações menores que o limite de quantificação (LQ) do método ($\text{LQ} = 0,24 \mu\text{g/L}$) (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de Cd no sangue total de ratos dos grupos experimentais Ct, AE, Cd e Cd+AE após 30 dias de exposição.

Concentração de cádmio em amostras de sangue		
Grupos experimentais	($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
Ct ($n=7$)	<0,24	-
AE ($n=8$)	<0,24	-
Cd ($n=7$)	31,15	2,8
Cd+AE ($n=4$)	29,67	2,15

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão relativo (RSD %) e limite de quantificação (LQ) de $0,24 \mu\text{g/L}$

6.2 Avaliação da massa corporal dos ratos

No início do experimento (Dia 0), os grupos experimentais apresentaram pesos corporais semelhantes, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre eles. Contudo, ao longo do período de tratamento, os animais passaram a apresentar perfis distintos de ganho de peso. Os animais dos grupos Ct, Cd e AE apresentaram peso semelhante do início (Dia 0) até a terceira semana (Dia 21) de tratamento, demonstrando que, isoladamente, a exposição isolada ao cádmio e ao AE não interferem inicialmente no peso dos animais. Porém, na quarta semana (Dia 28), foi observada uma redução significativa no

ganho de peso nos grupos AE e Cd, quando comparados ao grupo Ct. A redução no grupo Cd está de acordo com achados prévios descritos por Almenara et al. (2013), que também relataram perda ponderal em animais expostos ao Cd por períodos prolongados. Além disso, o grupo Cd+AE apresentou uma redução ainda mais acentuada no ganho de peso quando comparado aos demais grupos (Ct, Cd e AE), a partir da terceira semana de tratamento (Dia 14) (Tabela 2; Figura 12).

Tabela 2. Peso corporal (g) ao longo das semanas de exposição ao cádmio e/ou ácido elágico.

	Peso dos animais			
	Ct	Cd	AE	Cd+AE
Dia 0	270±14	279±13	278±18	272±15
Dia 7	307±19	301±9	304±19	284±18*
Dia 14	341±24	324±8	329±19	303±24*&#
Dia 21	368±25	352±11	351±16	318±24*&#
Dia 28	388±23	370±13*	367±21*	340±22*&#

Os valores estão expressos em média e EPM. ANOVA duas vias, aplicado na comparação dos pesos dos grupos em cada tempo, seguido de pós-teste de Tukey: *p<0,05- Ct,vs Cd+AE, Ct vs Cd e Ct vs AE; &p<0,05- AE vs Cd+AE; #p<0,05- Cd vs Cd+AE.

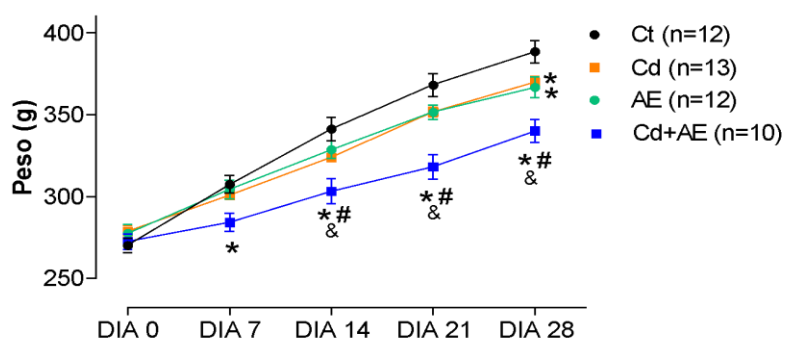


Figura 12. Avaliação do ganho de peso dos animais ao longo das semanas de tratamento. Número amostral está indicado entre parênteses. Valores expressos por média ± EPM; ANOVA duas vias e pós-teste de Tukey: *p<0,05 vs Ct; #p<0,05- vs Cd; &p<0,05 vs AE.

6.3 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Os animais dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE apresentaram valores semelhantes de PAS antes do início do tratamento (semana 0), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). A avaliação semanal da PAS demonstrou uma elevação progressiva e significativa nos valores do grupo Cd a partir da segunda semana, com manutenção desses níveis elevados até o final da quarta semana de exposição ($p < 0,05$ em relação aos grupos Ct, AE e Cd+AE), achado consistente com o previamente descrito por Almenara et al. (2013). Além disso, o valor da PAS na semana 4 foi significativamente maior do que o valor inicial (semana 0) no próprio grupo Cd ($p < 0,05$ vs Cd semana 0), indicando o desenvolvimento de hipertensão arterial ao longo da exposição ao cádmio. Por outro lado, o grupo Cd+AE não apresentou aumento significativo da PAS ao longo do tratamento, mantendo níveis semelhantes aos grupos controle e AE, o que sugere um efeito protetor do AE, prevenindo a instalação da hipertensão induzida por esse metal (Figura 13; Tabela 3).

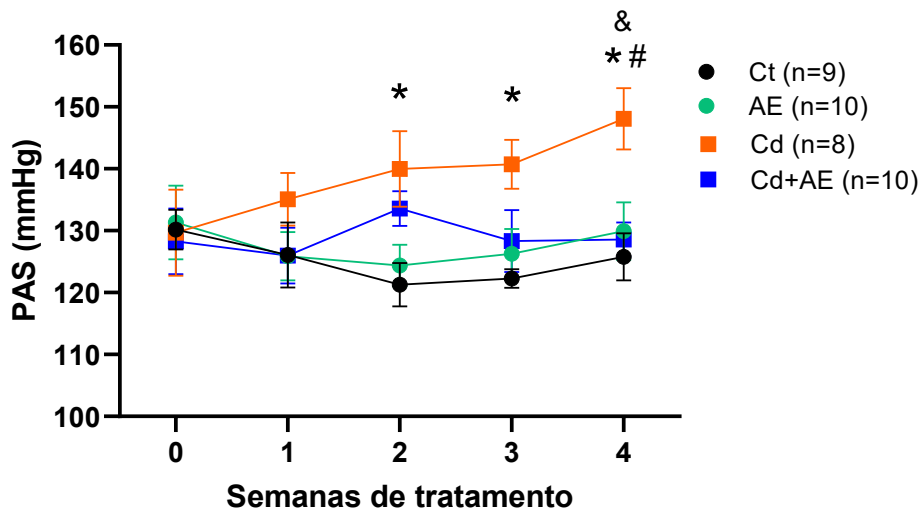


Figura 13. Média da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de pletismografia de cauda em ratos dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE, ao longo das semanas de exposição e/ou tratamento. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias e pós teste Tukey. * $p < 0,05$ vs Ct; # $p < 0,05$ vs AE e Cd+AE; & $p < 0,05$ vs Cd, semana 0.

Tabela 3. Valores médios da PAS dos animais dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE semanalmente ao longo dos 30 dias de exposição e/ou tratamento.

	Pressão Arterial Sistólica (PAS)				
	Semanas				
	0	1	2	3	4
Ct (n=9)	130,2 ±7	126,1 ±15	121,3 ±10	122,3 ±4	125,7 ±11
Cd (n=8)	129,6 ±2	135,1 ±11	140 ±15*	140,7 ±11*	148,1 ±14**&
AE (n=10)	131,3 ±1	125,88 ±12	124,4 ±10	126,2 ±12	130 ±14
Cd+AE (n=10)	128 ±12	126 ±14	133,59 ±9	128,34 ±16	128,55 ±9

Os resultados estão expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias e pós teste Tukey. *p<0,05 vs Ct; #p<0,05 vs AE e Cd+AE; &p<0,05 vs Cd, semana 0.

6.4 Reatividade vascular

Utilizamos protocolos de reatividade vascular in vitro para avaliar as vias vasoativas alteradas pela exposição ao cádmio e/ou ácido elágico.

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

A fim de avaliar a integridade funcional do MLV da aorta, todos os anéis foram expostos ao KCl (75 mM). As respostas contráteis induzidas pelo KCl foram similares entre os grupos (Ct: 2,95g±0,01g, n=14; Cd: 3,11g±0,09g, n=16; AE:3,01g±0,10g, n=12 e Cd+AE:2,89g±0,15g, n=12).

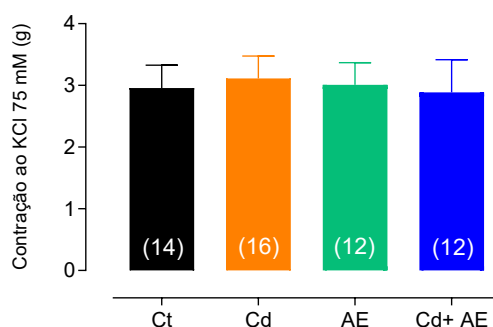


Figura 14. Avaliação da integridade funcional do MLV da aorta ao KCl (75 mM) nos grupos Ct, Cd, Cd+AE e AE. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como

porcentagem da contração induzida por 75 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA uma via. $p > 0,05$.

6.4.2 Reatividade vascular à fenilefrina de segmentos isolados de aorta

A administração cumulativa de fenilefrina, um agonista α_1 -adrenérgico, promoveu aumento progressivo da contração em anéis isolados de aorta em todos os grupos experimentais avaliados, de forma concentração-dependente. No entanto, os animais expostos ao cloreto de cádmio apresentaram uma resposta vasoconstritora significativamente aumentada em comparação aos demais grupos. Por outro lado, os grupos Ct, AE e Cd+AE não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na reatividade contrátil à fenilefrina entre si (Figura 15)

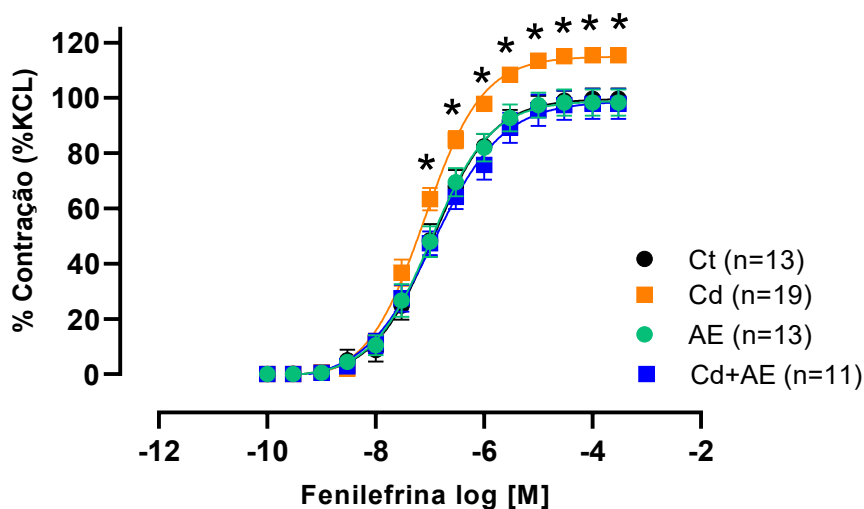


Figura 15. Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica nos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. O número de animais utilizados está indicado entre parênteses. Valores expressos em média e EPM. ANOVA duas vias, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ - vs Ct, AE e Cd+AE.

6.4.3 Efeitos da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico sobre a modulação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para investigar a participação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina, realizamos a remoção mecânica do endotélio nos anéis de aorta dos grupos experimentais e avaliamos as curvas concentração-resposta. Observou-se que a denudação endotelial promoveu um aumento da resposta contrátil à fenilefrina em todos os grupos analisados (Figura 16), o que é consistente com o papel do endotélio vascular, que libera fatores vasodilatadores que modulam e atenuam a contração do músculo liso vascular. Notavelmente, o grupo exposto ao cádmio apresentou uma redução na magnitude da porcentagem da diferença da área abaixo da curva (dAAC%), indicando que o aumento da resposta contrátil à fenilefrina pode estar associado a alterações na função endotelial induzidas pelo Cd. Ademais, o grupo tratado concomitantemente com AE manteve respostas contráteis próximas às observadas no grupo Ct, sugerindo que o AE impediu a redução da função endotelial causada pela exposição ao Cd, sugerindo um efeito protetor do AE sobre a disfunção endotelial causada pelo metal.

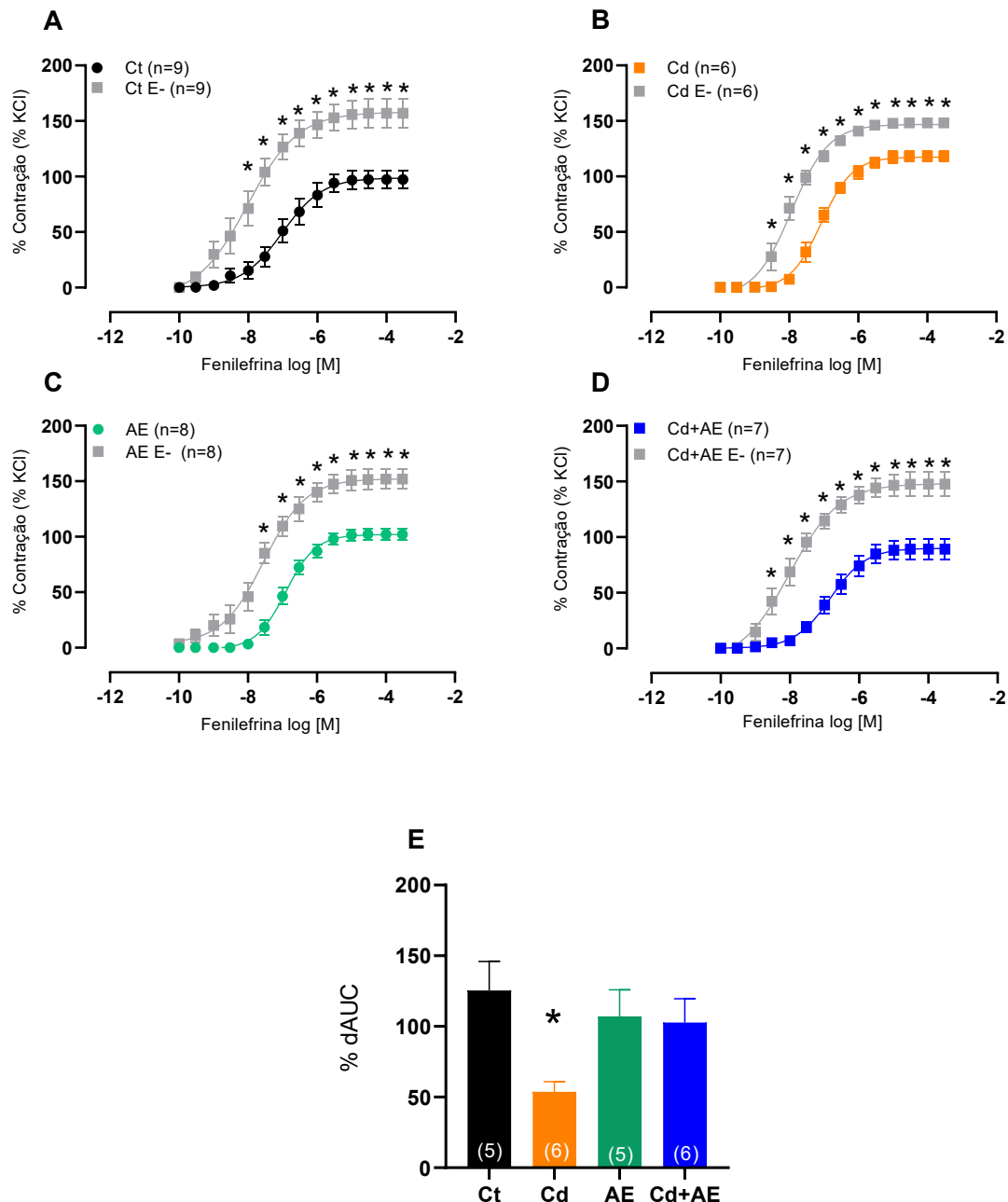


Figura 16. Participação do endotélio vascular na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica nos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com endotélio e os respectivos grupos após remoção do endotélio (E-); (E) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) para comparação entre os grupos. Valores expressos em média e EPM, número de animais representado entre parênteses. ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs curva controle correspondente. ANOVA uma via e pós-teste de Bonferroni foi usado na dAAC, * $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE.

A análise dos segmentos de aorta sem endotélio evidenciou que as alterações na reatividade vascular induzidas pelo Cd estão fortemente associadas à presença e funcionalidade do endotélio. Diante disso, para avaliar de forma mais

específica a função endotelial, foi analisada a resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina (ACh), um agente cuja ação é dependente da integridade e funcionalidade do endotélio vascular.

6.4.4 Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio nos segmentos isolados de aorta torácica

A função endotelial foi avaliada por meio de curvas concentração-resposta à ACh, agonista que estimula a produção de NO pelas células endoteliais, promovendo vasodilatação ao ativar os receptores muscarínicos (RATTMANN, 2009; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; FÖRSTERMANN & SESSA, 2012). Anéis de aorta com endotélio íntegro foram pré-contraídos com fenilefrina e o relaxamento induzido pela ACh foi avaliado após atingir o platô contrátil. Observou-se relaxamento vascular em todos os grupos experimentais. Contudo, o grupo exposto ao Cd apresentou redução significativa no relaxamento induzido pela acetilcolina quando comparado aos grupos Ct, AE e Cd+AE (Figura 17). O grupo Cd+AE apresentou relaxamento significativamente superior ao do grupo Cd, demonstrando que o AE foi eficaz em preservar a resposta vasodilatadora endotelial mesmo com a exposição ao Cd. Essa diferença do relaxamento entre Cd e Cd+AE sugere um efeito protetor do AE frente à disfunção endotelial induzida por esse metal ($\#p < 0,05$ vs Cd).

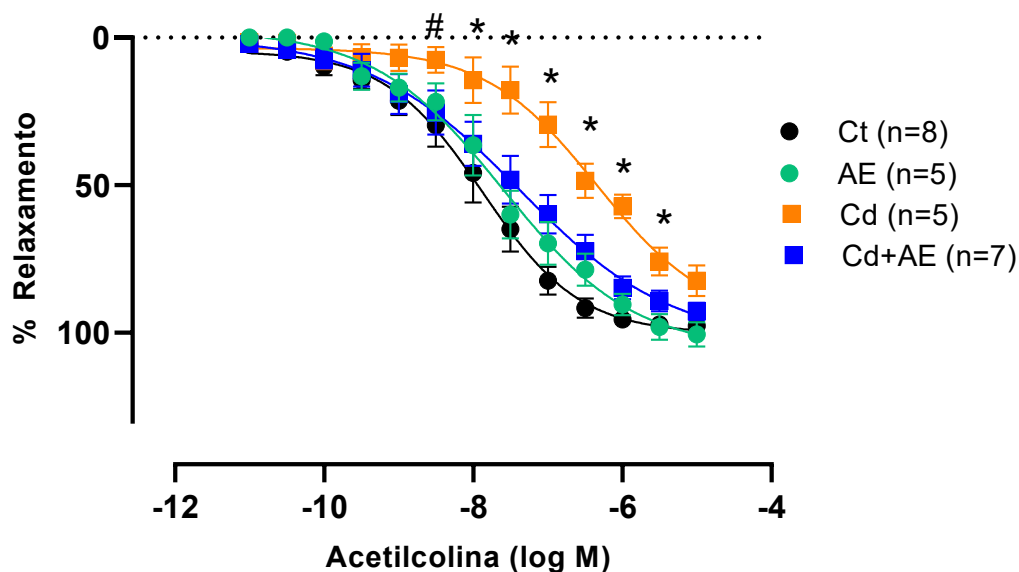


Figura 17. Resposta dilatadora induzida pela ACh em anéis de aorta dos grupos Ct, AE, Cd e Cd+AE. Valores expressos em média e EPM, expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. ANOVA duas vias, pós-teste de Tukey. # $p < 0,05$ - vs Ct; * $p < 0,05$ - vs Ct, AE e Cd+AE. Número de animais representado entre parênteses.

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

Para investigar se o prejuízo no relaxamento induzido pela acetilcolina poderia estar relacionado a alterações na via de sinalização do NO no MLV, realizamos experimentos em anéis de aorta com o endotélio mecanicamente removido. Nestes ensaios, avaliamos o relaxamento em resposta ao NPS, um doador direto de NO que age independente da função endotelial.

A administração de concentrações crescentes de NPS induziu relaxamento em todos os grupos experimentais, sem diferenças estatísticas significativas entre eles (Figura 18). Este resultado sugere que a via de sinalização do NO no músculo liso vascular permaneceu preservada em todos os grupos, indicando que o comprometimento do relaxamento à ACh observado no grupo Cd provavelmente está relacionado especificamente à disfunção endotelial, e não a alterações na resposta do músculo liso vascular ao NO.

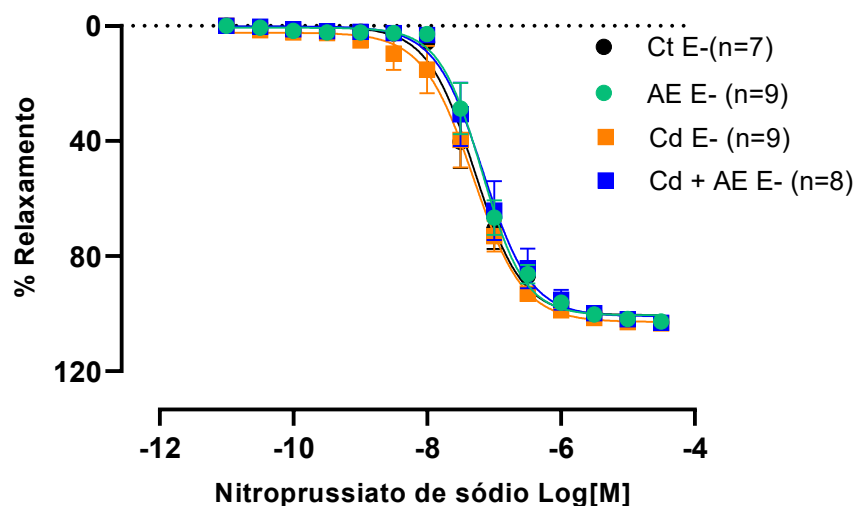


Figura 18. Curva de relaxamento ao NPS em anéis de aorta dos grupos Ct, AE, Cd e Cd+AE com o endotélio mecanicamente removido para avaliação do relaxamento independente do endotélio. Valores expressos como percentual do relaxamento após pré-contracção com fenilefrina. ANOVA duas vias, pós-teste de Tukey. $P > 0,05$. Número de animais representado entre parênteses.

6.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR TRINTA DIAS AO CÁDMIO E/OU ÁCIDO ELÁGICO SOBRE AS VIAS VASOATIVAS ENDOTELIAIS NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Considerando que a exposição ao Cd intensificou a resposta contrátil à fenilefrina, reduziu a modulação endotelial e comprometeu o relaxamento vascular dependente do endotélio (ACh), e que o AE demonstrou capacidade de preservar ou prevenir esses efeitos deletérios sobre a função vascular, torna-se evidente a relevância de aprofundar a investigação dos mecanismos envolvidos.

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

O NO é sintetizado pelas células endoteliais e atua no MLV promovendo vasodilatação. Para investigar a participação do NO na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta torácica foram incubados com L-NAME (100 μ M), um inibidor não seletivo da NOS, enzima responsável pela produção de NO. A incubação com L-NAME resultou em aumento significativo da resposta contrátil à fenilefrina em todos os grupos experimentais (Figuras 19A–D), indicando que

o NO está envolvido na modulação da vasoconstrição induzida por fenilefrina. Por outro lado, o grupo exposto ao Cd apresentou uma redução da contração vascular após a incubação com L-NAME (Figura 19B), sugerindo que a exposição ao Cd comprometeu a síntese e/ou biodisponibilidade de NO. Esse efeito é corroborado pela análise da variação da área sob a curva (%AAC), que foi significativamente menor no grupo Cd em comparação aos demais (Figura 19E), indicando baixa contribuição do NO na modulação da resposta contrátil.

Importante destacar que a coincubação de Cd e AE (Cd+AE) restaurou a resposta contrátil na presença do cádmio (Figura 19D), com valores de %AAC semelhantes aos do grupo controle (Figura 19E). Em conjunto, esses resultados indicam que a exposição ao cádmio compromete a participação do NO na modulação da contratilidade vascular, enquanto o AE exerce efeito protetor.

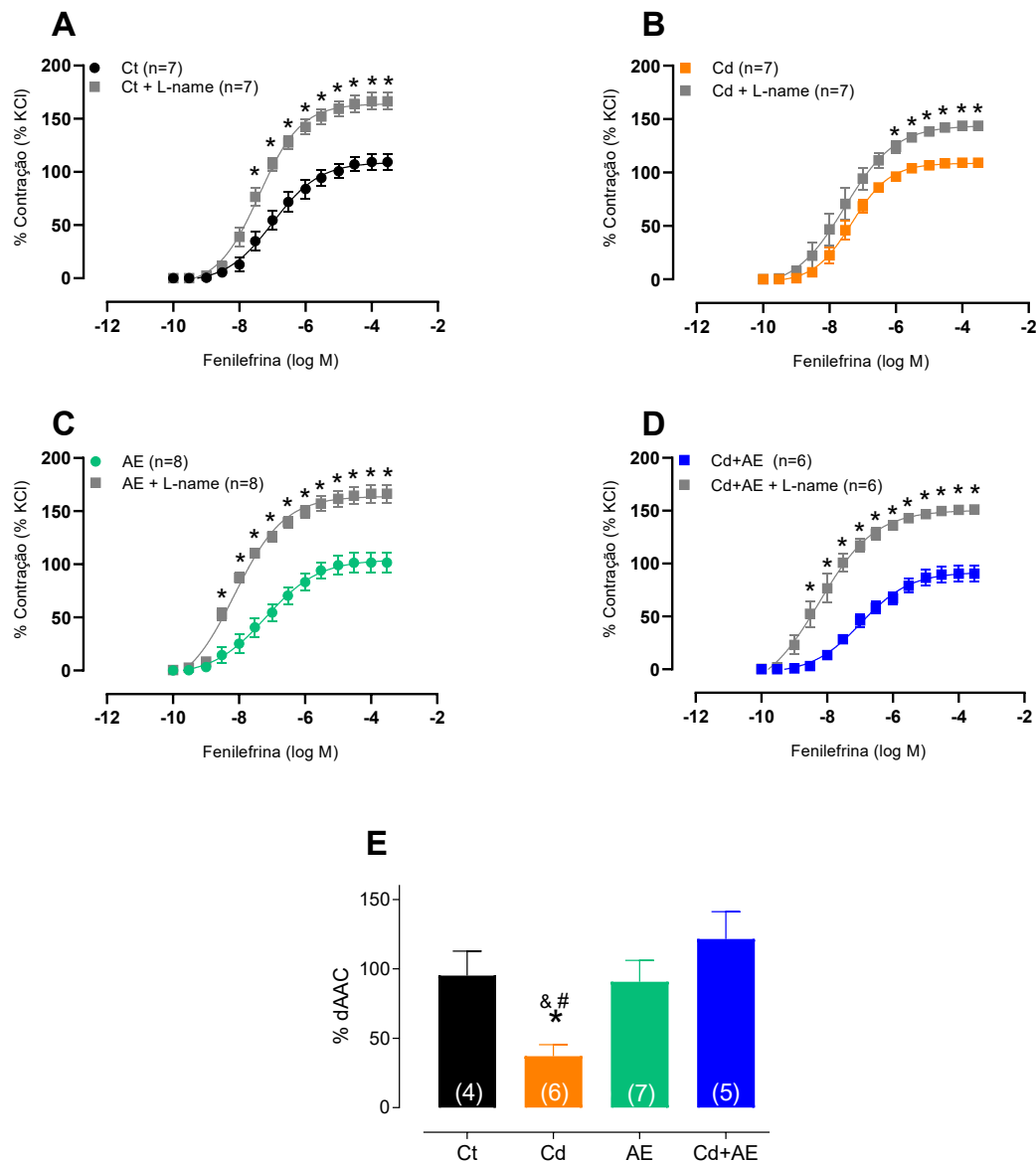


Figura 19. Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico com L-NAME (100 μ M) na curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos da aorta torácica dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com L-NAME e os respectivos grupos sem intervenção. Diferença percentual da área abaixo da curva concentração-resposta (dAAC%) para comparação entre os grupos (E). Valores expressos em média e EPM, número de animais representados entre parênteses. ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05 vs curva controle correspondente. ANOVA uma via e pós-teste de Bonferroni foi usado na dAAC, *p < 0,05 vs Ct, AE e Cd+AE.

6.5.2 Detecção in situ do NO em segmentos de aorta

Com o objetivo de complementar os achados funcionais obtidos na curva de reatividade vascular ao L-NAME, realizamos a análise da produção in situ de NO por meio da sonda fluorescente DAF-2 DA. Os resultados demonstraram uma redução significativa na fluorescência no grupo tratado com Cd, indicando diminuição da produção e/ou biodisponibilidade de NO. Em contraste, no grupo Cd+AE, o co-tratamento com AE restaurou os níveis de fluorescência a valores semelhantes aos observados no grupo Ct, sugerindo que o AE promove aumento da produção ou biodisponibilidade de NO. Esses achados corroboram os dados funcionais obtidos com o L-NAME e reforçam o efeito protetor do AE sobre a função endotelial, atenuando a toxicidade induzida pelo cádmio (Figura 20).

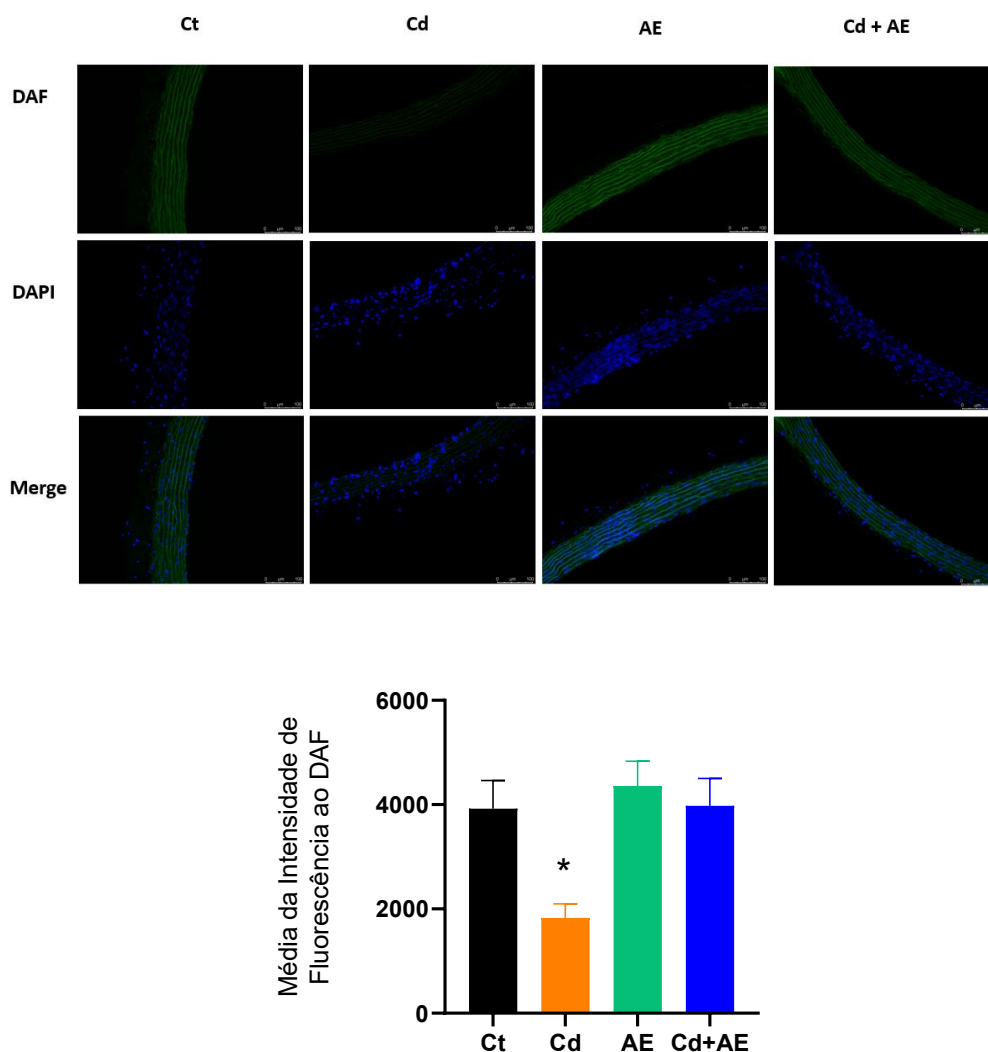


Figura 20. Detecção “in situ” do NO em segmentos de aorta. (A) Fotomicrografias de fluorescência representam segmentos de aorta na presença da sonda fluorescente

sensível ao NO 4,5-diaminofluoreceim (DAF-2DA) nos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. (B) Gráfico de barras demonstrando a análise semi-quantitativa dos níveis de fluorescência. Dados expressos como média $\pm$ EPM da densidade de fluorescência. Análise comparativa realizada por ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE.

6.5.3 Envolvimento das Espécies Reativas de Oxigênio na exposição por trinta dias ao cloreto de cádmio e/ou ácido elágico sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

É amplamente reconhecido que as EROs podem reduzir a biodisponibilidade do NO, contribuindo para o aumento da reatividade vascular. Diante disso, avaliamos se a hiper-reatividade observada à fenilefrina no grupo tratado com cádmio estaria associada a uma maior produção de EROs. Dessa forma, investigamos a participação das EROs e do estresse oxidativo nas alterações vasculares induzidas pela exposição crônica ao Cd, bem como o potencial efeito protetor do AE frente a esses danos. Para isso, foram realizadas curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de SOD (150 U/ml), Catalase (1000 U/ml), Apocinina (30 μ M) e Alopurinol (100 μ M).

6.5.4 Participação do ânion superóxido sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Para investigar a influência do ânion superóxido na hiper-reatividade vascular induzida pelo Cd, utilizamos a enzima superóxido dismutase (SOD, 150 U/ml), responsável pela conversão do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No grupo exposto ao Cd, a presença da SOD promoveu uma redução significativa da resposta contrátil à fenilefrina comparado ao grupo Ct, indicando aumento da reatividade vascular associado à elevação da produção de ânion superóxido. Em contrapartida, a incubação com SOD não alterou significativamente a resposta contrátil nos grupos Ct, AE e Cd+AE, sugerindo que nestes grupos a produção de ânion superóxido está controlada ou reduzida (Figura 21). O co-tratamento com AE foi eficaz em inibir a participação de ânion

superóxido nos anéis aórticos dos animais expostos ao Cd (Figura 21D), evidenciando o potencial antioxidante do composto.

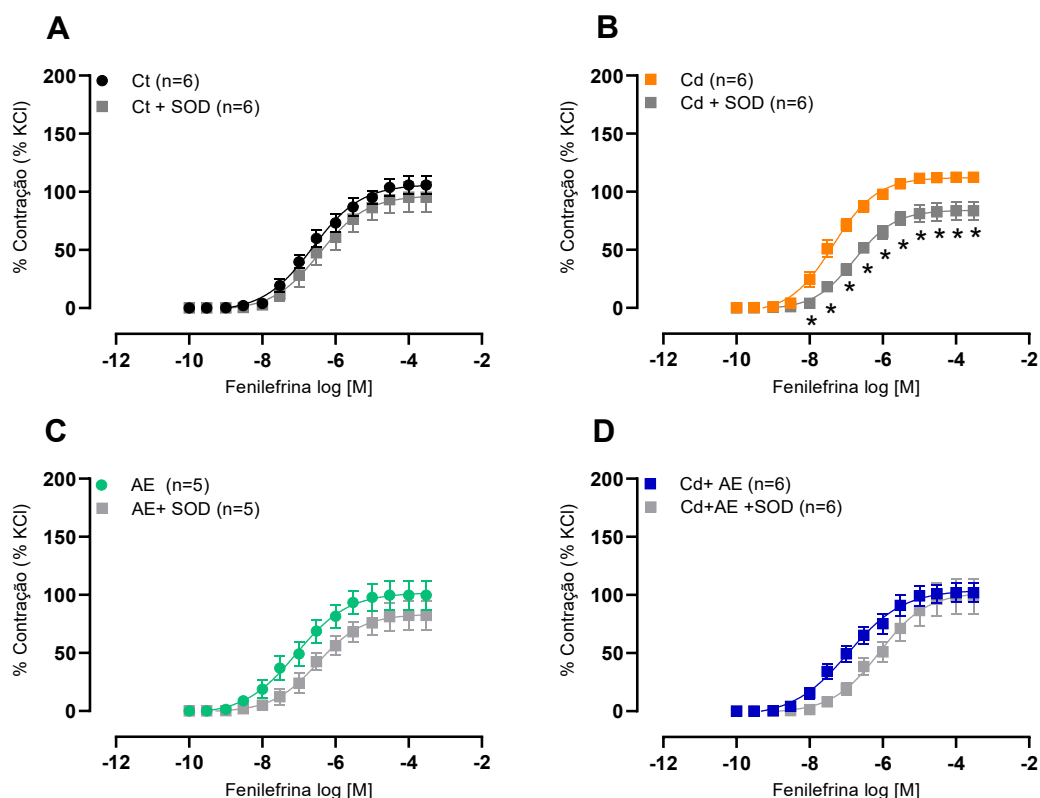


Figura 21. Participação de ânion superóxido na reatividade vascular à fenilefrina de segmentos aórticos com exposição crônica ao cloreto de cádmio e/ou co-tratamento com AE. Efeito do varredor de ânion superóxido, SOD (150 U/ml), sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com SOD e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados estão indicados entre parênteses. Os resultados (média $\pm$ EPM) da resposta à fenilefrina estão expressos em porcentagem da contração induzida por 75 mM KCl. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * p < 0,05 - vs Cd.

6.5.5 Expressão proteica e atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

Considerando o aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ observado no grupo exposto ao Cd e a ação protetora do AE que impediu o aumento dessa EROs, investigamos a participação do sistema antioxidante enzimático por meio da análise da expressão das isoformas da superóxido dismutase: SOD1 (Cu/Zn-SOD,

citoplasmática) e SOD2 (Mn-SOD, mitocondrial) (Figura 22). Não houve diferença significativa na expressão proteica da isoforma Cu/Zn-SOD entre os grupos experimentais (Figura 22A). Entretanto, na isoforma mitocondrial Mn-SOD (Figura 22B), a exposição ao Cd aumentou significativamente a sua expressão em relação aos grupos Ct, AE e Cd+AE. Por outro lado, observou-se que o AE promoveu redução da expressão proteica de Mn-SOD mesmo com a exposição ao Cd, sugerindo que o AE, ao ser administrado concomitantemente ao Cd, é capaz de promover ativação redox mitocondrial.

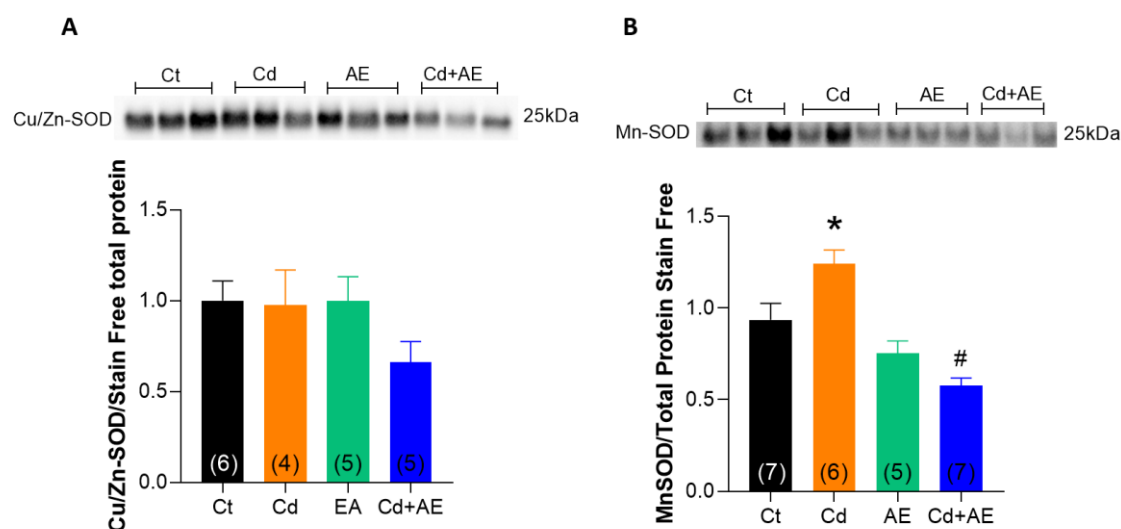


Figura 22. Análise densitométrica do Western blotting para expressão da isoforma Cu/Zn-SOD (SOD1) (A) e isoforma mitocondrial Mn-SOD (SOD2) (B) na aorta de ratos dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica. (A) Bandas da isoforma Cu/Zn citosólica da enzima superóxido dismutase (SOD1) e (B) Bandas da Mn-SOD (SOD2) corrigida pelo conteúdo de proteína total. Número de animais utilizados está indicado entre parênteses. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, entre a densidade das bandas. ANOVA uma via e pós teste de Fisher. Para (A) $p > 0,05$; (B) * $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE; # $p < 0,05$ vs Ct

A atividade da enzima SOD foi avaliada nos diferentes grupos experimentais com o intuito de investigar o efeito do AE na resposta antioxidante frente à exposição ao Cd. Conforme demonstrado na Figura 23, observou-se aumento significativo na atividade da SOD apenas no grupo Cd+AE em relação aos demais grupos (* $p < 0,05$).

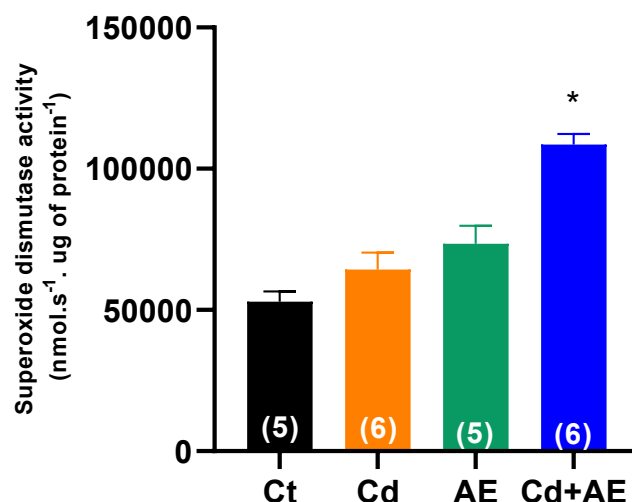


Figura 23. Efeitos da exposição ao Cd e/ou AE sobre atividade antioxidante da SOD nos anéis de aorta de animais do grupo Ct, Cd, AE e Cd+AE. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via, pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs Ct, Cd e AE.

6.5.6 Participação do peróxido de hidrogênio na reatividade vascular de anéis de aorta

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma ERO com propriedades de sinalização que pode modular o tônus vascular. A catalase é um antioxidante endógeno que decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio, desempenhando papel essencial na defesa contra o estresse oxidativo.

Com o objetivo de investigar a participação do H_2O_2 na reatividade vascular à fenilefrina, os anéis de aorta isolados dos diferentes grupos experimentais foram incubados com catalase (1000 U/mL), visando inativar o peróxido de hidrogênio presente no meio.

Na Figura 24, observa-se que a incubação com catalase não alterou a reatividade à fenilefrina em nenhum dos grupos experimentais, sugerindo que o H_2O_2 não exerce influência relevante na contratilidade à fenilefrina nessas condições.

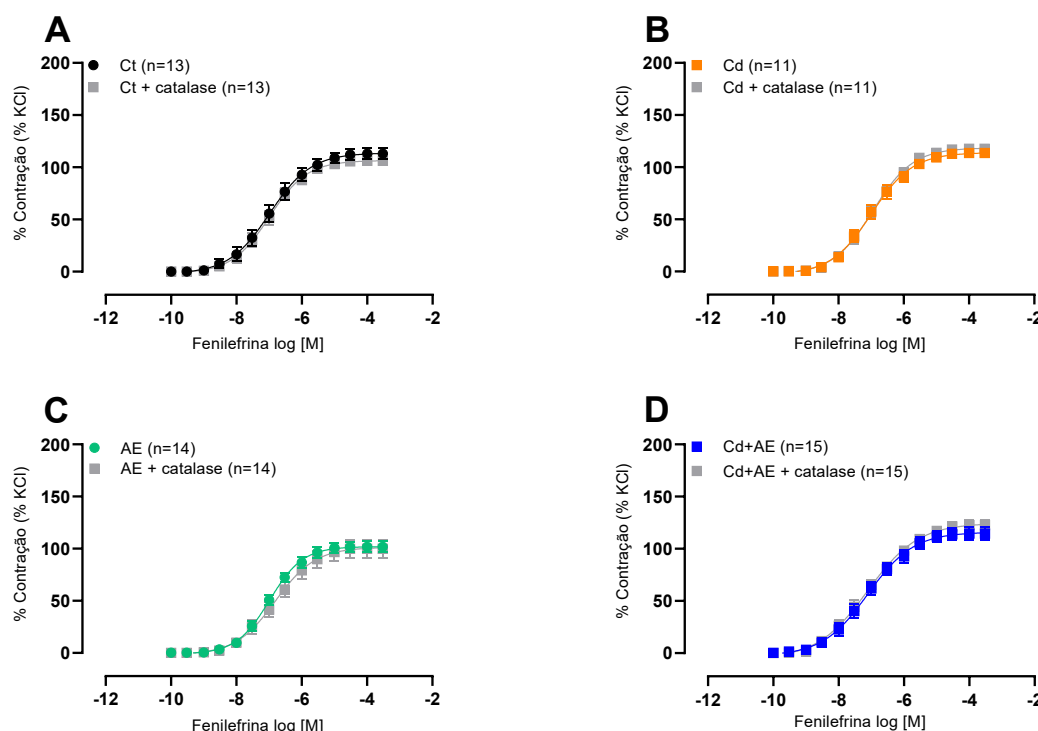


Figura 24. Participação de H_2O_2 na reatividade vascular à fenilefrina de segmentos aórticos com exposição ao Cd e/ou AE. Efeito da catalase (1000 U/mL) que degrada H_2O_2 em oxigênio e água, sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com catalase e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados estão indicados entre parênteses. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. $p > 0,05$.

6.5.7 Influência da NADPH oxidase sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Para investigar o envolvimento das EROs via NADPH oxidase na resposta vascular, realizamos curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou ausência de Apocinina (30 μ M), que nessa concentração atua como um inibidor não seletivo da NADPH oxidase (HEUMULLER et al., 2008), considerada uma das principais fontes geradoras de EROs no leito vascular (HERNANZ et al., 2014; TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011).

No grupo Ct e no grupo tratado apenas com AE, a apocinina não alterou a resposta contrátil à fenilefrina, sugerindo baixa participação de EROs derivadas

da NADPH oxidase na regulação do tônus vascular nesses grupos. Em contraste, no grupo exposto ao Cd, a apocinina reduziu significativamente a contração induzida pela fenilefrina, indicando que o Cd promove produção de EROs via NADPH oxidase, contribuindo para a hiper-reatividade vascular. Por fim, no grupo Cd+AE, a incubação com apocinina não promoveu alterações significativas na contratilidade sugerindo que o AE foi capaz de prevenir o aumento de EROs induzido pelo Cd, neutralizando o estresse oxidativo (Figura 25).

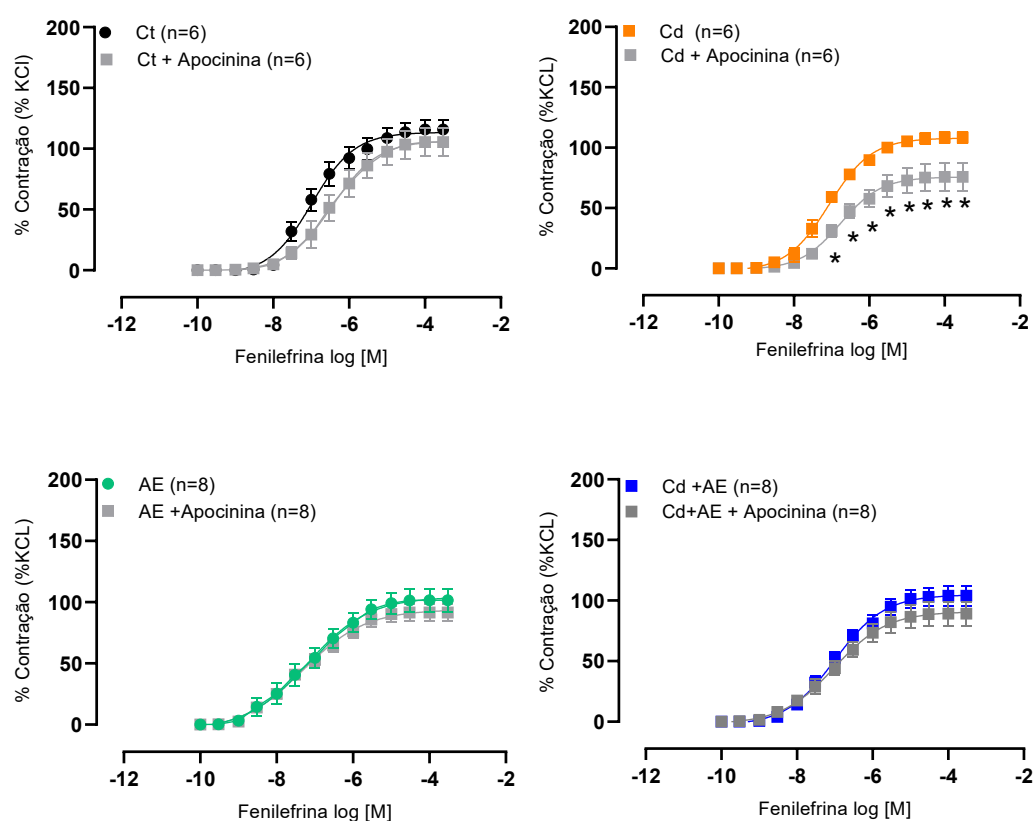


Figura 25. Efeito do inibidor não seletivo da NADPH oxidase com Apocinina (30 μM) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com Apocinina e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados indicados entre parênteses. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * p < 0,05 - vs Cd.

6.5.8 Expressão proteica da subunidade da NADPH oxidase

Os efeitos funcionais observados na reatividade vascular após a incubação com apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, motivaram a análise da expressão proteica dessa enzima, a fim de confirmar, em nível molecular, sua participação na disfunção vascular induzida pelo cádmio.

Diante disso, foi avaliada a expressão da isoforma NOX4, uma subunidade catalítica da NADPH oxidase, reconhecida como uma das principais fontes de EROs no sistema cardiovascular (CANUGOVI et al., 2019). A NOX4 é expressa predominantemente em células endoteliais e de MLV, estando fortemente associada a processos de estresse oxidativo vascular (AGO et al., 2005; PENDYALA et al., 2009; PETRY et al., 2006; LEE et al., 2010). Para essa análise, a expressão proteica da NOX4 foi quantificada por meio da técnica de Western blotting em segmentos da aorta torácica de ratos pertencentes aos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE.

Foi observado aumento da expressão dessa subunidade nos segmentos arteriais de ratos expostos ao Cd em relação aos demais grupos (Figura 26).

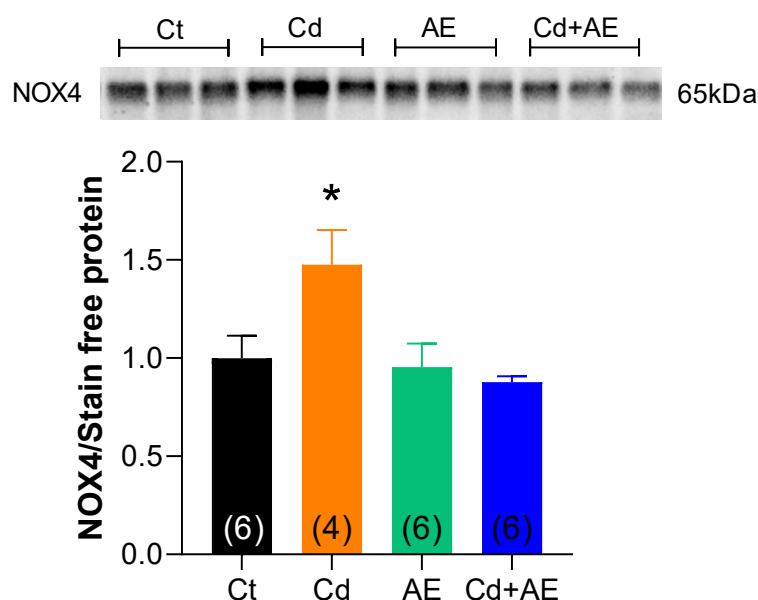


Figura 26. Resultados da expressão proteica da subunidade NOX4 da enzima NADPH oxidase, por meio da técnica de Western Blotting, em segmentos de aorta torácica dos grupos Ct (n=6), Cd (n=5), AE (n=5) e Cd+AE (n=6). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica corrigidas pelo conteúdo de proteína total. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, como relação entre a densidade

das bandas da NOX4 e da α -actina. ANOVA uma via pós teste Fisher's LSD* $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE.

6.5.9 Participação xantina oxidase na reatividade vascular de anéis de aorta

A xantina oxidase é uma importante fonte de EROs no sistema vascular, especialmente em condições de estresse oxidativo. Durante o metabolismo das purinas, essa enzima catalisa a conversão de hipoxantina em xantina e, subsequentemente, em ácido úrico, gerando superóxido e peróxido de hidrogênio como subprodutos. O alopurinol, um inibidor competitivo da xantina oxidase, é utilizado para reduzir a produção de EROs e, conseqüentemente, atenuar o estresse oxidativo vascular. Assim, com o objetivo de investigar a participação da xantina oxidase na reatividade vascular à fenilefrina, anéis de aorta de ratos foram incubados com alopurinol (100 μ M), e em seguida submetidos a curvas de concentração-resposta à fenilefrina.

Os resultados demonstraram que a incubação com o alopurinol não alterou a resposta contrátil à fenilefrina nos grupos Ct, AE e Cd+AE (Figura 27 A,C e D) indicando que nessas condições a xantina oxidase não exerce influência significativa sobre a contratilidade vascular. Por outro lado, no grupo tratado com Cd (Figura 27B), a incubação com alopurinol reduziu significativamente a resposta contrátil à fenilefrina, sugerindo que a exposição ao Cd aumenta a participação da xantina oxidase promovendo aumento da contratilidade vascular. No grupo Cd+AE (Figura 23D), o alopurinol não promoveu alterações significativas, indicando que o tratamento com AE foi capaz de atenuar previamente o efeito do cádmio sobre essa via de produção de EROs.

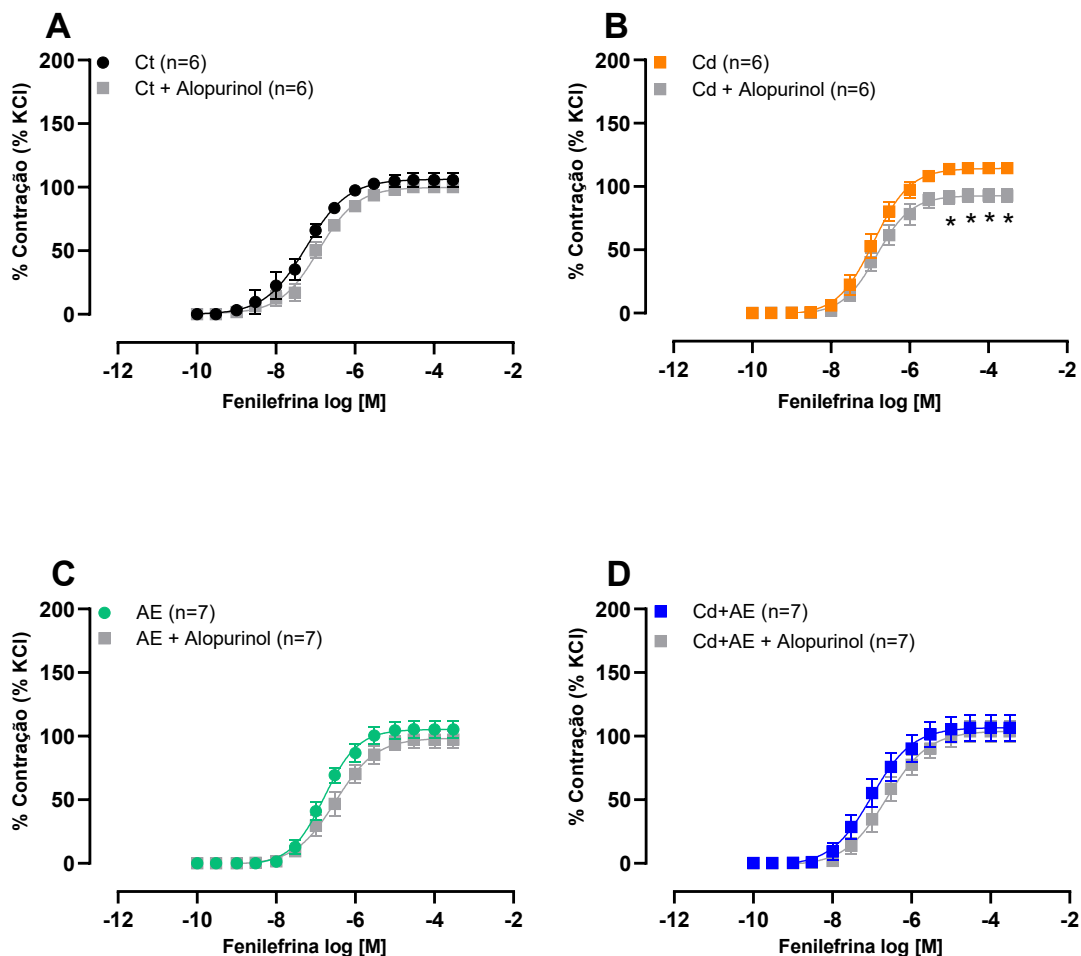


Figura 27. Participação da Xantina oxidase (100 μ M) sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Ct (A), Cd (B), AE (C) e Cd+AE (D) com Alopurinol e os respectivos grupos sem intervenção. Número de animais utilizados estão indicados entre parênteses. Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$

6.5.10 Detecção in situ de ânion superóxido em segmentos de aorta torácica

Com o objetivo de confirmar o aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ sugerido pelos dados funcionais, foi realizada a detecção in situ por fluorescência ao diidroetídio (DHE) em cortes de aorta torácica. Conforme mostrado na Figura 28, os animais expostos ao Cd apresentaram intensa marcação avermelhada no tecido vascular, indicando um aumento significativo da fluorescência ao DHE em comparação ao grupo Ct. A análise quantitativa da intensidade média de fluorescência confirmou esse achado, evidenciando um aumento estatisticamente significativo no grupo Cd (* $p < 0,05$).

Em contraste, os grupos tratados com AE, tanto de forma isolada quanto em coadministração com Cd (Cd+AE), exibiram redução da fluorescência ao DHE, com valores próximos aos observados no grupo controle. Esses resultados indicam que o ácido elágico foi eficaz em atenuar o estresse oxidativo induzido pelo cádmio, possivelmente por sua ação antioxidante direta na neutralização do ânion superóxido.

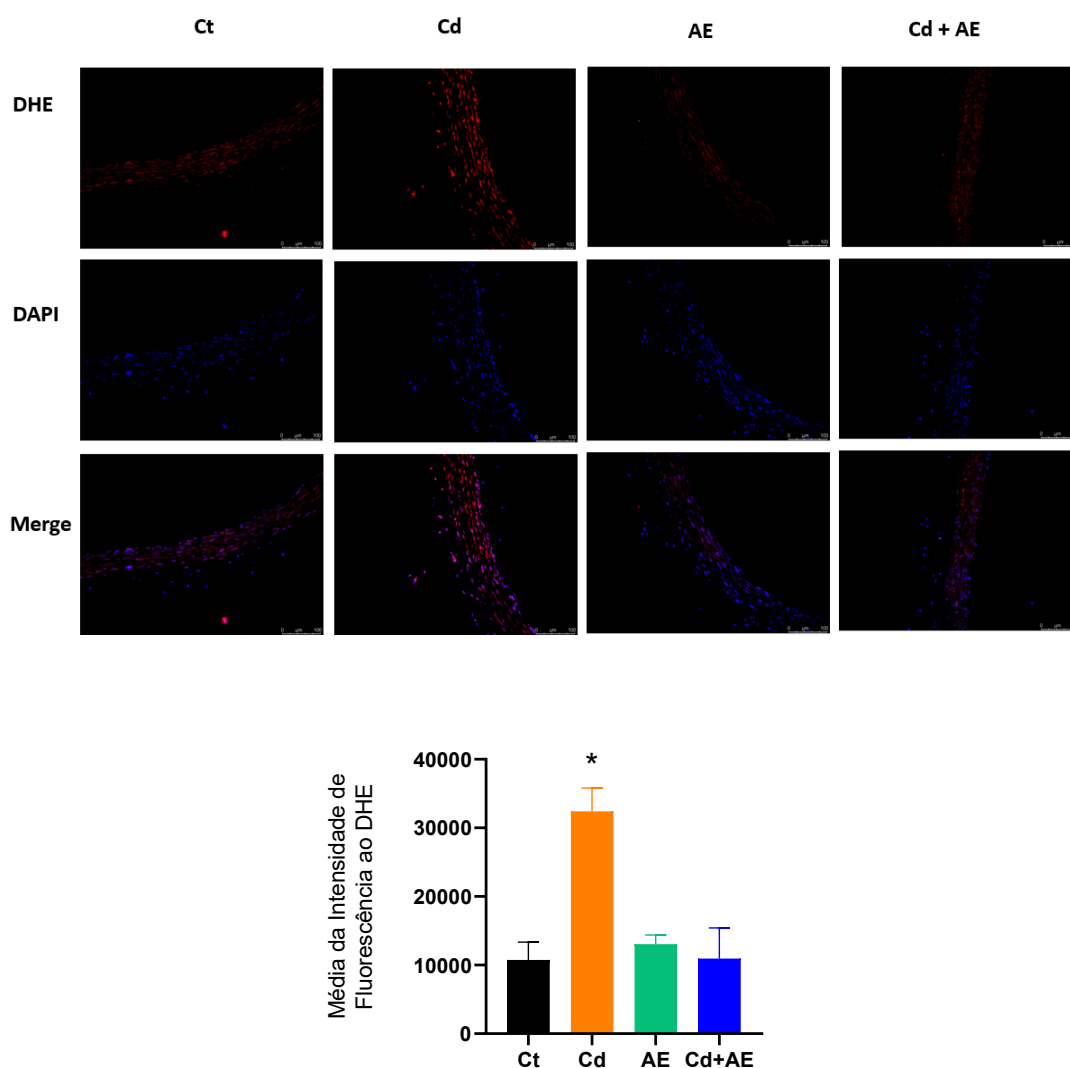


Figura 28. Detecção *in situ* de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em segmentos de aorta torácica. Imagens de fluorescência representativas de cortes transversais de aorta corados com diidroetídio (DHE) em animais dos grupos Controle (Ct), Cádmio (Cd), Ácido Elágico (AE) e Cádmio com co-tratamento com ácido elágico (Cd+AE). A coloração em vermelho indica a presença de ânion superóxido, enquanto a marcação em azul (DAPI) representa os núcleos celulares. O gráfico de barras apresenta a análise semiquantitativa da intensidade de fluorescência ao DHE, expressa em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O número de animais por grupo está indicado entre parênteses.

A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ versus Ct, AE e Cd+AE.

6.5.11 Avaliação da expressão proteica de NRF-1 nos anéis de aorta torácica

O NRF-1 (Fator Respiratório Nuclear-1) é um fator de transcrição envolvido na biogênese mitocondrial e na regulação de genes relacionados à respiração mitocondrial e ao metabolismo oxidativo. A análise da expressão da proteína NRF-1 na aorta de ratos revelou que a exposição ao Cd aumentou significativamente a expressão de NRF-1 em relação ao grupo Ct, AE e Cd+AE. Nos grupos Ct, AE e Cd+AE os níveis de NRF-1 foram semelhantes.

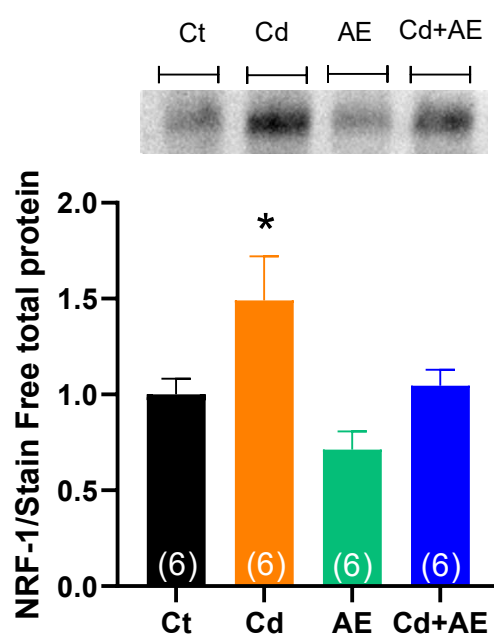


Figura 29. Resultados da expressão proteica do fator de transcrição mitocondrial NRF-1 (Fator Respiratório Nuclear-1), por meio da técnica de Western Blotting, em segmentos de aorta dos grupos Ct (n=6), Cd (n=6), AE (n=6) e Cd+AE (n=6). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, corrigidas pela proteína total. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, como relação entre a densidade das bandas. ANOVA uma via pós teste Fisher's LSD, * $p < 0,05$ vs Ct; AE e Cd+AE.

A partir dos dados obtidos com a sonda DHE, foi possível confirmar o aumento da produção de EROs no grupo exposto ao cádmio, o que reforça o agravamento do estresse oxidativo vascular. Em contrapartida, o aumento da atividade da SOD observado no grupo Cd+AE sugere uma resposta antioxidante compensatória induzida pelo ácido elágico, capaz de neutralizar parte desse desequilíbrio redox. Considerando que o $O_2^{\bullet-}$ é um dos principais precursores da peroxidação lipídica, investigamos a extensão desse processo por meio da quantificação de TBARS, um marcador indireto da oxidação de lipídios de membrana. A avaliação dos níveis de TBARS permite compreender se o estresse oxidativo induzido pelo Cd evolui para dano estrutural em componentes celulares, como as membranas plasmáticas, ou se foi eficazmente atenuado pela ação antioxidante do AE.

6.5.12 Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS em anéis de aorta torácica

A análise dos níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) um marcador indireto da peroxidação lipídica, frequentemente expresso como MDA, foi realizada com o intuito de investigar o estresse oxidativo nos diferentes grupos experimentais. Conforme demonstrado na Figura 30, não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados.

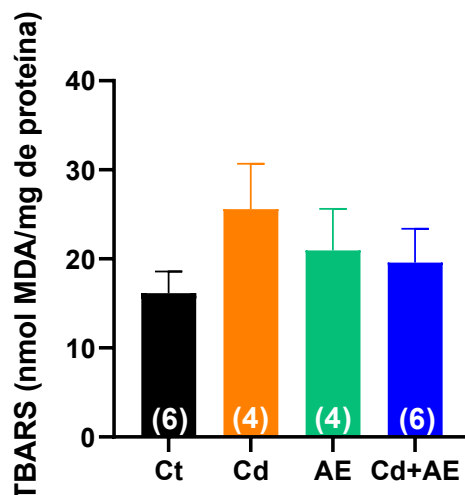


Figura 30. Análise dos níveis de TBARS. Efeitos da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico sobre os níveis de peroxidação lipídica. Os níveis de TBARS foram quantificados em anéis de aorta dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE, como indicador da peroxidação lipídica. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey.

6.5.13 Avaliação da oxidação de proteínas por AOPP em anéis de aorta torácica

Os níveis de produtos de oxidação de proteínas avançados (AOPP) foram quantificados nos diferentes grupos experimentais com o objetivo de avaliar o impacto do Cd e do AE sobre a oxidação proteica na aorta de ratos. Conforme a Figura 31, não houve diferença estatística nos níveis de produtos de oxidação de proteínas entre os grupos experimentais.

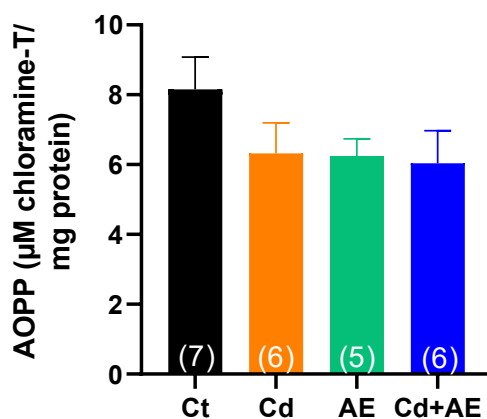


Figura 31. Análise dos níveis de AOPP. Efeitos da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico sobre os níveis de produtos finais de oxidação de proteínas (AOPP) na aorta. A quantificação foi realizada nos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via. $p > 0,05$.

6.6 Morfologia da superfície endotelial da aorta após exposição de 30 dias ao cádmio e/ou ácido elágico

Usamos microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a superfície das células endoteliais da aorta torácica. A análise morfológica da camada endotelial da aorta por MEV revelou alterações estruturais relevantes entre os grupos experimentais. No grupo Ct, a superfície endotelial apresentou morfologia escamosa contínua e íntegra, característica de endotélio preservado (Figura 32A, A1). Em contraste, a exposição ao Cd resultou em alterações morfológicas evidentes, como retração celular e desnudamento da superfície endotelial, indicando dano endotelial e possível ativação plaquetária (Figura 32B, B1). No grupo tratado com AE isoladamente, o aspecto escamoso regular do endotélio foi preservado, similar ao grupo controle (Figura 32C, C1). Já no grupo Cd+AE, observou-se melhora significativa da integridade endotelial, com redução das áreas desnudas e do aspecto contraído, sugerindo efeito protetor do AE sobre os danos induzidos pelo Cd (Figura 32D, D1).

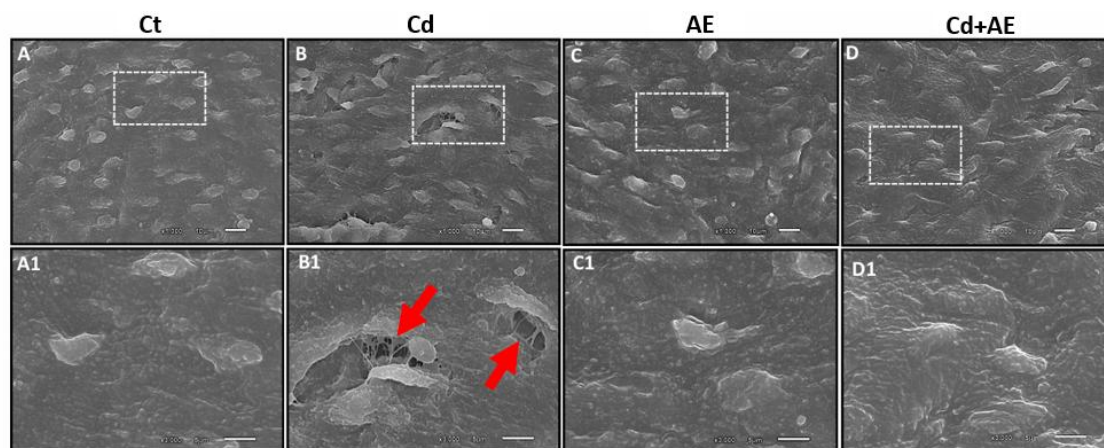


Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura mostrando fotomicrografia representativa da estrutura endotelial de aorta de ratos dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. Setas em vermelho indicam desnudamento endotelial. Barra de escala 10µm (ampliação de x1000) para imagens A, B, C e D. Barra de escala 5µm (ampliação de x3000) para imagens A1, B1, C1 e D1.

6.7 Avaliação morfométrica e histoquímica dos anéis de aorta

Considerando os resultados obtidos até o momento, não foram observados indícios de comprometimento do músculo liso vascular. Porém, em relação ao endotélio, a microscopia eletrônica de varredura evidenciou alterações morfológicas, corroborando a presença de disfunção endotelial identificada nos experimentos funcionais. Diante desse cenário, as análises histológicas e histoquímicas foram realizadas com o objetivo de aprofundar a caracterização morfofuncional da aorta. Essas abordagens permitiram investigar possíveis processos de remodelamento da matriz extracelular e alterações na integridade estrutural da parede vascular, que poderiam estar associadas às disfunções vasculares induzidas pelo cádmio e potencialmente prevenidas pelo ácido elágico.

Nos segmentos de aortas coradas com hematoxilina e eosina, nenhuma alteração morfológica foi notada, e todas as amostras apresentaram aparência histológica normal, com razão parede/lúmen e espessura da média e íntima similares entre os grupos (Figura 33). De maneira semelhante, a avaliação histoquímica não revelou diferenças significativas nas fibras de elastina entre os grupos experimentais, que se apresentaram em faixas uniformemente espessas e dispostas regularmente, com as interligações entre as lâminas elásticas visíveis (Figura 34). Entretanto, o conteúdo de colágeno avaliado pela técnica Picrosirius, evidenciou aumento significativo do depósito de colágeno no grupo Cd em relação aos demais grupos. No grupo tratado com AE, observou-se uma redução significativa do conteúdo de colágeno em relação ao grupo Cd+AE. Ademais, o tratamento com AE foi capaz de preservar o conteúdo de colágeno no grupo exposto ao Cd, mantendo-os próximos aos valores observados no grupo controle (Figura 35).

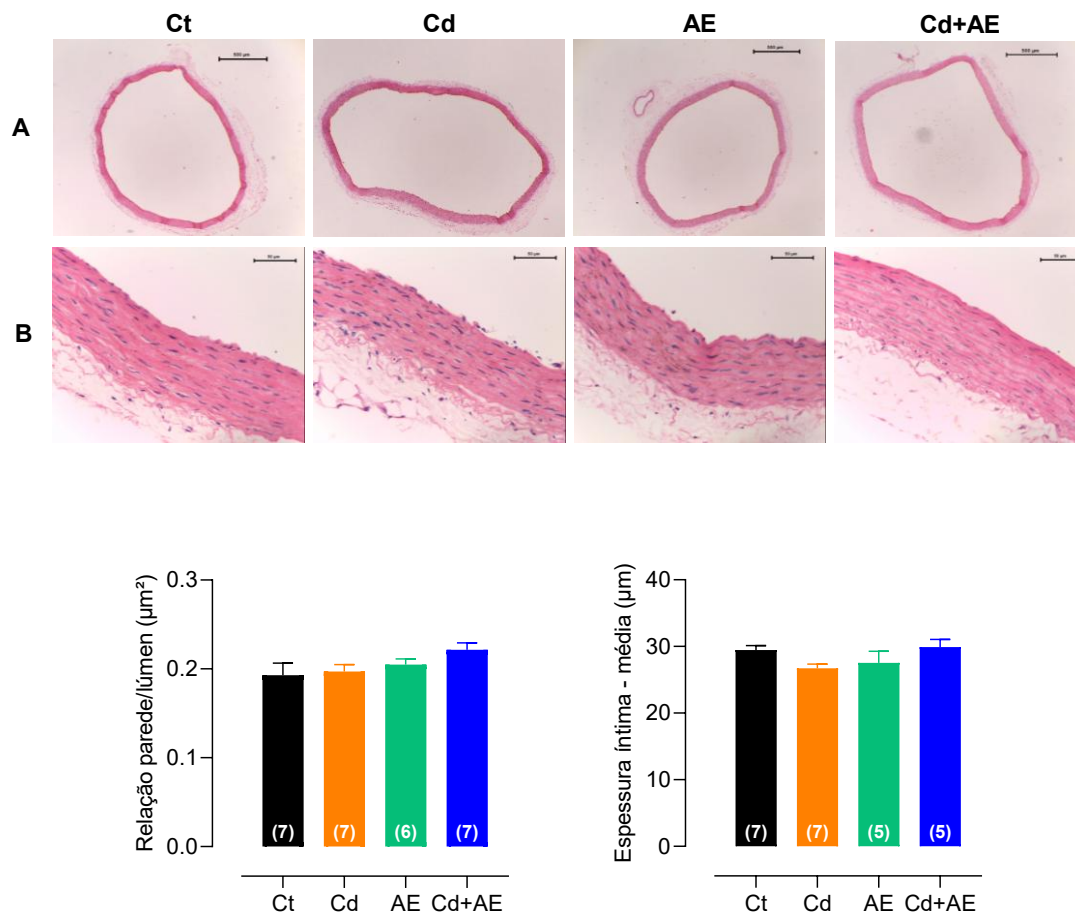


Figura 33. Efeito da exposição ao cádmio e ao ácido elágico por 30 dias na relação parede/lúmen e espessura íntima-média em segmentos da aorta torácica de ratos, coradas com hematoxilina e eosina. (A) Secção da aorta na objetiva de 4x, em escala de 500 μm e (B) na objetiva de 40x, em escala de 50 μm . As análises realizadas (C) razão parede/lúmen e (D) espessura íntima-média mensuradas nos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE. Resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. Número de animais está indicado entre parênteses.

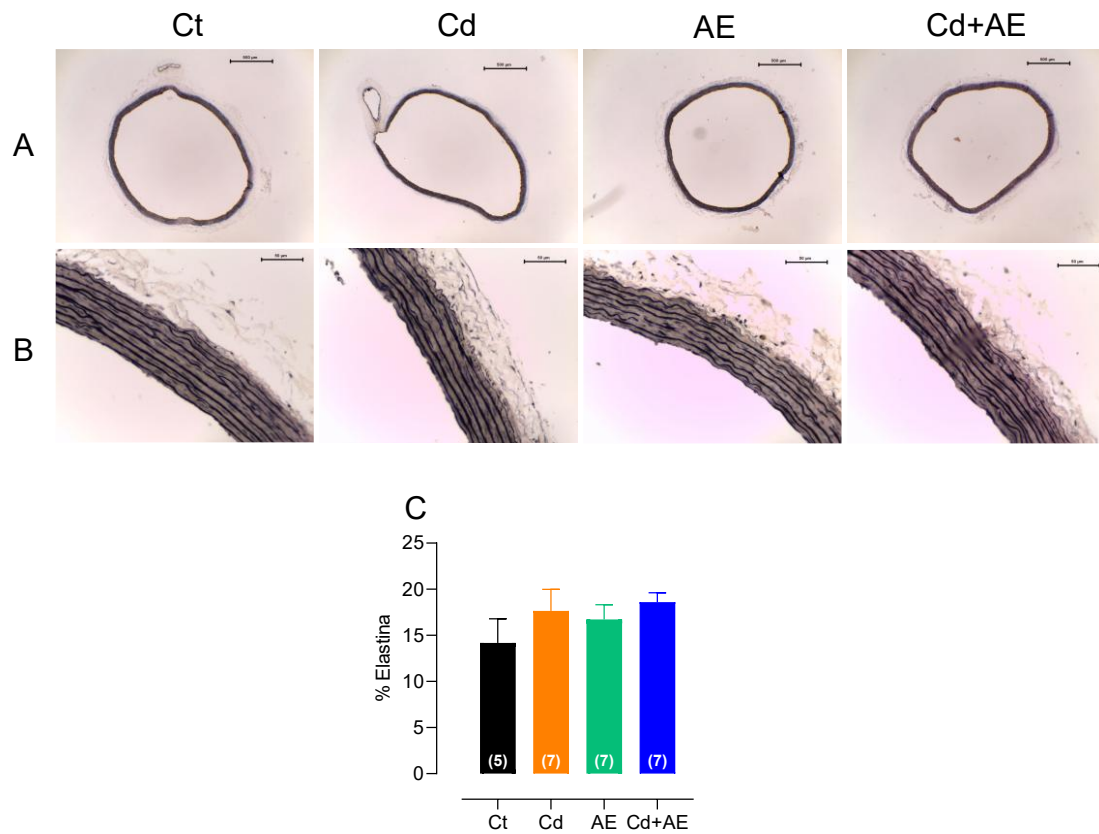


Figura 34. Efeito da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico por 30 dias sobre o conteúdo de elastina de segmentos da aorta torácica de ratos, coradas com Verhoeff Van Gieson. (A) Secção da aorta na objetiva de 4x, em escala de 500 μ m e (B) na objetiva de objetiva de 40x, em escala de 50 μ m. Resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. Número de animais está indicado entre parênteses.

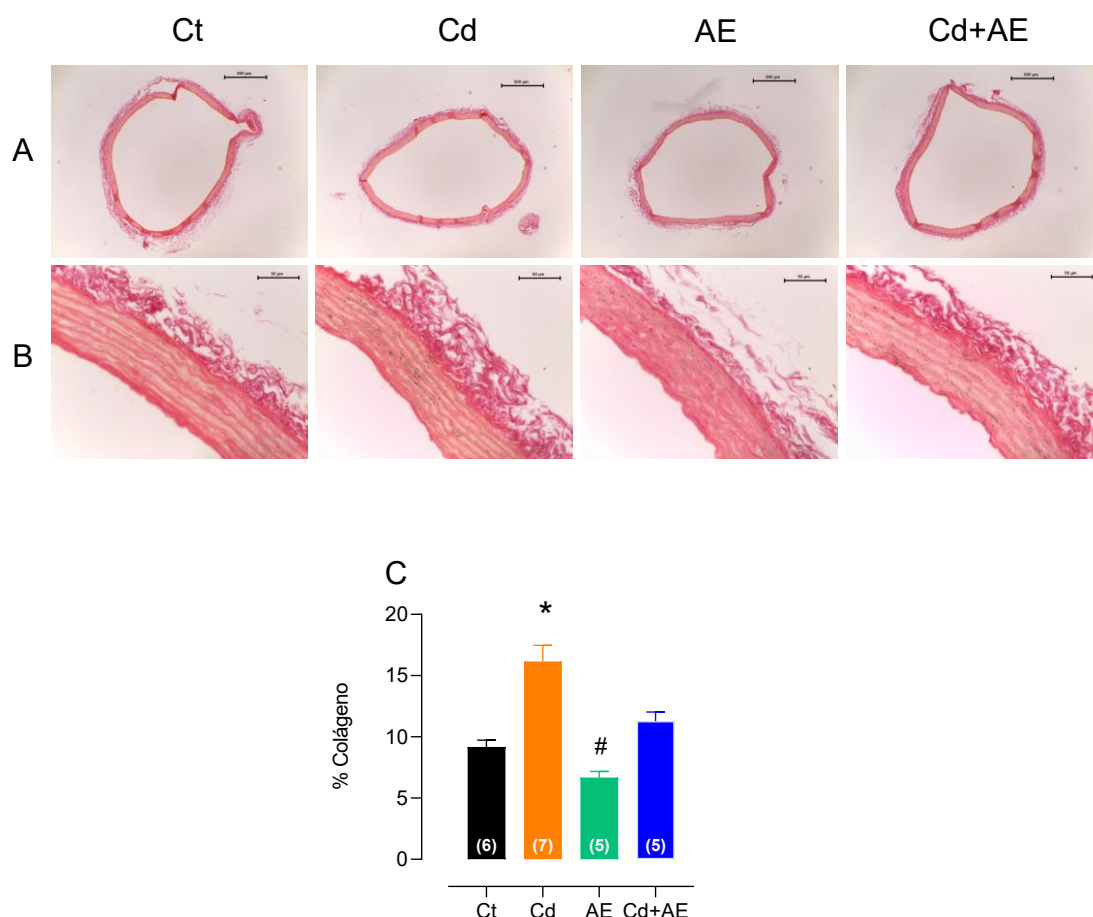


Figura 35. Efeito da exposição ao cádmio e/ou ácido elágico por 30 dias no conteúdo de colágeno nos segmentos da aorta torácica de ratos dos grupos Ct, Cd, AE e Cd+AE, coradas utilizando a técnica Picrosirius. (A) Secção da aorta na objetiva de 4x, em escala de 500 μ m e (B) na objetiva de 40x, em escala de 50 μ m. Número de animais está indicado entre parênteses. (C) Gráfico com percentuais da deposição de colágeno. Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs Ct, AE e Cd+AE; # $p < 0,05$ vs Cd+AE.

7 DISCUSSÃO

As doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade a nível global e por vezes estão associadas à exposição ambiental a metais pesados, como o Cd (NISHIJO et al., 2017; SAKURAI et al., 2021). Nesse contexto, a busca por estratégias terapêuticas capazes de atenuar os efeitos tóxicos desses metais tem ganhado relevância, especialmente aquelas baseadas em compostos naturais com propriedades antioxidantes, como o AE. Assim, investigamos os efeitos do tratamento com AE sobre a reatividade vascular em ratos expostos por 30 dias ao Cd na concentração de 100 ppm na água de beber. Demonstramos que a exposição

ao Cd resultou em aumento das concentrações sanguíneas do metal, em níveis comparáveis aos observados em humanos expostos ocupacionalmente (JURDZIAK et al., 2018; WHO, 1992; ZHOU et al., 2016). Nossos resultados mostraram que o tratamento com AE foi eficaz em atenuar ou prevenir os efeitos deletérios induzidos pela exposição ao Cd. O AE impediu o aumento da reatividade vascular à fenilefrina, preservou a modulação do endotélio vascular, melhorou o relaxamento dependente do endotélio, aumentou a biodisponibilidade de NO, atenuou a produção de EROs, manteve a pressão arterial dentro da faixa fisiológica, evitou danos na arquitetura das células endoteliais e impediu o depósito de colágeno na aorta. Esses efeitos foram acompanhados por redução da expressão da subunidade NOX4, sugerindo uma ação antioxidante direta, além disso, manteve normal a expressão do fator de transcrição mitocondrial NRF1, o que pode indicar que o AE foi capaz de prevenir o dano mitocondrial induzido pelo Cd, tornando desnecessária a ativação compensatória desse regulador de resposta antioxidante. Também observamos uma redução na expressão da MnSOD mitocondrial no grupo Cd+AE, o que sugere que não houve necessidade da indução dessa enzima como mecanismo de defesa celular.

7.1 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE CÁDMIO

A exposição humana ao Cd pode ocorrer por múltiplas vias, sendo as principais o consumo de alimentos e água contaminados, a inalação ativa e passiva da fumaça do tabaco, além da inalação ocupacional em ambientes industriais, como na metalurgia de metais não ferrosos (IPCS, 1992; CHAO, 2013). A inalação da fumaça do cigarro representa uma fonte significativa de exposição ao Cd, sendo que fumantes apresentam concentrações sanguíneas desse metal até três vezes maiores do que as observadas em não fumantes (FAROON et al., 2012). No contexto brasileiro, o interesse em investigar os efeitos do Cd intensificou-se nas últimas décadas em razão do aumento da contaminação ambiental relacionada às atividades industriais. Esse cenário se agravou após os desastres ambientais de Mariana (2015) e Brumadinho (2019), que resultaram no rompimento de barragens de rejeitos de mineração e liberação de grandes volumes de

sedimentos contaminados por metais pesados na bacia do Rio Doce (FREITAS; BARCELLOS; AL, 2019; VORMITTAG; OLIVEIRA; GLERIANO, 2018).

Nas últimas duas décadas, diversas evidências epidemiológicas e experimentais têm apontado a exposição ambiental a metais pesados como um fator de risco relevante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TELLEZ-PLAZA; GUALLAR; NAVAS-ACIEN, 2018). Dentre esses metais, o Cd está na lista dos dez produtos químicos de maior preocupação para a saúde pública, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019).

A concentração de Cd no sangue total é comumente empregada como marcador de exposições recentes, geralmente ocorridas nas últimas semanas ou meses. Por outro lado, os níveis urinários de Cd são mais indicativos de uma exposição prolongada, funcionando como um reflexo da carga corporal acumulada ao longo do tempo (VACCHI-SUZZI et al., 2016). A análise das concentrações sanguíneas de Cd ao final do protocolo experimental confirmou a absorção sistêmica do metal nos animais expostos. O grupo Cd apresentou níveis significativamente elevados no sangue ($31,15 \pm 2,8 \mu\text{g/L}$; $n = 7$), situando-se dentro da faixa média descrita na literatura para trabalhadores expostos ocupacionalmente ($2\text{--}50 \mu\text{g/L}$) (JURDZIAK et al., 2018; WHO, 1992; ZHOU et al., 2016). De forma semelhante, os animais tratados concomitantemente com Cd e AE apresentaram concentrações próximas ao grupo Cd ($29,67 \pm 2,15 \mu\text{g/L}$; $n = 4$), indicando que o AE não impediu a absorção ou a biodisponibilidade sistêmica do Cd. Em contraste, os grupos controle (Ct; $n = 8$) e tratado com AE isolado (AE; $n = 8$) apresentaram níveis de Cd inferiores ao limite de quantificação do método ($\text{LQ} = 0,24 \mu\text{g/L}$), confirmando a ausência de contaminação nos animais não expostos. Os valores observados neste estudo são consistentes com os relatados por Almenara et al. (2013), que utilizaram a mesma concentração e tempo de exposição ao Cd.

7.2 Avaliação da massa corporal dos ratos

Durante trinta dias, os ratos foram expostos ao Cd via água de beber e/ou AE por gavagem, e o ganho de peso corporal foi acompanhado. Observamos que o

ganho de peso até a terceira semana foi semelhante entre os grupos experimentais Ct, Cd e AE. No entanto, na última semana houve uma redução significativa no peso corporal nos grupos Cd e AE em comparação ao grupo Ct. De forma semelhante, outros estudos com mesma concentração e tempo de exposição empregados neste trabalho relataram redução de peso nos animais expostos ao Cd por 30 dias (ALMENARA et al., 2013b; ALMENARA et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2023). Por outro lado, estudos que utilizaram diferentes doses e protocolos de exposição apresentaram resultados variados: a administração de uma dose elevada de Cd (1 mg/kg, por via intraperitoneal) durante 14 dias também resultou em redução do peso corporal em relação ao Ct (PINHEIRO JÚNIOR et al., 2020), enquanto exposições a concentrações mais baixas de Cd (32 ppm) por dois meses (SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020; TREVIÑO et al., 2015) ou por 7 dias a 100ppm via água de beber (ROSSI et al., 2024) não promoveram alterações significativas no peso dos animais. Estudos anteriores demonstraram que a exposição ao Cd por curtos períodos, como 14 dias, pode levar à redução do peso corporal em camundongos, associada à diminuição do tecido adiposo, e esse efeito foi atribuído à inibição da adipogênese, evidenciada pela menor expressão de marcadores essenciais do processo, como os fatores de transcrição CCAAT/proteína de ligação ao intensificador (C/EBP) e receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR- γ), que são importantes marcadores adipogênicos responsáveis pela diferenciação de pré-adipócitos (ATTIA et al., 2022; KAWAKAMI et al., 2010).

No grupo AE, a redução no ganho de peso foi observada na última semana quando comparado ao grupo Ct. Neste contexto, Wang e colaboradores (2019) observaram que a suplementação com AE (30 mg/kg/dia) em ratos com dieta rica em gordura foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal. Nesse mesmo estudo, o AE promoveu redução no nível de adiposidade ao melhorar atividade metabólica do tecido adiposo e por aumentar a capacidade termogênica transformando tecido adiposo branco em marrom/bege, além disso houve melhora na dislipidemia induzida pela dieta rica em gordura (WANG et al., 2019). Segundo Sem e Simmons (2010), a suplementação com antioxidantes tem sido associada a redução da adiposidade em ratas grávidas (SEN; SIMMONS, 2010). Além disso, as urolitinas A e B, derivadas do metabolismo do AE, atuam através

da modulação de genes associados à lipogênese e oxidação de ácidos graxos reduzindo o ganho de peso corporal, a massa de tecido adiposo visceral, o acúmulo de lipídios hepáticos e o estresse oxidativo após uma dieta rica em gordura (ABDULRAHMAN et al., 2020).

Os animais expostos simultaneamente ao Cd e ao AE apresentaram redução significativa de peso em comparação aos grupos Ct, Cd e AE, perceptível já na segunda semana de tratamento. Pode-se sugerir que a acentuada redução de peso observada no grupo Cd+AE resulta da combinação dos efeitos do AE, descritos anteriormente, como a melhora da atividade metabólica do tecido adiposo, o aumento da capacidade termogênica, a modulação de genes associados à lipogênese e oxidação de ácidos graxos, juntamente com a inibição da adipogênese induzida pelo Cd.

7.3 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica (PAS)

As pressões arteriais dos animais foram registradas ao longo das semanas de exposição ao Cd e/ou AE pela técnica de pletismografia de cauda, de forma não invasiva e com o rato acordado. Os resultados demonstraram que o grupo exposto exclusivamente ao Cd apresentou aumento significativo da PAS em comparação aos grupos Ct, AE e Cd+AE. Do mesmo modo, Almenara e colaboradores observaram aumento da PAS no grupo Cd (ALMENARA et al., 2022; ALMENARA et al., 2013) com mesma dose e tempo de exposição utilizados no presente trabalho. Outros autores também relataram aumento de PAS após exposição ao Cd em diferentes dosagens, vias e tempo (OLIVEIRA et al., 2019; PINHEIRO JÚNIOR et al., 2020; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020; TUBSAKUL et al., 2021), reforçando o importante efeito do Cd sobre a pressão arterial. Adicionalmente, Caciari e colaboradores (2013) demonstraram que trabalhadores expostos ocupacionalmente ao Cd, como soldadores e operários da indústria de baterias, apresentaram risco aproximadamente 1,8 vezes maior de desenvolver hipertensão arterial em comparação a indivíduos não expostos.

O estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante, está fortemente implicado na fisiopatologia da

hipertensão (GRIENDLING et al., 2021; PINHEIRO; OLIVEIRA-PAULA, 2019). Estudos em animais experimentais mostram associação entre hipertensão, disfunção endotelial e estresse oxidativo induzidos pelo Cd (ALMENARA et al., 2013; PINHEIRO JÚNIOR et al., 2020; TUBSAKUL et al., 2021). Em particular, o $O_2^{\bullet-}$ vascular, uma ERO gerada em excesso durante a exposição ao Cd, pode reagir rapidamente com o NO, formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um oxidante muito potente, que promove degradação oxidativa do cofator BH4 (tetrahidrobiopterina) da NOS, intensificando seu desacoplamento, o que compromete a biodisponibilidade de NO, um vasodilatador essencial, e induz a produção de mais EROs (BERKBAN et al., 2015; MILSTIEN; KATUSIC, 1999). Além disso, diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a hipertensão arterial induzida pela exposição ao Cd. Um deles envolve a depleção de glutathiona, o que leva ao estresse oxidativo, contribuindo para os efeitos pró-hipertensivos do metal (VALKO; MORRIS; CRONIN, 2020). Outro mecanismo inclui os danos ao túbulo proximal renal, associados à retenção de sódio e consequente expansão do volume sanguíneo, o que favorece o aumento da pressão arterial (SATARUG; VESEY; GOBE, 2017). Além desses fatores, o aumento da concentração de Cd no sangue pode interferir diretamente na regulação vascular ao inibir a atividade da bomba de sódio (Na^+/K^+ -ATPase – NKA), estimular o sistema nervoso simpático (SNS) e aumentar a produção de EROs, promovendo disfunção endotelial (FADLOUN; LEACH, 2011). Esse quadro é agravado pelo desequilíbrio na biodisponibilidade de agentes vasoconstritores e vasodilatadores endoteliais, resultando em elevação do tônus vascular (DONPUNHA et al., 2011; KOLLURU et al., 2006).

No grupo Cd+AE, observamos que o tratamento com AE foi capaz de preservar os níveis de pressão arterial em ratos expostos ao Cd, mantendo-os semelhantes aos observados no grupo Ct. Em consonância com esses mecanismos, nossos dados sugerem que o AE atuou eficazmente como agente antioxidante nos animais expostos ao Cd, suprimindo a produção excessiva de EROs, preservando a biodisponibilidade NO e, consequentemente, contribuindo para a melhora da função endotelial. Além disso, o AE aumentou a atividade da enzima antioxidante SOD mesmo com a exposição ao Cd. Esses efeitos são sustentados por estudos anteriores que demonstraram a eficácia da

administração oral de AE na atenuação da pressão arterial elevada, atribuída à sua potente ação antioxidante (JORDÃO et al., 2017; PRIYADARSINI et al., 2002; WANG, 2014). A atividade antioxidante do AE contribui para o aumento da biodisponibilidade de NO, o que favorece a vasodilatação e o controle da hipertensão. Esse mecanismo é reforçado por dados que mostram elevação dos níveis plasmáticos de nitratos e nitritos, metabólitos do NO, após o tratamento com AE (Jordão et al., 2017). No estudo de Berkban e colaboradores (2015), a administração oral de AE em doses de 7,5 ou 15 mg/kg durante cinco semanas foi eficaz em prevenir a hipertensão induzida por L-NAME. Esse efeito foi atribuído à capacidade do AE de restaurar a expressão da enzima eNOS, aumentando a biodisponibilidade de NO, e de reduzir a expressão da subunidade p47^{phox} da enzima NADPH oxidase, envolvida na geração de ânion superóxido, uma das principais EROs associadas à disfunção vascular. Complementando esses achados, estudos populacionais conduzidos em idosos com alto risco cardiovascular observaram que a maior ingestão de alimentos ricos em polifenóis, como o AE, esteve associada a menores valores de pressão arterial. Tais efeitos foram relacionados ao aumento dos níveis de NO, promovendo vasodilatação e contribuindo para a melhora da pressão arterial (MEDINA-REMÓN A, 2011, 2015).

7.4 Efeito do cádmio e/ou ácido elágico sobre a reatividade vascular à fenilefrina

Inicialmente, avaliamos a contração induzida por KCl (75 mM) como forma de testar a integridade funcional do MLV. Os resultados mostraram que a exposição ao Cd não alterou significativamente a resposta ao KCl, sugerindo integridade funcional do MLV. Resultado diferente foi observado no estudo de Tzotzes e colaboradores (2007), em que a exposição intramuscular ao Cd (0,5 mg/kg/dia por 120 dias) aumentou a resposta ao KCl, mas não afetou a contração induzida pela fenilefrina em ratos.

Para avaliar a resposta vasoconstritora foi utilizado à fenilefrina, um agonista seletivo do receptor α_1 adrenérgico. A fenilefrina se liga ao seu receptor α_1 no

MLV, ativando a proteína Gq responsável por estimular a fosfolipase C (PLC). A PLC, por sua vez, catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ promove a liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), aumentando a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, estimulando a fosforilação da cadeia leve da miosina e favorecendo a entrada adicional de Ca²⁺ via canais de membrana, culminando na contração do MLV (HOROWITZ et al., 2018).

Neste estudo, todos os grupos experimentais apresentaram resposta contrátil à fenilefrina, no entanto, o grupo exposto ao Cd mostrou um aumento significativo na vasoconstrição em comparação aos demais. Esse achado está de acordo com a literatura, que demonstra que tanto a exposição aguda (10 µM) quanto a subcrônica (100 ppm) ao Cd aumentam a resposta contrátil à fenilefrina em aortas de ratos (ALMENARA et al., 2013; ALMENARA et al., 2022; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019). De forma semelhante, Rossi et al. (2024) também observaram aumento da contração após exposição por 7 dias ao Cd (100 ppm). Por outro lado, segundo estudo de Mulher et al. (2023), a exposição in vitro a 5 µM de Cd, concentração inferior àquela detectada na camada média da aorta de fumantes (ABU-HAYYEH et al., 2001), não alterou significativamente a resposta à fenilefrina em aortas de ratas.

É importante destacar que o co-tratamento com AE impediu o aumento da reatividade vascular à fenilefrina causado pela exposição ao Cd, sugerindo um efeito vasoprotetor desse composto. Diante disso, investigamos as vias vasoativas que promovem o aumento da contração induzida pelo Cd e os possíveis efeitos do AE nesse contexto.

7.4.1 Participação da modulação endotelial vascular na resposta contrátil à fenilefrina em segmentos isolados da aorta torácica de ratos expostos ao cádmio e/ou ácido elágico

A modulação da contratilidade vascular pelo endotélio é um componente fundamental na regulação do tônus arterial, sendo mediada principalmente pela liberação de fatores vasodilatadores como o NO, prostaciclina e a

hiperpolarização derivada do endotélio (HDE). Assim, a fim de determinar a participação do endotélio vascular diante das alterações promovidas pelo Cd e/ou AE, este foi removido mecanicamente. A remoção mecânica do endotélio promoveu aumento da resposta contrátil à fenilefrina em todos os grupos experimentais, reforçando seu papel modulatório sobre a contração do MLV. No entanto, a magnitude da dAAC foi significativamente menor nos animais expostos ao Cd, sugerindo que existe uma disfunção endotelial provocada por esse metal, que contribui para o aumento da resposta contrátil.

Esse achado está em conformidade com estudos prévios que demonstram que a exposição ao Cd compromete a integridade e a função do endotélio, reduzindo a liberação de NO e potencializando a resposta vasoconstritora à fenilefrina (ALMENARA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019; ROSSI et al., 2024). A redução da modulação endotelial observada no grupo Cd sugere que a exposição ao metal interfere negativamente na capacidade do endotélio em exercer seu papel modulador, possivelmente por redução da biodisponibilidade de NO, indução de estresse oxidativo e/ou dano direto às células endoteliais.

Por outro lado, o grupo tratado concomitantemente com AE e Cd apresentou valores de dAAC% semelhantes ao grupo Ct, indicando que esse polifenol preservou a função endotelial mesmo diante da exposição ao metal tóxico. Esse efeito protetor pode estar relacionado à conhecida atividade antioxidante do AE, que atua neutralizando EROs, preservando a biodisponibilidade de NO e prevenindo o desacoplamento da eNOS (BERKBAN et al., 2015b; DING et al., 2014a). Diante dos achados observados nas análises de modulação endotelial, prosseguimos com a avaliação da integridade da função endotelial através da resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzida pelo agonista muscarínico ACh.

7.4.2 Efeito do tratamento com ácido elágico na exposição ao cádmio por trinta dias sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio

A ACh promove relaxamento vascular por meio de um mecanismo dependente do endotélio, sendo amplamente utilizada como ferramenta farmacológica para

avaliação da função endotelial. Sua ação ocorre predominantemente pela ativação de receptores muscarínicos do tipo M2 presentes nas células endoteliais, o que leva ao aumento da concentração de cálcio intracelular e consequente ativação da enzima eNOS. Essa enzima catalisa a conversão de L-arginina em NO, um potente vasodilatador. O NO se difunde para as células do MLV, ativa a guanilil ciclase solúvel (GCs), promovendo o aumento dos níveis intracelulares de GMPc. O GMPc ativa proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, promovendo relaxamento do vaso por hiperpolarização do músculo liso vascular (Rattmman, 2009).

Nossos resultados demonstraram que a exposição ao Cd comprometeu significativamente a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, evidenciada pela redução do relaxamento induzido pela ACh no grupo Cd, em comparação aos grupos Ct, AE e Cd+AE, que apresentaram respostas semelhantes entre si. Essa diminuição da vasodilatação endotelial sugere que a exposição a esse metal pesado promoveu disfunção endotelial, possivelmente relacionada à redução na síntese ou na biodisponibilidade de NO, ou ainda a alterações morfofuncionais das células endoteliais. Tais achados estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram o mesmo protocolo de exposição ao Cd que este trabalho, demonstrando uma redução significativa no relaxamento induzido por ACh em camundongos (OLIVEIRA et al., 2019) e em ratos Wistar (ALMENARA et al., 2013). Por outro lado, alguns estudos que utilizaram modelos de exposição aguda in vitro não identificaram alterações na resposta vasodilatadora à ACh. Angeli et al. (2013), por exemplo, não observaram comprometimento do relaxamento dependente do endotélio em aortas de ratos incubadas com 10 μ M de Cd durante 45 minutos. De forma semelhante, Mulher et al. (2023) relataram que a exposição in vitro de aortas de ratas a 5 μ M de Cd também não resultou em mudanças significativas na resposta ao relaxamento induzido por ACh. Esses dados sugerem que a duração e a via de exposição ao metal são determinantes para a instalação da disfunção endotelial, sendo os efeitos mais evidentes em modelos de exposição subcrônica, como o utilizado no presente estudo.

Por outro lado, o co-tratamento com AE foi capaz de preservar a vasodilatação dependente do endotélio no grupo Cd+AE, promovendo relaxamento vascular semelhante ao observado nos grupos Ct e AE isolado, o que indica um efeito protetor do AE sobre a função endotelial frente à toxicidade induzida pelo Cd. Segundo Bragança e colaboradores (2022) o tratamento por quatro semanas com AE foi capaz de normalizar a vasodilatação dependente do endotélio em artérias mesentéricas de ratas SHR ovariectomizadas. Ding e colaboradores (2014) investigaram os efeitos do AE em dois modelos murinos de aterosclerose (camundongos selvagens, WT e ApoE^{-/-}) e observaram melhora significativa no relaxamento vascular dependente do endotélio após o tratamento com AE. Essa melhora foi acompanhada por um aumento na atividade da NOS e nos níveis de nitrito urinário, indicando que os efeitos vasoprotetores do AE são, ao menos em parte, mediados pelo aumento da biodisponibilidade de NO.

Para avaliar se a alteração observada era específica da via endotelial de produção de NO ou se também envolvia o MLV, realizamos curvas de concentração-resposta ao NPS, um doador direto de NO, cuja ação é independente do endotélio. A resposta vasodilatadora ao NPS foi preservada em todos os grupos experimentais, sem diferenças significativas. Esse resultado sugere que o MLV manteve sua sensibilidade ao NO, mesmo após a exposição ao Cd e/ou ao AE, indicando que a disfunção observada com a ACh está restrita ao comprometimento endotelial.

Esses dados são reforçados por achados anteriores, nos quais tanto a exposição aguda quanto subcrônica ao Cd não alteraram a resposta ao NPS, como demonstrado por Almenara et al. (2013), Angeli et al. (2013) e Rossi et al. (2022). Em conjunto, os resultados demonstram que a exposição ao Cd compromete a função endotelial, sem causar alterações diretas na resposta do MLV. Por outro lado, o tratamento com AE mostrou-se eficaz em preservar a integridade funcional do endotélio, atuando como um agente protetor frente aos efeitos deletérios da exposição ao Cd.

7.5 PARTICIPAÇÃO DAS VIAS VASOATIVAS NA RESPOSTA VASCULAR À FENILEFRINA APÓS EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO E/OU ÁCIDO ELÁGICO

7.5.1 Participação da via do óxido nítrico na resposta vascular à fenilefrina e detecção in situ do NO em segmentos de aorta

O NO é amplamente reconhecido como um dos principais vasodilatadores derivados do endotélio, sendo fundamental na regulação do tônus vascular e na manutenção da homeostase cardiovascular. Além de promover o relaxamento do MLV, o NO também possui efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e antitrombóticos. No entanto, sua biodisponibilidade pode ser significativamente comprometida em diversas condições patológicas, especialmente naquelas associadas ao aumento do estresse oxidativo (INCALZA et al., 2018; JANASZAK-JASIECKA et al., 2023; TOUSOULIS et al., 2012). Nessas situações, instala-se um quadro de disfunção endotelial, caracterizado por uma redução na disponibilidade de NO, decorrente tanto da diminuição de sua síntese pela eNOS quanto de sua rápida degradação pelo ânion superóxido (INCALZA et al., 2018).

Diversos fatores de risco cardiovasculares, incluindo a exposição a metais pesados como o Cd, estão diretamente relacionados ao aumento do estresse oxidativo vascular e ao comprometimento da atividade da eNOS (JANASZAK-JASIECKA et al., 2023; YOOPAN et al., 2008; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014). Nessa condição, observa-se o chamado “desacoplamento da eNOS”, fenômeno no qual a enzima, em vez de sintetizar NO, passa a produzir $O_2^{\bullet-}$ (FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006; KARBACH et al., 2014). Esse processo agrava o desequilíbrio redox e reduz ainda mais a disponibilidade de NO, culminando em disfunção endotelial, um evento-chave na progressão de doenças cardiovasculares (INCALZA et al., 2018; JANASZAK-JASIECKA et al., 2023).

Neste contexto, avaliamos a participação do NO na modulação da reatividade à fenilefrina por meio da incubação dos segmentos de aorta com L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS. Observou-se que a inibição da NOS aumentou significativamente a resposta contrátil à fenilefrina em todos os grupos experimentais, evidenciando o papel modulador do NO na contração vascular. Entretanto, o grupo exposto ao Cd apresentou uma magnitude de resposta

reduzida (avaliada pela variação da área sob a curva – dAAC), indicando que a contribuição do NO endotelial foi comprometida. Esse achado foi corroborado pela análise de fluorescência com DAF-2DA, demonstrando que a exposição ao Cd foi capaz de reduzir a produção basal de NO.

Esses resultados reforçam que a exposição ao Cd diminui a biodisponibilidade de NO, favorecendo a disfunção endotelial e contribuindo para o aumento da reatividade vascular observado neste grupo. Resultados similares foram descritos por Almenara et al. (2013), Almenara et al. (2020), Oliveira et al. (2019) e Angeli et al. (2013), que demonstraram que o Cd compromete a função endotelial por reduzir a biodisponibilidade de NO, tanto de maneira aguda como subcrônica. Majumder et al. (2008), por exemplo, demonstraram que concentrações tão baixas quanto 100 nmol/L de Cd foram suficientes para inibir a produção de NO e a migração de células endoteliais em cultura. Além disso, o comprometimento da via do NO tem sido associado com doenças cardiovasculares (FORTE et al., 2016), que podem ser rapidamente instaladas como resultado de uma deficiência crônica de eNOS/ disfunção endotelial, que também é um possível mecanismo de ligação entre hipertensão e aterosclerose (KUHLENCORDT et al., 2001).

Por outro lado, o grupo Cd+AE apresentou valores de dAAC semelhantes ao grupo Ct, indicando que o tratamento com AE foi eficaz em preservar a biodisponibilidade de NO mesmo na presença do metal. Esse achado foi confirmado pela análise de fluorescência com DAF-2DA. Essa ação do AE é respaldada por estudos prévios, como o de Bragança et al. (2022), que observaram aumento na atividade da eNOS e nos níveis de NO em ratas SHR ovariectomizadas tratadas com AE. Berkban et al. (2015) relataram que o AE foi capaz de prevenir a hipertensão induzida por L-NAME, aumentando a expressão de eNOS e reduzindo o estresse oxidativo, possivelmente por inibição da subunidade p47phox da NADPH oxidase. Além disso, os elagitaninos, metabólitos do AE, melhoram a função vascular por aumentarem a expressão de eNOS em células endoteliais humanas (DE NIGRIS, F., 2005; DE NIGRIS, 2007).

7.5.2 Envolvimento das EROs na resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos

As EROs são moléculas instáveis derivadas do oxigênio que, em concentrações fisiológicas, atuam como segundos mensageiros e modulam as respostas de sinalização fisiológica em múltiplos tecidos participando de processos essenciais como sinalização celular, regulação da proliferação e apoptose, expressão gênica e defesa imunológica contra patógenos (POLJSAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013; SYLVESTER et al., 2022). No entanto, quando produzidas em excesso, as EROs exercem efeitos deletérios e estão envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças crônicas, como obesidade, câncer, distúrbios neurodegenerativos e, especialmente, doenças cardiovasculares (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; PISOSCHI; POP, 2015; SANTAMARIA-JUAREZ et al., 2020). A produção de EROs é equilibrada por sistemas antioxidantes que sequestram EROs, que podem se tornar disfuncionais na doença, contribuindo para o estresse oxidativo (BATTY; BENNETT; YU, 2022). No sistema cardiovascular, o acúmulo excessivo de EROs afeta diretamente o equilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores, além de promover a degradação do NO, reduzindo sua biodisponibilidade (DOHI et al., 1996; DOWELL, 1999). O estresse oxidativo vascular é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade do sistema antioxidante endógeno de neutralizá-las (BOUCHMAA et al., 2018; XU et al., 2020). Durante o estresse oxidativo, as EROs são produzidas como subprodutos do metabolismo do oxigênio e seus principais representantes são o $O_2^{\bullet-}$, o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MRID; BOUCHMAA; OUEDRHIRI, 2022).

Trabalhos anteriores já demonstraram que a exposição ao Cd induz estresse oxidativo na aorta de animais experimentais em diferentes concentrações e tempos de exposição (ALMENARA et al., 2013; ANGELI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019; ROSSI et al., 2022; MULHER et al., 2023; ALMENARA et al., 2023). Assim, investigamos as vias vasoativas que contribuem para o aumento do estresse oxidativo na reatividade vascular.

7.5.2.1 Participação do ânion superóxido na resposta contrátil à fenilefrina, expressão e atividade da superóxido dismutase

O $O_2^{\bullet-}$ é considerado uma das principais EROs envolvida no estresse oxidativo e disfunção vascular, sendo um mediador chave na redução da biodisponibilidade de NO e na promoção de respostas vasoconstritoras exacerbadas (BRIONES; TOUYZ, 2010; DRUMMOND et al., 2011). Nesse sentido, investigamos a contribuição do $O_2^{\bullet-}$ nas alterações observadas na reatividade vascular, assim incubamos os anéis de aorta com a SOD, enzima antioxidante essencial que dismuta ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Observamos que a presença da SOD reduziu significativamente a resposta contrátil à fenilefrina no grupo exposto ao Cd, sem provocar alterações nos demais grupos. Esses achados indicam que a exposição ao Cd induz um aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$, o que contribui para a intensificação da resposta vascular à fenilefrina. Resultados semelhantes foram reportados por Pinheiro Júnior e colaboradores (2020), que evidenciaram aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ em aortas de ratos expostos a uma dose elevada de Cd (1 mg/kg, intraperitoneal) por 14 dias. Almenara e colaboradores (2013), utilizando Cd na mesma concentração e tempo de exposição empregados no presente estudo, demonstraram que o aumento da reatividade vascular à fenilefrina foi mediado, em grande parte, pela elevação dos níveis de superóxido.

Por outro lado, a coadministração de AE foi capaz de inibir a produção de superóxido induzida pelo Cd. Yang et al. (2008) demonstraram que o AE, na concentração de 30 μ M, atenuou a geração de EROs em células expostas ao Cd, possivelmente por sua atividade quelante e propriedades antioxidantes, embora os mecanismos moleculares específicos ainda não estejam completamente elucidados. Complementarmente, Evtyugin et al. (2020) destacaram que o AE e seus metabólitos exercem potentes efeitos antioxidantes e atuam como fitoquelantes naturais, restaurando o equilíbrio redox celular e reduzindo os efeitos tóxicos induzidos por metais pesados. Assim, nossos achados reforçam o potencial do AE como agente protetor contra o estresse oxidativo e a toxicidade vascular induzida pelo Cd.

7.5.2.2 Expressão proteica e atividade da Superóxido dismutase

Como observamos um aumento de ânion superóxido no grupo exposto ao Cd e uma ação protetora do AE, que impediu esse aumento, avaliamos se havia alguma alteração na expressão do sistema antioxidante enzimático através da análise da expressão da enzima superóxido dismutase. A análise da expressão proteica da isoforma citoplasmática da superóxido dismutase, Cu/Zn-SOD (SOD1), não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Esse achado é consistente com os resultados de Almenara e colaboradores (2013), que, utilizando a mesma concentração e tempo de exposição ao Cd adotados no presente estudo, também não observaram alteração na expressão da SOD1 entre o grupo Ct e o grupo exposto ao metal. Entretanto, a exposição ao Cd induziu aumento na expressão da isoforma Mn-SOD (SOD2), o que pode ser interpretado como uma resposta adaptativa para lidar com o estresse oxidativo mitocondrial, uma vez que a Mn-SOD atua na mitocôndria neutralizando o ânion superóxido gerado em excesso (MAJUMDER et al., 2008). De fato, a mitocôndria é um dos principais alvos intracelulares do Cd, que a torna disfuncional produzindo mais EROs (GENCHI et al., 2020).

Interessantemente, no grupo co-tratado com Cd e AE, observou-se uma redução significativa na expressão da isoforma mitocondrial Mn-SOD (SOD2) em relação aos grupos Ct e Cd. Uma possível explicação para essa redução é que o AE, devido à sua potente atividade antioxidante direta, consiga neutralizar as EROs de forma eficaz, reduzindo a necessidade de ativação dos mecanismos enzimáticos endógenos de defesa oxidativa. Uma possível explicação para essa redução é que o AE, por ter uma potente atividade antioxidante direta, consiga neutralizar as EROs de forma eficiente, reduzindo a necessidade de ativação de mecanismos enzimáticos endógenos de defesa antioxidante. Essa ação pode estar relacionada à presença de quatro grupos hidroxila em sua estrutura, que atuam como doadores de elétrons, estabilizando múltiplos radicais livres de forma simultânea (CHEN; CHEN; ZHOU, 2018; EVTYUGIN; MAGINA; EVTUGUIN, 2020).

Além disso, avaliamos a atividade da SOD e não observamos diferenças significativas entre os grupos Ct, Cd e AE. Embora estudo anterior, como o de Khan e colaboradores (2022), tenha relatado que o Cd pode reduzir a atividade de enzimas do sistema antioxidante, em nosso modelo não foi evidenciada redução na atividade da SOD em relação ao grupo Ct em resposta à exposição ao metal. Interessantemente, os resultados demonstraram que o tratamento com AE foi capaz de aumentar a atividade da SOD, mesmo sob condições de estresse oxidativo induzido pela exposição ao Cd. Esse achado é corroborado por diversos estudos prévios que indicam o potencial do AE em modular positivamente o sistema antioxidante endógeno, promovendo o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a própria SOD, catalase e glutathione peroxidase (ALTAMIMI et al., 2022; CHEN; CHEN; ZHOU, 2018; ITSARA et al., 2014; MISHRA; VINAYAK, 2014; XU et al., 2021). Com base nesse achado, podemos sugerir que, diante do estresse oxidativo induzido pelo Cd, o AE aumentou a atividade da SOD como um mecanismo de defesa antioxidante, ajudando a restaurar o equilíbrio redox. Além disso, é possível que esses efeitos benéficos estejam relacionados à capacidade do AE de ativar a via de sinalização do fator de transcrição Nrf2, promovendo a expressão da heme oxigenase-1 (HO-1), que é responsável por estimular mecanismos endógenos de defesa antioxidante (DING et al., 2014a; XU et al., 2021).

7.5.2.3 Participação de peróxido de hidrogênio na reatividade vascular à fenilefrina de segmentos aórticos após exposição ao cádmio e/ou ácido elágico

Como foi observado um aumento de superóxido no grupo Cd após a incubação com SOD, e sabendo que a SOD é um antioxidante fisiológico que converte ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, avaliamos a participação do peróxido de hidrogênio. A incubação com catalase, enzima que degrada o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, não promoveu alterações na resposta contrátil à fenilefrina em nenhum dos grupos experimentais. Esse achado é corroborado por estudo in vitro realizado por Mulher et al. (2022), no qual a incubação in vitro com Cd (5 μM) também não evidenciou envolvimento do H_2O_2 na resposta vascular. Esses resultados sugerem que o H_2O_2 não exerce um papel relevante na modulação das respostas contráteis à fenilefrina, ou que

sua concentração funcional na preparação vascular é insuficiente para modular a contratilidade.

Ao contrário dos resultados observados, Almenara et al. (2013) e Oliveira et al. (2023), utilizando protocolo de exposição ao Cd semelhante ao adotado no presente estudo (100 ppm, 30 dias), observaram uma contribuição significativa do H_2O_2 na resposta contrátil em anéis aórticos de ratos. Outros estudos que também divergem do nosso achado, demonstraram que o Cd pode inibir a atividade da catalase e de outras enzimas antioxidantes, promovendo o acúmulo de H_2O_2 e contribuindo para o aumento da reatividade vascular (CASALINO et al., 2002).

7.5.2.4 Influência da NADPH oxidase sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

As principais fontes de EROs vascular envolvem a xantina oxidase, NADPH oxidase, a eNOS em sua forma desacoplada, cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, além da liberação de EROs induzida por EROs, onde ocorre aumento de superóxido que é convertido em peróxido de hidrogênio, que pode promover a geração adicional de superóxido, estabelecendo um ciclo autoalimentado (MRID; BOUCHMAA; OUEDRHIRI, 2022; WESELER; BAST, 2010; ZINKEVICH; GUTTERMAN, 2011).

Como a NADPH oxidase é a enzima pró-oxidante mais importante no sistema cardiovascular (DRUMMOND et al., 2011), produzindo EROs na vasculatura, investigamos sua participação na resposta vascular à fenilefrina. Para isso, utilizamos a Apocinina (30 μ M), um inibidor não seletivo da NADPH oxidase, que foi capaz de reduzir a resposta contrátil no grupo Cd, sem alterá-la nos demais grupos, sugerindo participação direta de EROs oriundas da NADPH oxidase induzida pelo Cd. Esse achado é corroborado por estudos anteriores que, utilizando o mesmo protocolo de exposição ao cádmio (100 ppm por 30 dias), identificaram a participação da enzima NADPH oxidase como uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio na aorta isolada de ratos (Almenara et al., 2013; Oliveira et al., 2023). Em contraste, dados divergentes foram observados por Rossi e colaboradores (2024) que, apesar de utilizarem a mesma concentração de Cd

(100 ppm), submeteram os animais a um período de exposição mais curto (7 dias), no qual não foram detectadas alterações na reatividade vascular da aorta que indicassem participação significativa da NADPH oxidase na produção de EROs. Esses resultados sugerem que o tempo de exposição ao Cd pode ser um fator determinante para a ativação dessa via pró-oxidante.

A produção excessiva de EROs representa um importante fator de risco cardiovascular, uma vez que pode desencadear um ciclo de retroalimentação conhecido como "liberação de EROs induzida por EROs", esse fenômeno amplifica o estresse oxidativo, contribuindo diretamente para a progressão de lesões vasculares e outras complicações associadas (MRID; BOUCHMAA; OUEDRHIRI, 2022; ZINKEVICH; GUTTERMAN, 2011). O Cd induz aumento de EROs, especialmente via ativação da NADPH oxidase, promovendo estresse oxidativo em tecidos vasculares (ALMENARA et al., 2013; ALMENARA et al., 2020; PINHEIRO JÚNIOR et al., 2020), este estresse oxidativo contribui para processos patológicos como aumento da contratilidade vascular, remodelamento da parede arterial, inflamação, fibrose (RODRIGUEZ-PORCEL; CHADE; MILLER, 2017), prejuízo na função endotelial como resultado da perda da biodisponibilidade do NO (ALMENARA et al., 2013), além de promover a progressão da aterosclerose (DRUMMOND et al., 2011) e desenvolvimento de hipertensão arterial (BRANDES; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, 2010; DRUMMOND et al., 2011; TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011).

Entretanto, a administração concomitante de AE foi capaz de manter a resposta vascular semelhante ao grupo Ct mesmo com a exposição ao Cd, evitando a produção de EROs via NADPH oxidase, corroborando com a propriedade neutralizante de EROs atribuídas ao AE. Assim, é proposto que a presença de grupos funcionais hidroxila e lactona permite que o AE remova uma ampla variedade de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (SALEM et al., 2016). De fato, compostos fenólicos como o AE e os ETs têm sido amplamente descritos por sua eficácia em proteger moléculas biológicas contra o dano oxidativo (EVTYUGIN; MAGINA; EVTUGUIN, 2020; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

7.5.2.5 Expressão proteica da subunidade da NADPH oxidase

Com a confirmação da participação da NADPH oxidase na reatividade vascular através da incubação com apocinina, podemos sugerir maior produção de EROs e contribuição diretamente para o comprometimento da função edotelial induzida pelo Cd. Para confirmar a contribuição dessa via oxidativa, a expressão da subunidade NOX4 foi avaliada por ser uma das isoformas mais relevantes da família NADPH oxidase na vasculatura. Essa análise permitiu investigar se o Cd e o tratamento com AE influenciaram diretamente a regulação da NOX4.

A análise revelou aumento significativo da expressão de NOX4 no grupo Cd em relação aos demais grupos experimentais. A família de enzimas NADPH oxidase é composta por diversas isoformas, entre as quais NOX1, NOX2 e NOX4 se destacam por serem predominantemente expressas nas células endoteliais vasculares. Essas isoformas têm sido amplamente associadas ao desenvolvimento e à progressão de distúrbios vasculares (AGO et al., 2004; HWANG et al., 2003; WIND et al., 2010). Especificamente, o aumento da expressão de NOX4 tem sido documentado em lesões ateroscleróticas humanas, evidenciando seu envolvimento em processos patológicos mediados por estresse oxidativo (SORESCU et al., 2002), o que seria uma sugestão para o aumento da expressão de NOX4 encontrada no grupo Cd.

No grupo Cd+AE, foi possível observar que o AE suprimiu a expressão da isoforma NOX4, o que contribuiu para a redução do estresse oxidativo vascular. Conforme relatado por Rozentsvit e colaboradores (2017), a NOX4 foi a única isoforma da família NADPH oxidase negativamente regulada pelo tratamento com AE, indicando que essa isoforma pode ser um alvo específico da ação antioxidante do composto. Dessa forma, a expressão reduzida de NOX4 observada neste estudo pode representar um dos principais mecanismos pelos quais o AE exerce seus efeitos vasoprotetores frente à agressão oxidativa induzida pela exposição ao Cd.

7.5.2.6 Participação xantina oxidase na reatividade vascular de anéis de aorta

Além da NADPH oxidase, a xantina oxidase é uma enzima oxidativa que aumenta EROs. Essas EROs são geradas quando a hipoxantina é oxidada em xantina pela xantina oxidase, que é então convertida em ácido úrico, formando H_2O_2 e O_2^- pela transferência de elétrons para O_2 (BROWN et al., 2021). A ativação exacerbada dessa enzima está fortemente associada ao aumento do estresse oxidativo, favorecendo muitos efeitos deletérios, com destaque para sua relevante participação na fisiopatologia das doenças cardiovasculares (DOEHNER; LANDMESSER, 2011). Neste estudo, observou-se que a incubação dos anéis de aorta com alopurinol, um fármaco que inibe a enzima xantina oxidase, reduziu significativamente a resposta contrátil apenas nos animais expostos ao Cd. Esse resultado indica que o Cd ativa a xantina oxidase, o que contribui para o aumento na produção de EROs, como o H_2O_2 , intensificando o estresse oxidativo. A literatura já descreve que a xantina oxidase é uma enzima envolvida nos processos oxidativos desencadeados pela exposição ao Cd, desempenhando papel importante nesse tipo de toxicidade (ISZARD; LIU; KLAASSEN, 1995; SARKAR; YADAV; BHATNAGAR, 1998). Em contrapartida, Rossi e colaboradores (2024) não observaram participação da xantina oxidase na reatividade vascular após exposição ao Cd (100ppm) por 7 dias.

Por outro lado, no grupo co-tratado com Cd e AE, a incubação com alopurinol não promoveu alterações significativas na resposta vascular, o que indica que o AE foi eficaz em inibir a atividade da xantina oxidase. Esse efeito protetor pode ser atribuído às suas propriedades antioxidantes, incluindo a capacidade de suprimir a ação de enzimas pró-oxidantes como a própria xantina oxidase (PARUVU; BOGGALA; MEENA, 2022). Complementarmente, Chen e colaboradores (2023) observaram que o AE forma um complexo estático com a xantina oxidase por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, inibindo a atividade catalítica da enzima. Além disso, o AE atua na redução dos níveis intracelulares de EROs e na mitigação dos danos oxidativos, como evidenciado por Krajka-Kuźniak e Baer-Dubowska (2021).

Diante desse cenário, é possível sugerir que o aumento da atividade da SOD2 observado no grupo Cd+AE representa uma resposta antioxidante adaptativa estimulada pelo AE, com o objetivo de potencializar a neutralização das EROs geradas pela exposição ao Cd.

7.5.2.7 Detecção in situ de ânion superóxido em segmentos de aorta torácica

Para confirmar a participação de EROs, principalmente $O_2^{\bullet-}$, induzido pela exposição ao Cd nas respostas vasculares realizamos a fluorescência in situ com a sonda DHE. Esses resultados mostraram que houve aumento da fluorescência ao DHE em aorta de ratos expostos ao Cd, confirmando aumento de EROs na exposição ao Cd. Mulher et al., (2023) também observaram aumento de EROs por DHE no grupo Cd. Entretanto, o tratamento com AE manteve a intensidade da fluorescência nos anéis expostos ao Cd semelhante ao grupo Ct, preservando os níveis de $O_2^{\bullet-}$, confirmando a ação antioxidante do AE.

7.5.3 Avaliação da expressão proteica de NRF-1 mitocondrial nos anéis de aorta torácica

A exposição ao Cd induz danos mitocondriais que comprometem sua funcionalidade, levando à redução da produção de ATP e ao aumento na geração de EROs (GENCHI et al., 2020). Diante do aumento do estresse oxidativo, analisamos a expressão da proteína NRF-1, um fator de transcrição envolvido na indução de mecanismos antioxidantes adaptativos e na regulação coordenada de diversos genes antioxidantes e citoprotetores (LIU et al., 2024; WUFUER et al., 2021, 2022). O aumento da expressão de NRF-1 no grupo exposto ao Cd sugere que, diante do estresse oxidativo mitocondrial induzido por esse metal, a ativação desse fator de transcrição representa uma resposta celular protetora, com o objetivo de preservar a homeostase mitocondrial por meio da regulação do equilíbrio redox. Hu e colaboradores (2022) demonstraram

que o NRF-1 é indispensável na homeostase mitocondrial, exercendo um papel relevante na amplificação das defesas antioxidantes mitocondriais.

No grupo co-tratado com Cd e AE, os níveis de expressão de NRF-1 permaneceram semelhantes aos do grupo Ct. Esse achado sugere que, diante da ação antioxidante do AE, não foi necessário a ativação de vias compensatórias dependentes de fatores de transcrição como o NRF-1, responsável por regular genes envolvidos na resposta antioxidante e citoprotetora. Hu e colaboradores (2022) demonstraram que o tratamento com AE por 24 horas foi eficaz em restaurar os níveis intracelulares de ATP previamente reduzidos pela exposição ao sulfato de cádmio (CdSO_4), reforçando a proteção mitocondrial promovida por esse composto. Além disso, segundo Biswas e Chan (2010), o NRF-1 é capaz de regular a expressão de diversos genes envolvidos na resposta antioxidante frente ao estresse oxidativo. Dessa forma, a expressão basal de NRF-1 no grupo Cd+AE, pode ser atribuída à capacidade do AE de conter a produção excessiva de EROs, o que reduz a necessidade de ativação compensatória desse fator mitocondrial.

7.5.10 Determinação dos níveis de TBARS como Indicador de Estresse Oxidativo

Como nossos resultados mostraram aumento de $\text{O}_2\bullet^-$, uma das principais espécies reativas envolvidas na indução da peroxidação lipídica, investigamos a extensão desse processo por meio da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador indireto da peroxidação lipídica. Apesar da maior geração $\text{O}_2\bullet^-$ e da ativação de vias relacionadas à geração de EROs pela exposição ao Cd, os níveis de TBARS não foram diferentes entre os grupos experimentais, sugerindo que não houve dano lipídico.

Contudo, dados divergentes foram relatados na literatura, da Costa e colaboradores (2024) observaram aumento de MDA no soro de ratas Wistar expostas ao Cd em protocolo de exposição ao Cd semelhante ao do presente estudo. De forma semelhante, Pinheiro Júnior et al. (2020) relataram aumento

expressivo da peroxidação lipídica na aorta de ratos após 14 dias de exposição oral ao Cd na dose de 1 mg/kg. Prabu et al. (2010) também relataram elevação significativa dos níveis plasmáticos de MDA após administração oral de Cd (5 mg/kg/dia) por quatro semanas em ratos. Ainda, Veljkovic et al. (2012) identificaram aumento significativo nos níveis de TBARS em ratos expostos a uma dose subletal de Cd (0,54 mg, via subcutânea), a cada três dias durante sete dias, simulando um modelo de exposição ocupacional. Em humanos, Babu e colaboradores (2006) observaram aumento dos níveis plasmáticos de peroxidação lipídica em indivíduos expostos ocupacionalmente ao Cd, quando comparados ao grupo controle, reforçando a associação entre exposição ao Cd e danos oxidativos.

7.5.4 Avaliação da oxidação de proteínas por AOPP em anéis de aorta torácica

Investigamos os níveis de Produtos de Oxidação de Proteínas Avançados (AOPP), e curiosamente, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais, indicando que, na condição de exposição adotada (100 ppm, 30 dias), não houve indução de oxidação proteica detectável por esse marcador. Em contraste, um estudo em camundongos machos expostos ao Cd (100 ppm) na água potável, por oito semanas observou aumento da oxidação proteica em relação ao Ct. Tal efeito foi atribuído à depleção de GSH (glutathiona reduzida) e à redução da razão redox GSH/GSSG, uma vez que o Cd pode inativar enzimas envolvidas na síntese de GSH, promovendo alterações no estado redox celular (KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014).

No presente estudo, a análise de AOPP na aorta não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, esses resultados sugerem que a oxidação proteica não foi o principal componente do estresse oxidativo induzido pelo Cd no período analisado, ou que o tecido vascular possui mecanismos compensatórios suficientes para evitar acúmulo de AOPP.

Apesar disso, a literatura aponta que o AE possui potencial para proteger proteínas e outras macromoléculas contra danos oxidativos por meio de diferentes mecanismos. Tal proteção ocorre tanto por sua ação direta como

sequestrador de radicais livres, atribuída à sua estrutura polifenólica rica em grupos hidroxila (CHEN; CHEN; ZHOU, 2018; EVTYUGIN; MAGINA; EVTUGUIN, 2020b; SALEM et al., 2016), quanto pela sua capacidade de modular sistemas endógenos antioxidantes, especialmente a via Nrf2/HO-1 (BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2017; DING et al., 2014a; XUE et al., 2022; YAN et al., 2018).

O AE é amplamente descrito como ativador direto do fator de transcrição Nrf2, principal regulador da resposta antioxidante celular. Diante de agressões químicas ou excesso de espécies reativas, o Nrf2 é dissociado de sua proteína repressora, transloca-se para o núcleo e se liga a elementos de resposta antioxidante no DNA, promovendo a expressão de genes citoprotetores (RÍOS et al., 2018). Entre os genes ativados encontram-se heme oxigenase-1 (HO-1) e quinona oxidoredutase 1 (NQO1), enzimas essenciais para a neutralização de oxidantes e para a manutenção da homeostase redox (DING et al., 2014b; YANG et al., 2008).

A ativação da via Nrf2 pelo AE fortalece a capacidade celular de neutralizar espécies reativas, reduzindo potenciais danos a lipídios, DNA e proteínas. Assim, embora no presente estudo os níveis de AOPP não tenham se alterado, a literatura mostra que o AE pode oferecer um mecanismo adicional de defesa contra o estresse oxidativo induzido por metais como o Cd, contribuindo para limitar a progressão de danos oxidativos, mesmo quando não detectados por marcadores específicos como o AOPP (DING et al., 2014; WANG et al., 2024).

7.6 Análise da arquitetura endotelial por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Considerando que a integridade estrutural do endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular, realizamos a análise da arquitetura das células endoteliais por MEV, com o objetivo de identificar possíveis alterações morfológicas induzidas pela exposição ao Cd e o potencial efeito protetor do AE.

Nos segmentos aórticos dos grupos Ct e AE, a camada endotelial apresentou-se contínua e com morfologia escamosa regular, típica de um endotélio íntegro e funcional. Essa organização estrutural reflete um estado fisiológico preservado, no qual o endotélio exerce adequadamente sua função moduladora do tônus vascular. Em contraste, a exposição subcrônica ao Cd promoveu alterações morfológicas expressivas na superfície das células endoteliais. As imagens mostraram áreas extensas de desnudamento endotelial, presença de células com morfologia retraída. Esses achados sugerem perda da integridade endotelial, e possível ativação de processos pró-trombóticos, sugerindo um cenário de disfunção endotelial avançada e dano vascular associado à toxicidade do Cd.

Esses resultados são consistentes com os achados de Mulher e colaboradores (2022), que demonstraram que a exposição ao Cd em aortas de ratas à concentração de 5 μ M, *in vitro*, promoveu danos à arquitetura endotelial. De forma complementar, um estudo realizado em camundongos que receberam, por 12 semanas, 100 ppm de Cd na água de beber, observou a presença de um número considerável de orifícios no endotélio vascular, caracterizando o desnudamento endotelial causado pela toxicidade induzida pela exposição ao Cd (CHOU et al., 2023). Adicionalmente, estudos prévios já haviam descrito que a exposição ao Cd leva à exposição do tecido subendotelial, fator que favorece a agregação plaquetária, a formação de trombos e o aumento do risco de doenças cardiovasculares, como demonstrado por Koçak e Akçıl (2006) e Nontarach e colaboradores (2016). Hara e colaboradores (2024) acrescentaram que a toxicidade endotelial do Cd envolve também, a inibição da expressão de proteínas de junção celular, como claudina-5 e zonula occludens (ZO)-1, essenciais para a integridade das junções intercelulares. A desestabilização dessas estruturas contribui para a perda de coesão entre as células endoteliais e para o aumento da permeabilidade vascular. Outros autores, como Knoflach e colaboradores (2011) e Messner e colaboradores (2009), relataram a presença de necrose endotelial, aumento de orifícios na superfície vascular e fragmentação da camada íntima após exposição ao Cd, alterações que favorecem a deposição lipídica e a migração de células inflamatórias para o espaço subendotelial, eventos centrais no processo de aterosclerose.

Mais relevante ainda, o grupo que recebeu co-tratamento com Cd e AE apresentou melhora evidente da integridade da camada endotelial. Observou-se redução das áreas de desnudamento e menor presença de células retraídas, sugerindo que o AE foi eficaz em mitigar os danos na arquitetura endotelial induzidos pelo Cd. De acordo com Duan e colaboradores (2021), as células endoteliais vasculares em condições fisiológicas exercem papel essencial na preservação da homeostase vascular e na prevenção da aterogênese, por meio da regulação do tônus vascular, inibição da formação de trombos e modulação de processos inflamatórios (DUAN et al., 2021). No entanto, quando o endotélio é exposto a estímulos nocivos, como agentes tóxicos ambientais, como o Cd, esse equilíbrio é rompido, desencadeando um conjunto de alterações caracterizadas por disfunção endotelial. Esse quadro envolve prejuízo da vasodilatação mediada por NO, aumento do estresse oxidativo, ativação de vias inflamatórias e intensificação dos efeitos pró-trombóticos (IANTORNO et al., 2014). Adicionalmente, diversos fatores de risco cardiovascular são capazes de induzir apoptose das células endoteliais, um evento precoce que contribui significativamente para o desenvolvimento da aterosclerose (PAONE et al., 2019; SITIA et al., 2010; TRICOT et al., 2000). Assim, a disfunção endotelial é considerada uma etapa crítica que conecta os fatores de risco ao surgimento das lesões ateroscleróticas (BERGMARK et al., 1995; SITIA et al., 2010). Em contrapartida, agentes com propriedades antiateroscleróticas, como o próprio NO, desempenham papel protetor por inibir a apoptose endotelial e manter a integridade da parede vascular (GRESELE; MOMI; GUGLIELMINI, 2019).

Nesse contexto, o AE tem se destacado como um composto natural com relevante potencial vasoprotetor frente aos danos induzidos pelo Cd. Estudo *in vitro* demonstraram que esse polifenol é capaz de reduzir significativamente a apoptose de células endoteliais humanas (HUVECs) induzida por ox-LDL, por meio da modulação da via PI3K/Akt/eNOS (WANG et al., 2013). Adicionalmente, outros estudos observaram que o AE promoveu a ativação da eNOS via fosforilação de Akt, aumentando a produção de NO, além de modular positivamente a proteína antiapoptótica Bcl-2 e reduzir a expressão da caspase-3, um dos principais executores da apoptose (ASLAN et al., 2018, 2020). Tais efeitos são particularmente relevantes em cenários de exposição ao Cd,

considerando que esse metal promove estresse oxidativo, reduz a biodisponibilidade de NO e desencadeia a apoptose endotelial. Dessa forma, podemos sugerir que o AE preserva a estrutura e função do endotélio vascular provavelmente por melhorar a síntese/biodisponibilidade de NO, diminuir EROs, prevenir a apoptose de células endoteliais, evitar formação de trombos e início de processos ateroscleróticos, além de melhorar a expressão de proteínas de junção celular evitando o desnudamento endotelial, reforçando seu papel como agente terapêutico promissor frente à toxicidade vascular induzida pelo Cd.

7.7 Avaliação morfométrica e histoquímica dos anéis de aorta

Além das alterações ultraestruturais observadas no endotélio por meio da MEV, a investigação morfológica em nível histológico e histoquímico foram realizadas para complementar os achados e compreender os efeitos do Cd e/ou do AE sobre a parede vascular e na composição da matriz extracelular. A análise morfométrica das aortas não revelou alterações relevantes nem diferenças significativas na espessura da túnica média, íntima ou na razão parede/lúmen entre os grupos experimentais. Também não foram observadas alterações no conteúdo de fibras elásticas. Esses achados indicam que, nas condições avaliadas, a exposição ao Cd não promoveu remodelamento vascular estrutural detectável por essas abordagens. No entanto, divergindo desses resultados, Arbi et al. (2021) relataram alterações importantes na elastina de aortas de ratos expostos ao Cd, caracterizadas por afinamento das fibras elásticas em regiões com espessamento da parede.

Por outro lado, houve aumento significativo na deposição de colágeno no grupo exposto ao Cd. Este achado está em consonância com o estudo de Arbi et al. (2021), que também descreveram aumento da deposição de colágeno na parede aórtica após exposição ao Cd, porém com prejuízo na organização das fibras elásticas da túnica média. A literatura descreve que o acúmulo excessivo de colágeno na parede vascular contribui para aumento da rigidez arterial e redução da complacência da aorta, o que pode comprometer sua função de vaso de condução (Wang et al., 2006).

Interessantemente, o tratamento com AE atenuou significativamente a deposição de colágeno nos animais expostos ao Cd, mantendo os níveis de colágeno próximos aos observados no grupo controle. Esses dados sugerem um efeito protetor do AE, possivelmente relacionado às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Resultados semelhantes foram observados por Rani et al. (2013), que relataram que a suplementação com 2% de AE na dieta de ratos diabéticos evitou o espessamento da túnica média e a deposição de colágeno na aorta.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a exposição ao Cd, em concentrações compatíveis com aquelas observadas em indivíduos expostos ocupacionalmente, confirmou seu conhecido potencial deletério. Neste estudo, a exposição ao Cd resultou em elevação da pressão arterial sistólica, aumento da reatividade vascular à fenilefrina e prejuízo ao relaxamento dependente do endotélio. Estes efeitos funcionais foram acompanhados por uma redução na biodisponibilidade de NO e um aumento na produção de EROs, envolvendo vias pró-oxidantes como a NADPH oxidase (NOX4) e a xantina oxidase. Estruturalmente, foram observados danos importantes ao endotélio, com áreas de desnudamento e aumento na deposição de colágeno na parede da aorta. A ativação do fator de transcrição NRF1 e o aumento da expressão da SOD2 nesses animais sugerem uma resposta adaptativa mitocondrial frente ao estresse oxidativo induzido pelo metal, evidenciando a profundidade do dano celular.

Diante deste cenário, os resultados obtidos demonstram que o tratamento concomitante com AE foi eficaz em atenuar e, em alguns casos, reverter esses efeitos. A administração de AE manteve a pressão arterial em níveis fisiológicos e preservou a reatividade vascular à fenilefrina em parâmetros semelhantes ao grupo controle. Crucialmente, o AE restaurou o relaxamento dependente do endotélio, preservou a modulação endotelial e aumentou a biodisponibilidade de NO. Tal recuperação funcional foi acompanhada pela inibição da produção de EROs, manutenção da integridade da arquitetura endotelial e prevenção do depósito de colágeno na parede da aorta.

Os mecanismos por trás desses efeitos benéficos foram associados à redução da expressão da subunidade NOX4 da NADPH oxidase, sugerindo uma ação antioxidante direta do AE. Além disso, a menor expressão do fator de transcrição mitocondrial NRF1 e da isoforma mitocondrial da superóxido dismutase (MnSOD ou SOD2) no grupo Cd+AE, em comparação ao grupo Cd isolado, sugere que o AE foi capaz de prevenir o dano mitocondrial, tornando desnecessária a ativação compensatória desses mecanismos de defesa. Isso aponta para uma possível modulação de vias antioxidantes endógenas, como a ativação da via Nrf2/HO-1, que confere ao AE uma atividade antioxidante também indireta.

Diante desses achados, é possível concluir que o AE exerce uma ação vasoprotetora multifatorial, atuando tanto na neutralização direta de radicais livres quanto na modulação de vias antioxidantes endógenas. Esses efeitos contribuem para a preservação da função endotelial, da integridade vascular e da homeostase redox, o que reforça o potencial do AE como agente terapêutico ou adjuvante na prevenção de doenças cardiovasculares associadas à exposição a agentes tóxicos ambientais, como o Cd. Estratégias dietéticas e o uso de compostos fenólicos naturais, como o AE, mostram-se promissoras como alternativas seguras e eficazes para mitigar os efeitos da toxicidade por metais pesados, reduzir a disfunção endotelial e, conseqüentemente, prevenir condições como a aterosclerose e a hipertensão arterial.

9. ANEXO

Anexo I. Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **AValiação DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM VASO DE CONDUTÂNCIA E ARTÉRIA DE RESISTÊNCIA DE RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE CÁDMIO** Registrada sob o n.º 20/2020 sob a responsabilidade de **ALESSANDRA SIMÃO PAPILHA**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia 04 de dezembro de 2020.

Vigência da autorização: dezembro/2020 a novembro/2024

Finalidade: Pesquisa

Espécie(s): Rato (*Rattus norvegicus albinus*)

Linhagem(ns)/raça(s): Wistar

Peso: 250 a 300 gramas

Idade: 12 semanas

Sexo: Macho



Número de animais: 342

Origem: Biotério Central, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Maruípe, Vitória-ES

Vitória-ES, 07 de dezembro de 2020

Raquel Spinassé Dettogni

Vice-coordenadora da CEUA-UFES

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Avenida Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória/ES – CEP 29043-910 - Telefone: (27) 3335-7026 – ceua@ufes.br – www.ceua.ufes.br

10. REFERÊNCIAS

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CADMIUM. **Public Health Statement For Cadmium.**, [S. l.], 2008.

ABDULRAHMAN, O; KUERBAN, A; ALSHEHRI, Z; ABDULAAL, W; KHAN, J;; KHAN, M; Urolithins Attenuate Multiple Symptoms of Obesity in Rats Fed on a High-Fat Diet. **Diabetes Metab Syndr Obes.**, [S. l.], v. 25, n. 13, p. 3337–3348, 2020.

ABE, L; LAJOLO, F;; GENOVESE, M. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 92, n. 8, p. 1679–1687, 2012. DOI: doi: 10.1002/jsfa.5531.

ABU-HAYYEH, Shadi; SIAN, Minder; JONES, Keith G.; MANUEL, Ari; POWELL, Janet T. **Cadmium Accumulation in Aortas of Smokers.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.atvbaha.org>.

ACQUADRO, Stefano et al. Punica granatum Leaf Ethanolic Extract and Ellagic Acid as Inhibitors of Zika Virus Infection. **Planta Medica**, [S. l.], v. 86, n. 18, p. 1363–1374, 2020. DOI: 10.1055/a-1232-5705.

AFRIDI, Hi; KAZI, TG; KAZI, NG; JAMALI, MK; ARAIN, MB; BAIG, Ja; KANDHRO, Ga; WADHWA, SK; SHAH, Aq. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. **Journal of Human Hypertension**, [S. l.], v. 24, p. 34–43, 2010. DOI: 10.1038/jhh.2009.39. Disponível em: www.nature.com/jhh. Acesso em: 4 dez. 2019.

AGO, Tetsuro et al. Nox4 as the Major Catalytic Component of an Endothelial NAD(P)H Oxidase. **Circulation**, [S. l.], v. 109, n. 2, p. 227–233, 2004. DOI: 10.1161/01.CIR.0000105680.92873.70,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14718399/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

AHIRE, Vidhula; KUMAR, Amit; MISHRA, Kaushala Prasad; KULKARNI, Gauri. Ellagic Acid Enhances Apoptotic Sensitivity of Breast Cancer Cells to γ -Radiation. **Nutrition and Cancer**, [S. l.], v. 69, n. 6, p. 904–910, 2017. DOI: 10.1080/01635581.2017.1339811. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1339811>.

AL-MUGDADI, S; AL-SUDANI, B. .; MOHSIN, R. .; MJALI, A. .. Anticarcinogenic and antimicrobial activity effects of the ellagic acid extract. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 1172–1180, 2019.

ALFEI, Silvana; MARENGO, Barbara; ZUCCARI, Guendalina. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? **Antioxidants**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 1–34, 2020. DOI: 10.3390/ANTIOX9080707. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7465258/](https://pmc/articles/PMC7465258/). Acesso em: 22 jul. 2022.

ALI HUSSEIN, Mohamed; KAMALAKKANNAN, Abishek; VALINEZHAD, Kamyab; KANNAN, Jhishnuraj; PALEATI, Nikhila; SAAD, Rama; KAJDACS-BALLA, André; MUNIRATHINAM, Gnanasekar. The dynamic face of cadmium-induced Carcinogenesis: Mechanisms, emerging trends, and future directions. **Current Research in Toxicology**, [S. l.], v. 6, p. 100166, 2024. DOI: 10.1016/J.CRTOX.2024.100166. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666027X24000197?via%3Dihub>.

Acesso em: 15 jul. 2025.

ALKHATIB, Ahmad; TSANG, Catherine; TISS, Ali; BAHORUN, Theeshan; AREFANIAN, Hossein; BARAKE, Roula; KHADIR, Abdelkrim; TUOMILEHTO, Jaakko. Functional foods and lifestyle approaches for diabetes prevention and management. **Nutrients**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1–18, 2017. DOI: 10.3390/nu9121310.

ALMENARA, Camila C. P.; BROSEGHINI-FILHO, Gilson B.; VESCOVI, Marcus V. A.; ANGELI, Jhuli K.; FARIA, De O.; STEFANON, Ivanita; VASSALLO, Dalton V; PADILHA, Alessandra S. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013. a. DOI: 10.1371/journal.pone.0068418.

ALMENARA, Camila; FERNANDES, Thiago; DAVID, De Oliveira; FELÍCIO, Chaves. Cessation Restores Blood Pressure Levels and Endothelial Function Affected by Cadmium Exposure on Rats. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], n. 0123456789, 2022. DOI: 10.1007/s12011-022-03312-5.

ALSHAMMARI, Ghedeir M.; AL-QAHTANI, Wahidah H.; ALFARIS, Nora A.; ALZAHIRANI, Nadiyah S.; ALKHATEEB, Mahmoud A.; YAHYA, Mohammed Abdo. Quercetin prevents cadmium chloride-induced hepatic steatosis and fibrosis by downregulating the transcription of miR-21. **BioFactors**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 489–505, 2021. DOI: 10.1002/biof.1724.

ALTAMIMI, Jozaa Z.; ALFARIS, Nora A.; ALJABRYN, Dalal H.; ALAGAL, Reham I.; ALSHAMMARI, Ghedeir M.; ALDERA, Hussain; ALQAHTANI, Sultan; YAHYA, Mohammed Abdo. Ellagic acid improved diabetes mellitus-induced testicular damage and sperm abnormalities by activation of Nrf2. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 4300–4310, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.04.005.

ALTAMIMI, Jozaa Z.; ALSHAMMARI, Ghedeir M.; ALFARIS, Nora A.; ALAGAL, Reham I.; ALJABRYN, Dalal H.; ALBEKAIRI, Norah A.; ALKHATEEB, Mahmoud Ahmad; YAHYA, Mohammed Abdo. Ellagic acid protects against non-alcoholic fatty liver disease in streptozotocin-diabetic rats by activating AMPK. **Pharmaceutical Biology**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 25–37, 2022. DOI: 10.1080/13880209.2021.1990969.

ALTINDAG, F.; RAGBETLI, M.; OZDEK, U. et al. Combined treatment of sinapic acid and ellagic acid attenuates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food Chem. Toxicol**, [S. l.], v. 156, 2021. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112443.

ALVES, Claudiney; ANGELI, Giovanna Natalia; FAVARIN, Daniely Cornélio; LEMOS DE ANDRADE, Edinéia; LAZO CHICA, Javier Emilio; FACCIOLI, Lúcia Helena; ROBERTO DA SILVA, Paulo; DE PAULA ROGERIO, Alexandre. The effects of proresolution of ellagic acid in an experimental model of allergic airway inflammation. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1155/2013/863198.

AMARIEI, Sonia; HRETCANU, Cristina-Elena; GUTT, Gheorghe; AGACHI, Alexandra. Heavy Metals in Tobacco. **Journal of Faculty of Food Engineering**, [S. l.], v. XIII, n. 1, p. 80–86, 2014. Disponível em: www.fia.usv.ro/fiajournal.

AMOR, Antonio J.; CARMEN, G.; ORTEGA, Emilio; SALA-VILA, Aleix; IOLANDA, L. Ellagic Acid as a Tool to Limit the Diabetes Burden: Updated Evidence. **Updated Evidence. Antioxidants**, [S. l.], v. 9, n. 12, 2020. DOI: doi:10.3390/antiox9121226.

ANGELI, JK; ALMENARA, Camila; DE OLIVEIRA, Thaís; STEFANON, Ivanita; SIMÃO, Alessandra; VALENTIM, Dalton. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: The role of local angiotensin II and COX-2. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 65, p. 838–848, 2013. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.167. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.167>.

APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, [S. l.], v. 55, p. 373–399, 2015.

ASCACIO-VALDÉS, J. et al. Antifungal ellagitannin isolated from *Euphorbia antisiphilitica* Zucc. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 41–46, 2013. DOI: Ascacio-Valdés, J., Burboa, E., Aguilera-Carbo, A. F., Aparicio, M., Pérez-Schmidt, R., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2013). Antifungal ellagitannin isolated from *Euphorbia antisiphilitica* Zucc. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(1), 41–46. doi:10.1016/s2221-1691(13)60021-0.

ASLAN, Abdullah; GOK, Ozlem; ERMAN, Orhan; KULOGLU, Tuncay. Ellagic acid impedes carbontetrachloride-induced liver damage in rats through suppression of NF- κ B, Bcl-2 and regulating Nrf-2 and caspase pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 105, n. June, p. 662–669, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.06.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.020>.

ASLAN, Abdullah; HUSSEIN, Yousif Taha; GOK, Ozlem; BEYAZ, Seda; ERMAN, Orhan; BASPINAR, Serpil. Ellagic acid ameliorates lung damage in rats via modulating antioxidant activities, inhibitory effects on inflammatory mediators and apoptosis-inducing activities. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 7526–7537, 2020. DOI: 10.1007/s11356-019-07352-8.

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

ATTIA, Sarra Mohammed; VARADHARAJAN, Kavitha; SHANMUGAKONAR, Muralitharan; DAS, Sandra Concepcion; AL-NAEMI, Hamda A. Cadmium: An Emerging Role in Adipose Tissue Dysfunction. **Exposure and Health**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 171–183, 2022. DOI: 10.1007/s12403-021-00427-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12403-021-00427-3>.

ÁVILA, R.A, SILVA, M.A.S.C, PEIXOTO, J.V., KASSOUF-SILVA, I, FOGAÇA, RTH, DOS SANTOS L. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. *Toxicol In Vitro*. 2016 Oct;36:38-45. doi: 10.1016/j.tiv.2016.07.003. Epub 2016 Jul 7. PMID: 27396687.

BABU, Kalahasthi Ravi; RAJMOHAN, Hirehal Raghavendra Rao; RAJAN, Bagalur Krishna Murthy; KUMAR, Karuna. Plasma lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzymes status in workers exposed to cadmium. **Toxicology and Industrial Health**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 329–335, 2006. DOI: 10.1177/0748233706071736,. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0748233706071736?download=true>. Acesso em: 17 jul. 2025.

BALARAMAN, R., GULATI, O. D., BHATT, J. D., RATHOD, S. P., HEMAVATHI, K. G. Cadmium Induced Hypertension in Rats. **Pharmacology**, [S. l.], v. 38, p. 226–234, 1989.

BALUCHNEJADMOJARAD, Tourandokht; RABIEE, Nafiseh; ZABIHNEJAD, Sedigheh; ROGHANI, Mehrdad. Ellagic acid exerts protective effect in intrastriatal 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: Possible involvement of ER β /Nrf2/HO-1 signaling. **Brain Research**, [S. l.], p. 23–30, 2017. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.02.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2017.02.021>.

BANSAL, Nitin; YADAV, Pushplata; KUMAR, Manish. Ellagic Acid Administration Negated the Development of Streptozotocin-Induced Memory Deficit in Rats. **Drug**

Research, [S. l.], v. 67, n. 7, p. 425–431, 2017. DOI: 10.1055/s-0043-108552.

BARREGARD, Lars et al. Cadmium exposure and coronary artery atherosclerosis: A cross-sectional population-based study of swedish middle-aged adults. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 129, n. 6, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1289/EHP8523.

BATTY, Matthew; BENNETT, Martin R.; YU, Emma. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Cells**, [S. l.], v. 11, n. 23, 2022. DOI: 10.3390/cells11233843.

BEHRING. [S. l.], 2021. Disponível em: https://www.laboratoriobehring.com.br/exames_pdfs/gerarPdf.php?id=295.

BERGMARK, C.; WU, R.; DE FAIRE, U.; LEFVERT, A. K.; SWEDENBORG, J. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 441–445, 1995. DOI: 10.1161/01.ATV.15.4.441.

BERKBAN, Thewarid; BOONPROM, Pattanapong; BUNBUPHA, Sarawoot; WELBAT, Jariya Umka; KUKONGVIRIYAPAN, Upa; KUKONGVIRIYAPAN, Veerapol; PAKDEECHOTE, Poungrat; PRACHANEY, Parichat. Ellagic acid prevents L-NAME-induced hypertension via restoration of eNOS and p47phox expression in rats. **Nutrients**, [S. l.], v. 7, p. 5265–5280, 2015. a. DOI: 10.3390/nu7075222.

BERKBAN, Thewarid; BOONPROM, Pattanapong; BUNBUPHA, Sarawoot; WELBAT, Jariya Umka; KUKONGVIRIYAPAN, Upa; KUKONGVIRIYAPAN, Veerapol; PAKDEECHOTE, Poungrat; PRACHANEY, Parichat. Ellagic acid prevents L-NAME-induced hypertension via restoration of eNOS and p47phox expression in rats. **Nutrients**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 5265–5280, 2015. b. DOI: 10.3390/NU7075222,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26133972/>. Acesso em: 30 maio. 2025.

BERNARD, Alfred. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. **BioMetals**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 519–523, 2004. DOI: 10.1023/B:BIOM.0000045731.75602.b9.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, [S. l.], v. 88, n. 11, p. 1549–1559, 2006. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.10.001.

BIDANCHI, Rema Momin et al. Antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic action of ellagic acid against lead acetate induced testicular and hepato-renal oxidative damages and pathophysiological changes in male Long Evans rats. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 302, 2022. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.119048. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119048>.

BISWAS, Madhurima; CHAN, Jefferson Y. Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 244, n. 1, p. 16–20, 2010. DOI: 10.1016/j.taap.2009.07.034. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.034>.

BJORKLUND, G; OLIINYK, P.; LYSIUK, R. et Al. Arsenic intoxication: general aspects and chelating agents. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v. 94, n. 6, p. 1879–1897, 2020.

BOGGIA, R. et al. Neuroinflammation in aged brain: impact of the oral administration of ellagic acid microdispersion. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 10, p. 3631, 2020.

BOLISSETTY, Subhashini; JAIMES, Edgar. Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 6306–6344, 2013. DOI: 10.3390/ijms14036306.

BORRELL, Asunción; TORNERO, Victoria; BHATTACHARJEE, Dola; AGUILAR, Alex. Trace element accumulation and trophic relationships in aquatic organisms of the Sundarbans mangrove ecosystem (Bangladesh). **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 545–546, p. 414–423, 2016. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.046. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.046>.

BOUCHMAA, Najat; BEN MRID, Reda; BOUKHARSA, Youness; NHIRI, Mohamed; AIT MOUSE, Hassan; TAOUFIK, Jamal; ANSAR, M'hammed; ZYAD, Abdelmajid. Cytotoxicity of new pyridazin-3(2H)-one derivatives orchestrating oxidative stress in human triple-negative breast cancer (MDA-MB-468). **Archiv der Pharmazie**, [S. l.], v. 351, n. 12, 2018. DOI: 10.1002/ardp.201800128.

BRAGANÇA, Fabrício et al. Ellagic Acid prevents vascular dysfunction in small mesenteric arteries of ovariectomized hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 105, 2022. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2022.108995.

BRANCA, Jacopo Junio Valerio; MORUCCI, Gabriele; PACINI, Alessandra. Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. **Neural regeneration research**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 1879–1882, 2018. DOI: 10.4103/1673-5374.239434.

BRANDES, R. .; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 49, n. 5, p. 687–706, 2010.

BRIONES, Ana M.; TOUYZ, Rhian M. Oxidative stress and hypertension: Current concepts. **Current Hypertension Reports**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 135–142, 2010. DOI: 10.1007/s11906-010-0100-z.

BROWN, Oliver Ian; BRIDGE, Katherine Isabella; KEARNEY, Mark Thomas. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases in Glucose Homeostasis and Diabetes-Related Endothelial Cell Dysfunction. **Cells**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 2315, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10092315>.

CAHILL, P.A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.Vascular.

CASADO M., ANAWAR HM, GARCIA-SANCHEZ A., Santa Regina I. Cadmium and zinc in polluted mining soils and uptake by plants (El Losar mine, Spain). **Int. Environ. Pollut.**, [S. l.], v. 33, p. 146–159, [s.d.]. DOI: 10.1504/IJEP.2008.019389.

CASALINO, Elisabetta; CALZARETTI, Giovanna; SBLANO, Cesare; LANDRISCINA, Clemente. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. **Toxicology**, [S. l.], v. 179, n. 1–2, p. 37–50, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00245-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00245-7).

CECI, Claudia; LACAL, Pedro M.; TENTORI, Lucio; DE MARTINO, Maria Gabriella; MIANO, Roberto; GRAZIANI, Grazia. Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid. **Nutrients**, [S. l.], v. 10, n. 11, 2018. DOI: 10.3390/NU10111756. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC6266224/>. Acesso em: 14 jul. 2022.

CERDÁ, Begoña; LLORACH, Rafael; CERÓN, José J.; ESPÍN, Juan Carlos; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. **European Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 18–28, 2003. DOI: 10.1007/s00394-003-0396-4.

CHARLES, S.; OLIVEIRA, Thiago F.; FREITAS-LIMA, Leandro C.; PADILHA, Alessandra S.; KRAUSE, Maiara; TEREZA, Maria; CARNEIRO, W. D.; SALGADO, Breno S.; GRACELI, Jones B. Subacute cadmium exposure disrupts the hypothalamic-

pituitary- gonadal axis , leading to polycystic ovarian syndrome and premature ovarian failure features in female rats. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 269, p. 116154, 2021. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.116154. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116154>.

CHARLES, S.; THIAGO, Costa; FLAVIA, F. De Oliveira; SANTOS, C. F. Dos; PADILHA, Alessandra S.; KRAUSE, Maiara; TEREZA, Maria; MIRANDA-ALVES, Leandro. Subacute cadmium exposure changes different metabolic functions , leading to type 1 and 2 diabetes mellitus features in female rats. [S. l.], n. April, p. 4278–4297, 2024. DOI: 10.1002/tox.24306.

CHEN, Peng; CHEN, Fuchao; ZHOU, Benhong. Antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of ellagic acid in liver and brain of rats treated by D-galactose. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1465, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-19732-0.

CHEN, Shuaijie; SHEN, Ruming; SHEN, Jiayi; LYU, Lingchun; WEI, Tiemin. Association of blood cadmium with all-cause and cause-specific mortality in patients with hypertension. **Frontiers in Public Health**, [S. l.], v. 11, 2023. DOI: 10.3389/FPUH.2023.1106732/PDF. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37469695/>. Acesso em: 27 maio. 2025.

CHIARELLI, Roberto; MARTINO, Chiara; ROCCHERI, Maria Carmela. Cadmium stress effects indicating marine pollution in different species of sea urchin employed as environmental bioindicators. **Cell Stress and Chaperones**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 675–687, 2019. DOI: 10.1007/s12192-019-01010-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12192-019-01010-1>.

CHOU, Shing-hsien; LIN, Hung-chen; CHEN, Shao-wei; TAI, Yu-ting; JUNG, Shih-ming; KO, Fu-hsiang; PANG, Jong-hwei Su; CHU, Pao-hsien. Cadmium exposure induces histological damage and cytotoxicity in the cardiovascular system of mice. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 175, n. 5, p. 113740, 2023. DOI: 10.1016/j.fct.2023.113740. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113740>.

CHRISTINY, Lorraine et al. In vitro cadmium exposure induces structural damage and endothelial dysfunction in female rat aorta. **BioMetals**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1405–1420, 2023. DOI: 10.1007/s10534-023-00526-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00526-5>.

CIONEK, Vivian M.; ZAIA ALVES, Gustavo H.; TÓFOLI, Rafael M.; RODRIGUES-FILHO, Jorge L.; DIAS, Rosa M. Brazil in the mud again: lessons not learned from Mariana dam collapse. **Biodiversity and Conservation**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 1935–1938, 2019. DOI: 10.1007/s10531-019-01762-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01762-3>.

COEN, Matteo; GABBIANI, Giulio; BOCHATON-PIALLAT, Marie Luce. Myofibroblast-mediated adventitial remodeling: An underestimated player in arterial pathology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 2391–2396, 2011. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.231548,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21868702/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

CORNÉLIO FAVARIN, Daniely; MARTINS TEIXEIRA, Maxelle; LEMOS DE ANDRADE, Ednéia; DE FREITAS ALVES, Claudiney; LAZO CHICA, Javier Emilio; ARTÉRIO SORGI, Carlos; FACCIOLI, Lúcia Helena; PAULA ROGERIO, Alexandre. Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1155/2013/164202.

CRUZ, Camila; ALMENARA, Pereira; FERNANDES, Thiago; DAVID, De Oliveira; FELÍCIO, Chaves. Cessation Restores Blood Pressure Levels and Endothelial Function Affected by Cadmium Exposure on Rats. **Biological Trace Element Research**, [S. l.],

p. 1955–1964, 2023. DOI: 10.1007/s12011-022-03312-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03312-5>.

CUI, Guang Hao; CHEN, Wei Qian; SHEN, Zhen Ya. Urolithin A shows anti-atherosclerotic activity via activation of class B scavenger receptor and activation of Nef2 signaling pathway. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 519–524, 2017. DOI: 10.1016/j.pharep.2017.04.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2017.04.020>.

CUYPERS, Ann et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. **BioMetals**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 927–940, 2010. DOI: 10.1007/s10534-010-9329-x.

CZECZOT H., Majewska M. Cadmium–exposure and its effects on health. **Toksikologia**, [S. l.], v. 66, p. 243–250, 2010.

DAHIYA, Rashmi; MOHAMMAD, Taj; GUPTA, Preeti; HAQUE, Anzarul; ALAJMI, Mohamed F.; HUSSAIN, Afzal; HASSAN, Imtaiyaz. Molecular interaction studies on ellagic acid for its anticancer potential targeting pyruvate dehydrogenase kinase 3. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, p. 23302–23315, 2019. DOI: 10.1039/c9ra02864a.

DAHL, A; YATSKAYER, M; RAAB, S;; ORESAJO, C; Tolerance and efficacy of a product containing ellagic and salicylic acids in reducing hyperpigmentation and dark spots in comparison with 4% hydroquinone. **J Drugs Dermatol**, [S. l.], v. 12, p. 52–58, 2013.

DANIEL, Elaine M.; KFCJPNICK, Alexander S.; HEUR, Young-hun; BLINZLER, Jane A.; NIMS, Raymond W.; STONER, Gary D. Extraction , Stability , and Quantitation of Ellagic Acid in Various Fruits and Nuts. [S. l.], v. 349, p. 338–349, 1989.

DE ANGELIS, Cristina; GALDIERO, Mariano; PIVONELLO, Claudia; SALZANO, Ciro; GIANFRILLI, Daniele; PISCITELLI, Prisco; LENZI, Andrea; COLAO, Annamaria; PIVONELLO, Rosario. The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive functions and its implication in fertility. **Reproductive Toxicology**, [S. l.], v. 73, p. 105–127, 2017. DOI: 10.1016/j.reprotox.2017.07.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.021>.

DI PIETRO, Natalia; BALDASSARRE, Maria Pompea Antonia; CICHELLI, Angelo; PANDOLFI, Assunta; FORMOSO, Gloria; PIPINO, Caterina. Role of Polyphenols and Carotenoids in Endothelial Dysfunction: An Overview from Classic to Innovative Biomarkers. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2020, 2020. DOI: 10.1155/2020/6381380.

DIAZ, Denisse. Low-Level Cadmium Exposure and Atherosclerosis. [S. l.], p. 42–53, 2021.

DING, Yi; ZHANG, Bin; ZHOU, Kaiyuan; CHEN, Minchun; WANG, Mingming; JIA, Yanyan; SONG, Ying; LI, Yuwen; WEN, Aidong. Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: Role of Nrf2 activation. **International Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 175, n. 3, p. 508–514, 2014. a. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.06.045. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.06.045>.

DOCCIOLI, Chiara; SERA, Francesco; FRANCAVILLA, Andrea; CUPISTI, Adamasco; BIGGERI, Annibale. Association of cadmium environmental exposure with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 906, n. September 2023, p. 167165, 2024. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.167165. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167165>.

DOEHNER, Wolfram; LANDMESSER, Ulf. Xanthine Oxidase and Uric Acid in

Cardiovascular Disease: Clinical Impact and Therapeutic Options. **Seminars in Nephrology**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 433–440, 2011. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2011.08.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22000650/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

DOHI, Y., KOJIMA, M., SATO, K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. **Hypertension**, [S. l.], v. 28, p. 732–7, 1996.

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. **Biomaterials**, [S. l.], v. 24, p. 105–115, 2011.

DOS SANTOS, Walter; SAUTHIER, Maria; DOS SANTOS, Ana; SANTANA, Débora; AZEVEDO, Ravena; CALDAS, Jamile. Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L .) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA) ☆. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 133, p. 583–592, 2017. DOI: 10.1016/j.microc.2017.04.029.

DOWELL, F.J., Et Al. Decreased basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old strokeprone spontaneously hypertensive rat. **Eur J Pharmacol.**, [S. l.], v. 379, p. 175–182, 1999.

DRUMMOND, Grant R.; SELEMIDIS, Stavros; GRIENDLING, Kathy K.; SOBEY, Christopher G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 453–471, 2011. DOI: 10.1038/nrd3403.

DUAN, Huxinyue; ZHANG, Qing; LIU, Jia; LI, Ruolan; WANG, Dan; PENG, Wei; WU, Chunjie. Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell , the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 168, n. March, p. 105599, 2021. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105599. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105599>.

DUARTE, Eduardo Baudson; NEVES, Mirna Aparecida; DE OLIVEIRA, Fabricia Benda; MARTINS, Marx Engel; DE OLIVEIRA, Carlos Henrique Rodrigues; BURAK, Diego Lang; ORLANDO, Marcos Tadeu D. Azered.; RANGEL, Caio Vinícius Gabrig Turbay. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. **Chemosphere**, [S. l.], v. 262, p. 127879, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127879. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>.

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

EL-SHITANY, Nagla A.; EL-BASTAWISSY, Eman A.; EL-DESOKY, Karema. International Immunopharmacology Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B , inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 290–299, 2014. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.004>.

EL GHARRAS, Hasna. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 44, n. 12, p. 2512–2518, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x.

ESPÍN, J; LARROSA, M; GARCÍA-CONESA, M;; TOMÁS-BARBERÁN, F; Biological

significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: The evidence so far. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/270418.

EVTYUGIN, D.; MAGINA, Sandra; EVTUGUIN, Dmitry V. Recent Advances in the Production and Applications of Ellagic Acid and Its Derivatives. A Review. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 12, 2020. a. DOI: 10.3390/MOLECULES25122745.

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

FADLOUN, Z.; LEACH, G. D. H. The effects of cadmium ions on blood pressure, dopamine-β-hydroxylase activity and on the responsiveness of in vivo preparations to sympathetic nerve stimulation, noradrenaline and tyramine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 660–664, 2011. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1981.tb13894.x.

FAROON O, ASHIZAWA A, WRIGHT S, TUCKER P, JENKINS K, INGERMAN L, Et al. Toxicological Profile for Cadmium. [S. l.], 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos E Mecanismo De Lesão. **Rev Ass Med Brasil**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 61–69, 1997.

FILIPPINI, Tommaso; WISE, Lauren A.; VINCETI, Marco. Cadmium exposure and risk of diabetes and prediabetes : A systematic review and dose-response meta-analysis. **Environment International**, [S. l.], v. 158, n. May 2021, p. 106920, 2022. DOI: 10.1016/j.envint.2021.106920. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106920>.

FLEURY. Manual de Exames/Fleury Medicina e Saúde. [S. l.], [s.d.].

FÖRSTERMANN, Ulrich; MÜNDEL, Thomas. Basic Science for Clinicians Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. **Circulation**, [S. l.], p. 1708–1714, 2006. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532.

FORTE, Maurizio; CONTI, Valeria; DAMATO, Antonio; AMBROSIO, Mariateresa; PUCA, Annibale A.; SCIARRETTA, Sebastiano; FRATI, Giacomo; VECCHIONE, Carmine; CARRIZZO, Albino. Targeting Nitric Oxide with Natural Derived Compounds as a Therapeutic Strategy in Vascular Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/7364138. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5019908/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35019908/). Acesso em: 22 jul. 2022.

FREITAS, Carlos; BARCELLOS, Christovam; AL, Et. Da Samarco em Mariana à Vale em Brumadinho: desastres em barragens de mineração e Saúde Coletiva. **Cad. Saúde Pública**, [S. l.], v. 35, n. 5, 2019. DOI: 10.1590/0102-311X00052519.

GALANO, Annia; FRANCISCO MARQUEZ, Misaela; PÉREZ-GONZÁLEZ, Adriana. Ellagic acid: An unusually versatile protector against oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 904–918, 2014. DOI: 10.1021/tx500065y.

GALANO, Annia; MAZZONE, Gloria; MARINO, Tiziana; RA, J.; RUSSO, Nino. Food Antioxidants : Chemical Insights at the Molecular Level. [S. l.], n. December, p. 1–18, 2015. DOI: 10.1146/annurev-food-041715-033206.

GENCHI, Giuseppe; SINICROPI, Maria Stefania; LAURIA, Graziantonio; CAROCCI, Alessia. The Effects of Cadmium Toxicity. [S. l.], n. Cd, p. 1–24, 2020.

GÓMEZ-CARAVACA, Ana María; VERARDO, Vito; TOSELLI, Moreno; SEGURA-CARRETERO, Antonio; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto; CABONI, Maria Fiorenza. Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-

ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 61, p. 5328–5337, 2013. DOI: 10.1021/jf400684n.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, Antonio; GARCÍA-VILLALBA, Rocío; NÚÑEZ-SÁNCHEZ, M. ...; TOMÉ-CARNEIRO, Joao;; ZAFRILLA, Pilar; et Al. Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 19, p. 225–235, 2015. DOI: 10.1016/j.jff.2015.09.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.019>.

GOUDARZI, Mehdi; FATEMI, Iman; SIAHPOOSH, Amir; SEZAVAR, Seyed Hashem; MANSOURI, Esrafil; MEHRZADI, Saeed. Protective Effect of Ellagic Acid Against Sodium Arsenite-Induced Cardio- and Hematotoxicity in Rats. **Cardiovascular Toxicology**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 337–345, 2018. DOI: 10.1007/s12012-018-9446-2.

GOYAL, Taru; MITRA, Prasenjit; SINGH, Preeti; GHOSH, Raghumoy; LINGESWARAN, Malavika; SHARMA, Shailja; PUROHIT, Purvi; SHARMA, Praveen. Estimation of lymphocyte subsets and cytokine levels in workers occupationally exposed to cadmium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 64, n. September 2020, p. 126681, 2021. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126681. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126681>.

GRAZIOLI, Elisa et al. Impact of physical activity and natural bioactive compounds on endothelial dysfunction in chronic kidney disease. **Life**, [S. l.], v. 11, n. 8, 2021. DOI: 10.3390/life11080841.

GRESELE, P.; MOMI, S.; GUGLIELMINI, G. Nitric oxide-enhancing or -releasing agents as antithrombotic drugs. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 166, n. March, p. 300–312, 2019. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.05.030. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.05.030>.

GRIENDLING, K; CAMARGO, L; RIOS, F; et Al. OXIDATIVE STRESS AND HYPERTENSION. **Circ Res.**, [S. l.], v. 128, n. 7, p. 993–1020, 2021. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318063.OXIDATIVE.

GRYGLEWSKI, R.; PALMER, R.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, [S. l.], v. 320, p. 454–456, 1986.

GÜL, Mehmet; DUNDAR, Serkan; YIGIN, Akın; ARTAŞ, Gökhan; TANIK, Abdulsamet; BINGÜL, Muhammet;; HABEK, Osman. Evaluation of the Effects of Topical Ellagic Acid and Graft Application on Bone Regeneration: an Experimental Study. **Journal of Oral and Maxillofacial Research**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–9, 2022. DOI: 10.5037/jomr.2022.13203.

GUPTA, Ashutosh; SINGH, Amit Kumar; KUMAR, Ramesh; JAMIESON, Sarah; PANDEY, Abhay Kumar; BISHAYEE, Anupam. Neuroprotective Potential of Ellagic Acid: A Critical Review. **Advances in Nutrition**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 1211, 2021. DOI: 10.1093/ADVANCES/NMAB007. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8321875/](https://pmc/articles/PMC8321875/). Acesso em: 4 ago. 2022.

GUPTA, Preeti; MOHAMMAD, Taj; KHAN, Parvez; ALAJMI, Mohamed F.; HUSSAIN, Afzal. Evaluation of ellagic acid as an inhibitor of sphingosine kinase 1: A targeted approach towards anticancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 118, p. 109245, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109245. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109245>.

GUPTA, S.; MCARTHUR, C.; GRADY, C.; RUDERMAN, N. B. Stimulation of vascular Na(+)-K(+)-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 266, n. 5, p.

H2146–H2151, 1994. DOI: 10.1152/ajpheart.1994.266.5.h2146.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, [S. l.], v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HALPER, Jaroslava. Basic Components of Vascular Connective Tissue and Extracellular Matrix. **Advances in Pharmacology**, [S. l.], v. 81, p. 95–127, 2018. DOI: 10.1016/BS.APHA.2017.08.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1054358917300789?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jul. 2025.

HAN, Seogoo; SUNG, Gi Ho; LEE, Sangheun; HAN, Ki Jun; HAN, Hyun Jeong. Serum cadmium is associated with hepatic steatosis and fibrosis: Korean national health and nutrition examination survey data IV-VII. **Medicine (United States)**, [S. l.], v. 101, n. 4, p. E28559, 2022. DOI: 10.1097/MD.00000000000028559.

HARA, Takato et al. Cadmium Induces Vascular Endothelial Cell Detachment by Downregulating Claudin-5 and ZO-1 Levels. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 20, 2024. DOI: 10.3390/IJMS252011035,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39456818/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

HARIKRISHNAN, Hemavathy; JANTAN, Ibrahim; ALAGAN, Akilandeshwari; HAQUE, Areeful. Modulation of cell signaling pathways by *Phyllanthus amarus* and its major constituents : potential role in the prevention and treatment of inflammation and cancer. **Inflammopharmacology**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1007/s10787-019-00671-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00671-9>.

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**, [S. l.], v. 40, p. 420- 425., 1983.

HE, Long; HE, Ting; FARRAR, Shabnam; JI, Linbao; LIU, Tianyi; MA, Xi. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 532–553, 2017. DOI: 10.1159/000485089.

HILLIS, RW Hemingway e WE. Behavior of ellagitannins, gallic acid, and ellagic acid under alkaline conditions. **TAPPI, The Journal of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry**, [S. l.], v. 54, p. 933–936, 1971.

HOROWITZ, Arie; MENICE, B.; LAPORTE, Regent; MORGAN, G. Mechanisms of Smooth Muscle Contraction. **Physiol Rev.**, [S. l.], v. 76, n. 4, 2018.

HU, Shaofan; FENG, Jing; WANG, Meng; WUFUER, Reziyamu; LIU, Keli; ZHANG, Zhengwen; ZHANG, Yiguo. Nrf1 is an indispensable redox-determining factor for mitochondrial homeostasis by integrating multi-hierarchical regulatory networks. **Redox Biology**, [S. l.], v. 57, n. September, p. 102470, 2022. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102470. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102470>.

HWANG, Jinah et al. Oscillatory Shear Stress Stimulates Endothelial Production of O₂ from p47phox-dependent NAD(P)H Oxidases, Leading to Monocyte Adhesion. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 278, n. 47, p. 47291–47298, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M305150200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12958309/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

I. SUHANI , S. SAHAB , V. SRIVASTAVA, RP Singh. Impact of cadmium pollution on food safety and human health. **Toxicol**, [S. l.], v. 27, p. 1–7, 2021. DOI: , 10.1016/J.COTOX.2021.04.004.

INTORNO M, CAMPIA U, DI DANIELE N, NISTICO S, FORLEO GB, CARDILLO C, Tesauo M. Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. **J Biol Regul Homeost Agents**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 169–76, 2014.

INCALZA, Maria Angela; D'ORIA, Rossella; NATALICCHIO, Annalisa; PERRINI, Sebastio; LAVIOLA, Luigi; GIORGINO, Francesco. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, [S. l.], v. 100, p. 1–19, 2018. DOI: 10.1016/j.vph.2017.05.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28579545/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ISZARD, Marcus B.; LIU, Jie; KLAASSEN, Curtis D. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. **Toxicology**, [S. l.], v. 104, n. 1–3, p. 25–33, 1995. DOI: 10.1016/0300-483X(95)03118-Y. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300483X9503118Y?via%3Dihub>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ITSARA, Leslie S.; KENNEDY, Scott R.; FOX, Edward J.; YU, Selina; HEWITT, Joshua J.; SANCHEZ-CONTRERAS, Monica; CARDOZO-PELAEZ, Fernando; PALLANCK, Leo J. Oxidative Stress Is Not a Major Contributor to Somatic Mitochondrial DNA Mutations. **PLOS Genet**, [S. l.], v. 10, n. 2, 2014. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003974.

J. MACIERZYNSKI, M. SOJKA, M. Kosmala e E. Karlinska. Transformação de elagitaninos oligoméricos, típicos para Rubus and Fragaria Genus, durante a hidrólise de ácido forte. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 68, n. 31, p. 8212–8222, 2020.

JANASZAK-JASIECKA, Anna; PŁOSKA, Agata; WIEROŃSKA, Joanna M.; DOBRUCKI, Lawrence W.; KALINOWSKI, Leszek. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. **Cellular and Molecular Biology Letters**, [S. l.], v. 28, n. 1, 2023. DOI: 10.1186/S11658-023-00423-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36890458/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

JAVAID, N.; SHAH, M.; RASUL, A. et al. Neuroprotective effects of ellagic acid in Alzheimer's disease: focus on underlying molecular mechanisms of therapeutic potential. [S. l.], v. 27, n. 34, p. 3591–3601, 2021. DOI: 10.2174/1381612826666201112144006.

JOMOVA, Klaudia; ALOMAR, Suliman Y.; NEPOVIMOVA, Eugenie; KUČA, Kamil; VALKO, Marian. **Heavy metals : toxicity and human health effects**. [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2025. v. 99 DOI: 10.1007/s00204-024-03903-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03903-2>.

JORDÃO, Juliana Bahia Reis; PORTO, Hellen Karine Paes; LOPES, Flávio Marques; BATISTA, Aline Carvalho; ROCHA, Matheus Lavorenti. Protective Effects of Ellagic Acid on Cardiovascular Injuries Caused by Hypertension in Rats. **Planta Medica**, [S. l.], v. 83, n. 10, p. 830–836, 2017. DOI: 10.1055/s-0043-103281.

JURDZIAK, Marta; GAĆ, Paweł; POREBA, Małgorzata; SZYMAŃSKA-CHABOWSKA, Anna; MAZUR, Grzegorz; POREBA, Rafał. Concentration of Thyrotropic Hormone in Persons Occupationally Exposed to Lead, Cadmium and Arsenic. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 182, n. 2, p. 196–203, 2018. DOI: 10.1007/s12011-017-1096-x.

KAHKONEN, M. ...; AL, Et. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries. **Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 5, p. 1167–1174, 2012.

KANNAN, M. Mari; QUINE, S. Darlin. Ellagic acid ameliorates isoproterenol induced

oxidative stress: Evidence from electrocardiological, biochemical and histological study. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 659, n. 1, p. 45–52, 2011. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.02.037. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.02.037>.

KARBACH, Susanne; WENZEL, Philip; WAISMAN, Ari; MUNZEL, Thomas; DAIBER, Andreas. eNOS Uncoupling in Cardiovascular Diseases - the Role of Oxidative Stress and Inflammation. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 20, n. 22, p. 3579–3594, 2014. DOI: 10.2174/13816128113196660748,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24180381/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

KASAI, K; YOSHIMURA, M; KOGA, T; ARII, M;; KAWASAKI, S. Effects of oral administration of ellagic acid-rich pomegranate extract on ultraviolet-induced pigmentation in the human skin. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, [S. l.], v. 52, p. 383–388, 2006.

KAWAKAMI, Takashige; SUGIMOTO, Hiroyuki; FURUICHI, Rie; KADOTA, Yoshito; INOUE, Masahisa; SETSU, Kojun; SUZUKI, Shinya; SATO, Masao. Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue. **Toxicology**, [S. l.], v. 267, n. 1–3, p. 20–26, 2010. DOI: 10.1016/j.tox.2009.07.022.

KHAN, Zaman; ELAHI, Amina; BUKHARI, Dilara A.; REHMAN, Abdul. Cadmium sources , toxicity , resistance and removal by microorganisms-A potential strategy for cadmium eradication. **Journal of Saudi Chemical Society**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 101569, 2022. DOI: 10.1016/j.jscs.2022.101569. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101569>.

KIASALARI, Zahra; HEYDARIFARD, Rana; KHALILI, Mohsen; AFSHIN-MAJD, Siamak. Ellagic acid ameliorates learning and memory deficits in a rat model of Alzheimer ' s disease : an exploration of underlying mechanisms. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 234, p. 1841–1852, 2017. DOI: 10.1007/s00213-017-4589-6.

KNOELL, Daren L.; WYATT, Todd A. The adverse impact of cadmium on immune function and lung host defense. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 115, n. October 2020, p. 70–76, 2021. DOI: 10.1016/j.semcdb.2020.10.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.10.007>.

KNOFLACH, Michael et al. Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. **Circulation Journal**, [S. l.], v. 75, n. 10, p. 2491–2495, 2011. DOI: 10.1253/circj.CJ-11-0196.

KOÇAK, Mehtap; AKÇIL, Ethem. The effects of chronic cadmium toxicity on the hemostatic system. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 411–416, 2006. DOI: 10.1159/000102047.

KOLLURU, G. K.; SIAMWALA, J. H.; CHATTERJEE. eNOS phosphorylation in health and disease. **Biochimie**, [S. l.], v. 30, p. 1–13, 2010.

KOLLURU, G.; TAMILARASAN, K.; GEETHAPRIYA, S.; DURGHA, N.; 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**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 427–438, 2006. DOI: 10.1016/j.cellbi.2006.02.002.

KONTOGHIORGHES, G; Advances on chelation and chelator metal complexes in medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 1–8, 2020. DOI: 10.3390/ijms21072499.

KOPONEN, JANI; HAPPONEN, ANU; MATTILA, PIRJO; TORRONEN, A. Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, [S. l.], v. 55, p. 1612–1619, 2007.

KRAJKA-KUŻNIAK, Violetta; BAER-DUBOWSKA, Wanda. Modulation of Nrf2 and NF- κ B signaling pathways by naturally occurring compounds in relation to cancer prevention and therapy. Are combinations better than single compounds? **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 15, 2021. DOI: 10.3390/ijms22158223.

KRISHNAPPA, Kruthika; MOHAN, Sankarshan B.; ANKANATHAPPA, Sangamesha M.; SANNATHAMMEGOWDA, Krishnaveni. Fabrication of cadmium chloride PVA polymer composite for γ -ray shielding. [S. l.], v. 199, n. 20, p. 2487–2490, 2023.

KUBIER, Andreas; WILKIN, Richard T.; PICHLER, Thomas; AGENCY, Environmental Protection; RISK, National. EPA Public Access. [S. l.], p. 1–42, 2020. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2019.104388.Cadmium.

KUKONGVIRIYAPAN, Upa; PANNANGPETCH, Patchareewan; KUKONGVIRIYAPAN, Veerapol; DONPUNHA, Wanida; SOMPAMIT, Kwanjit; SURAWATTANAWAN, Praphassorn. Curcumin protects against cadmium-induced vascular dysfunction, hypertension and tissue cadmium accumulation in mice. **Nutrients**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 1194–1208, 2014. DOI: 10.3390/nu6031194.

KUMAR, Kasinathan Nirmal; RAJA, Subramaniya Bharathi; VIDHYA, Natarajan; DEVARAJ, Sivachithamparam Niranjali. Ellagic acid modulates antioxidant status, ornithine decarboxylase expression, and aberrant crypt foci progression in 1,2-dimethylhydrazine- instigated colon preneoplastic lesions in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 14, p. 3665–3672, 2012. DOI: 10.1021/jf204128z.

KUMAR, Sunil; SHARMA, Anupama. Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. **Reviews on Environmental Health**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 327–338, 2019. DOI: 10.1515/reveh-2019-0016.

LAMPE, Brad J.; PARK, Sung Kyun; ROBINS, Thomas; MUKHERJEE, Bhramar; LITONJUA, Augusto A.; AMARASIRIWARDENA, Chitra; WEISSKOPF, Marc; SPARROW, David; HU, Howard. Association between 24-Hour Urinary Cadmium and Pulmonary Function among Community-Exposed Men: The VA Normative Aging Study. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 116, n. 9, p. 1226–1230, 2008. DOI: 10.1289/ehp.11265.

LANDETE, J. M. Ellagitannins , ellagic acid and their derived metabolites : A review about source , metabolism , functions and health. **FRIN**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 1150–1160, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>.

LARROSA, M.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 611–625, 2006.

LEE, Jae Woo; KIM, Yeseul; KIM, Yonghwan; YOO, Hyo Sun; KANG, Hee Taik. Cigarette Smoking in Men and Women and Electronic Cigarette Smoking in Men are Associated with Higher Risk of Elevated Cadmium Level in the Blood. **Journal of Korean medical science**, [S. l.], v. 35, p. e15, 2020. DOI: 10.3346/jkms.2020.35.e15.

LEHOUX, Stephanie. Adventures in the adventitia. **Hypertension**, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 836–838, 2016. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06375,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27001296/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

LI, FJ; SUROLIA, R.; SINGH, P.; DSOUZA, KG; STEPHENS, CT; WANG, Z.; LIU, RM;

BAE, S.; KIM, YI; ATHAR, M. .. et al. Fibrinogen mediates cadmium-induced macrophage activation and serves as a predictor of cadmium exposure in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Physiol. Pulmonar. Molecular**, [S. l.], v. 322, p. L593–L606, 2022.

LI, Xiaohe; HUANG, Kai; LIU, Xiaowei; RUAN, Hao; MA, Ling; LIANG, Jingjing. Ellagic Acid Attenuates BLM-Induced Pulmonary Fibrosis via Inhibiting Wnt Signaling Pathway. **Frontiers in pharmacology**, [S. l.], v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.639574.

LIN, Hung-Chen; HAO, Wei-Ming; CHU, Pao-Hsien. Cadmium and cardiovascular disease: An overview of pathophysiology, epidemiology, therapy, and predictive value. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, [S. l.], v. 40, n. 8, p. 611–617, 2021. DOI: 10.1016/j.repc.2021.01.009.

LIU, Haotian; FU, Mingyang; REN, Ziqi; LIU, Zhaoshuo; CAO, Xiangyu; CHEN, Jiahe; PANG, Yulin. Cadmium exposure induces inflammation , oxidative stress and DNA damage in HUVEC and promotes THP-1 adhesion : A possible mechanism on the formation of atherosclerotic plaque. **Toxicology**, [S. l.], v. 511, n. November 2024, p. 154046, 2025. DOI: 10.1016/j.tox.2025.154046. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2025.154046>.

LIU, Houqi; LIU, Guijian; YUAN, Zijiao; GE, Meng; WANG, Shanshan; LIU, Yuan; DA, Chunnian. Occurrence, potential health risk of heavy metals in aquatic organisms from Laizhou Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 140, n. October 2018, p. 388–394, 2019. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.01.067. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.067>.

LIU, Qiong; LIANG, Xiaobing; LIANG, Mintong; QIN, Rongbin; QIN, Feixing; WANG, Xuelan. Ellagic Acid Ameliorates Renal Ischemic-Reperfusion Injury Through NOX4/JAK/STAT Signaling Pathway. **Inflammation**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 298–309, 2020. DOI: 10.1007/s10753-019-01120-z.

LIU, Yue; CHEN, Chunhong; HAO, Zhihui; SHEN, Jianzhong; TANG, Shusheng; DAI, Chongshan. Ellagic Acid Reduces Cadmium Exposure-Induced Apoptosis in HT22 Cells via Inhibiting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction and Activating Nrf2 / HO-1 Pathway. [S. l.], 2024.

LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo; DENICOLA, Ana. Analytica Chimica Acta Evaluating the antioxidant capacity of natural products : A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 763, p. 1–10, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.051. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.

LORENZO, J; MUNEKATA, P; PUTNIK, P; KOVACEVIC, D; MUCHENJE, V; BARBA, F. Sources, chemistry, and biological potential of ellagitannins and ellagic acid derivatives. **Studies in Natural Products Chemistry**, [S. l.], v. 60, p. 189–221, 2019.

LORENZO, José M.; MUNEKATA, Paulo E.; PUTNIK, Predrag; KOVAČEVIĆ, Danijela Bursać; MUCHENJE, Voster; BARBA, Francisco J. Sources, Chemistry, and Biological Potential of Ellagitannins and Ellagic Acid Derivatives. **Studies in Natural Products Chemistry**, [S. l.], v. 60, p. 189–221, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-444-64181-6.00006-1.

MA-ON, C; SANPAVAT, A; WHONGSIRI, P; SUWANNASIN, S; HIRANKARN, N; TANGKIJVANICH, P; BOONLA, C. .. Oxidative stress indicated by elevated expression of Nrf2 and 8-OHdG promotes hepatocellular carcinoma progression. **Med Oncol**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 57, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12032-017-0914-5>.

MADRIGAL, Jessica M.; RICARDO, Ana C.; PERSKY, Victoria; TURYSK, Mary.

Associations between blood cadmium concentration and kidney function in the U.S. population: Impact of sex, diabetes and hypertension. **Environmental Research**, [S. l.], v. 169, p. 180–188, 2019. DOI: 10.1016/J.ENVRES.2018.11.009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935118305796?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jul. 2025.

MAJUMDER, Syamantak; MULEY, Ajit; KOLLURU, Gopi Krishna; SAURABH, Samir; TAMILARASAN, K. P.; CHANDRASEKHAR, Sidharth; REDDY, Hima Bindu; PUROHIT, Sharad; CHATTERJEE, Suvro. Cadmium reduces nitric oxide production by impairing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. **Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 1–10, 2008. DOI: 10.1139/O07-146.

MARQUES VB, LEAL MAS, MAGESKI JGA, FIDELIS HG, NOGUEIRA BV, VASQUEZ EC, MEYRELLES SDS, SIMÕES MR, DOS SANTOS L. Chronic iron overload intensifies atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice: Role of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Life Sci.* 2019 Sep 15;233:116702. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116702. PMID: 31356905.

MATOVIĆ, Vesna; BUHA, Aleksandra; BULAT, Zorica; DUKIĆ-ĆOSIĆ, Danijela. **Cadmium toxicity revisited: Focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium.** *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 2011. DOI: 10.2478/10004-1254-62-2011-2075.

MEDINA-REMÓN A, Et al. Total polyphenol excretion and blood pressure in subjects at high cardiovascular risk. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis**, [S. l.], v. 21, p. 323–331., 2011. DOI: doi: 10.1016/j.numecd.2009.10.019.

MEDINA-REMÓN A, Et al. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, [S. l.], v. 25, p. 60–67, 2015. DOI: 10.1016/j.numecd.2014.09.001.

MELE, Laura; MENA, Pedro; PIEMONTESE, Antonio; MARINO, Valentina; DEL, Daniele. Antiatherogenic effects of ellagic acid and urolithins in vitro *. [S. l.], v. 599, p. 42–50, 2016. DOI: 10.1016/j.abb.2016.02.017.

MESSNER, Barbara; TÜRKCAN, Adrian; PLONER, Christian; LAUFER, Günther; BERNHARD, David. Cadmium overkill: Autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 73, n. 8, p. 1699–1713, 2016. DOI: 10.1007/S00018-015-2094-9/FIGURES/7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-015-2094-9>. Acesso em: 2 jul. 2025.

MILSTIEN, Sheldon; KATUSIC, Zvonimir. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 263, n. 3, p. 681–684, 1999. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1422.

MISHRA, Sudha; VINAYAK, Manjula. Ellagic acid inhibits PKC signaling by improving antioxidant defense system in murine T cell lymphoma. **Mol Biol Rep**, [S. l.], v. 41, p. 4187–4197, 2014. DOI: 10.1007/s11033-014-3289-0.

MITRA, Saikat et al. Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. **Journal of King Saud University - Science**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 101865, 2022. DOI: 10.1016/j.jksus.2022.101865. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865>.

MOHAN, Mahalaxmi; WAGHULDE, Harshal; KASTURE, Sanjay. Effect of pomegranate juice on angiotensin II-induced hypertension in diabetic wistar rats. **Phytotherapy**

Research, [S. l.], v. 24, n. SUPPL. 2, p. 196–203, 2010. DOI: 10.1002/ptr.3090.

MONCADA, S.; HIGGS, EA.; VANE, JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin), a potent inhibitor of platelet aggregation. **Lancet**, [S. l.], v. 1, p. 18–21, 1977.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MRID, R.; BOUCHMAA, N.; OUEDRHIRI, W. Synergistic antioxidant effects of natural compounds on H₂O₂-induced cytotoxicity of human monocytes. **Frontiers in pharmacology**, [S. l.], v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.830323.

NAGATA, Chisato; NAGAO, Yasuko; NAKAMURA, Kozue; WADA, Keiko; TAMAI, Yuya; TSUJI, Michiko; YAMAMOTO, Satoru; KASHIKI, Yoshitomo. Cadmium exposure and the risk of breast cancer in Japanese women. **Breast Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 138, n. 1, p. 235–239, 2013. DOI: 10.1007/S10549-013-2414-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23358902/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

NAWROT, Tim S.; MARTENS, Dries S.; HARA, Azusa; PLUSQUIN, Michelle; VANGRONVELD, Jaco; ROELS, Harry A.; STAESSEN, Jan A. Association of total cancer and lung cancer with environmental exposure to cadmium: the meta-analytical evidence. **Cancer Causes and Control**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 1281–1288, 2015. DOI: 10.1007/S10552-015-0621-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26109463/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

NEAMATALLAH, Thikryat; EL-SHITANY, Nagla; ABBAS, Aymn.; BASMA, G. .. et al. Nano Ellagic Acid Counteracts Cisplatin-Induced Upregulation in OAT1 and OAT3: A Possible Nephroprotection Mechanism. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 13, p. 3031, 2020. DOI: 10.3390/molecules25133031.

NEVES, NATHÁLIA DE ANDRADE; STRINGHETA, PAULO SERGIO; GÓMEZ-ALONSO, SERGIO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, Isidro. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jabuticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 252, p. 61–71, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.078>.

NIGRIS, Filomena De et al. Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. **PNAS**, [S. l.], v. 102, n. 13, 2005.

NIGRIS, Filomena De; WILLIAMS-IGNARRO, Sharon; SICA, Vincenzo; LERMAN, Lilach O.; CARPENTIERO, Daniela; SCHIANO, Concetta; SUMI, Daigo; FIORITO, Carmela. Effects of a Pomegranate Fruit Extract rich in punicalagin on oxidation-sensitive genes and eNOS activity at sites of perturbed shear stress and atherogenesis. **Cardiovascular Research**, [S. l.], v. 73, p. 414–423, 2007. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.08.021.

NISHIJO, Muneko; NAKAGAWA, Hideaki; SUWAZONO, Yasushi; NOGAWA, Kazuhiro; KIDO, Teruhiko. Causes of death in patients with Itai-itai disease suffering from severe chronic cadmium poisoning: A nested case-control analysis of a follow-up study in Japan. **BMJ Open**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-015694.

NONTARACH A, SRIHIRUN S, CHATURAPANICH G, UNCHERN S, SWADDIWUDHIPONG W, PATTANAPANYASAT K, CHAMCHOI A, VIVITHANAPORN P, VISOOTTIVISETH P, Sibmooh N. Increased platelet activation in subjects chronically exposed to cadmium: A pilot study. **Platelets**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 136–42, 2016. DOI: doi: 10.3109/09537104.2015.1048215.

NUGROHO, A.; RHIM, T. J.; CHOI, M. Y.; CHOI, J. S. et Al. Simultaneous analysis and peroxynitrite-scavenging activity of galloylated flavonoid glycosides and ellagic acid in *Euphorbia supina*. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 37, n. 7, p. 890–898, 2014.

OLIVEIRA, T. F.; BATISTA, P. R.; LEAL, M. A.; CAMPAGNARO, B. P.; NOGUEIRA, B. V.; VASSALLO, D. V.; MEYRELLES, S. S.; PADILHA, Alessandra Simão. Chronic Cadmium Exposure Accelerates the Development of Atherosclerosis and Induces Vascular Dysfunction in the Aorta of ApoE^{-/-} Mice. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 187, n. 1, p. 163–171, 2019. a. DOI: 10.1007/s12011-018-1359-1.

OLIVEIRA, T. F.; BATISTA, P. R.; LEAL, M. A.; CAMPAGNARO, B. P.; NOGUEIRA, B. V.; VASSALLO, D. V.; MEYRELLES, S. S.; PADILHA, Alessandra Simão. Chronic Cadmium Exposure Accelerates the Development of Atherosclerosis and Induces Vascular Dysfunction in the Aorta of ApoE^{-/-} Mice. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 187, n. 1, p. 163–171, 2019. b. DOI: 10.1007/s12011-018-1359-1.

OLIVEIRA, Thiago; ROSSI, Emily; DOS SANTOS, Charles; GRACELI, Jones; ALMENARA, Camila; SIMÃO, Alessandra. Sex - dependent vascular effects of cadmium sub - chronic exposure on rats. **BioMetals**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 189–199, 2023. DOI: 10.1007/s10534-022-00470-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00470-w>.

ORGANIZATION, World Health. Exposure to cadmium: a major public health concern. **PREVENTING DISEASE THROUGH HEALTHY ENVIRONMENTS**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/329480/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.3-eng.pdf?sequence=1>.

ORTIZ-RUIZ, C; BERNA, J; TUDELA, J; VARON, R;; GARCIA- CANOVAS, F. Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway. **Journal of Dermatological Science**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 115–122, 2016.

PAONE, Stephanie; BAXTER, Amy A.; HULETT, Mark D.; POON, Ivan K. H. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 76, n. 6, p. 1093–1106, 2019. DOI: 10.1007/s00018-018-2983-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2983-9>.

PARDIN, HERMES. Laboratório Hermes Pardini - Help de Exames. [S. l.], 2025. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/713392502/Cadmio-hermes-pardini>.

PARUVU, Y;; BOGGALA, R; MEENA, V. A comprehensive review on pharmacological activities of Ellagic Acid and its applicatiohns. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 161, p. 1–12, 2022.

PERFORMANCE, Production; HOMEOSTASIS, Redox; RESPONSE, Inflammatory; APOPTOSIS, Cell; LUO, Xugang. Regulation Progression on Ellagic Acid Improving Poultry. [S. l.], 2024.

PERSSE, Torbjörn; POPESCU, Bogdan O.; CEDAZO-MINGUEZ, Angel. Oxidative stress in alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1155/2014/427318.

PINHEIRO JÚNIOR, José Eudes Gomes et al. Cadmium exposure activates NADPH oxidase, renin–angiotensin system and cyclooxygenase 2 pathways in arteries, inducing hypertension and vascular damage. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 333, n. May, p. 80–89, 2020. a. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.07.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.027>.

PINHEIRO JÚNIOR, José Eudes Gomes et al. Cadmium exposure activates NADPH oxidase, renin–angiotensin system and cyclooxygenase 2 pathways in arteries, inducing hypertension and vascular damage. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 333, p. 80–89, 2020. b. DOI: 10.1016/J.TOXLET.2020.07.027. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427420303453?via%3Dihub#fig0015>. Acesso em: 8 maio. 2025.

PINHEIRO, Lucas C.; OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H. Sources and Effects of Oxidative Stress in Hypertension. **Current Hypertension Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 166–180, 2019. DOI: 10.2174/1573402115666190531071924,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31146669/>. Acesso em: 14 jul. 2025.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 97, p. 55–74, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

PIZZINO, G., Et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxid Med Cell Longev**, [S. l.], v. 8416763, 2017.

POLCE, Simran Alexandria; BURKE, Cameron; MARTINS, Lucas; ID, França; KRAMER, Benjamin; MARCUS, Antonio; PAES, De Andrade; CARRILLO-SEPULVEDA, Maria Alicia. Ellagic Acid Alleviates Hepatic Oxidative Stress and Insulin Resistance in Diabetic Female Rats. **Nutrients**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 531, 2018. DOI: 10.3390/nu10050531.

POLJSKAK, Borut; ŠUPUT, Dušan; MILISAV, Irina. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], 2013.

PRABU, S. Milton; SHAGIRTHA, K.; RENUGADEVI, J. Amelioration of Cadmium-Induced Oxidative Stress, Impairment in Lipids and Plasma Lipoproteins by the Combined Treatment with Quercetin and α -Tocopherol in Rats. [S. l.], v. 75, n. 7, 2010. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01757.x.

PRIYADARSINI, K. Indira; KHOPDE, Sujata M.; KUMAR, S. Santosh; MOHAN, Hari. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 50, n. 7, p. 2200–2206, 2002. DOI: 10.1021/JF011275G,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11902978/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

PROMSONG, A. et Al. Ellagic acid inhibits HIV- 1 infection in vitro: Potential role as a novel microbicide. **Oral Diseases**, [S. l.], v. 24, p. 249–252, 2018. DOI: 10.1111/odi.12835.

PRZEWLOKA, S. ..; SHEARER, B. The further chemistry of ellagic acid II. Ellagic acid and water-soluble ellagates as metal precipitants. **Holzforschung**, [S. l.], v. 56, p. 13–19, 2002. DOI: doi: 10.1515/HF.2002.003.

PUGSLEYA, M. K.; TABRIZCHI, R. Technical prerequisites for whole-body MRI screening. **Whole-Body MRI Screening**, [S. l.], v. 44, n. 2000, p. 29–44, 2014. DOI: 10.1007/978-3-642-55201-4.

PULJULA, Elina; WALTON, Gemma; WOODWARD, Martin J.; KARONEN, Maarit. Antimicrobial Activities of Ellagitannins against *Clostridiales* *perfringens*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 16, 2020. DOI: 10.3390/molecules25163714.

QIU, Z. ..; AL, Et. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its

colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. **Food Chem Toxicol**, [S. l.], v. 59, n. sep, p. 428–437, 2013.

RAIMUNDO, A.; FERREIRA, S.; TOMÁS-BARBERÁN, F.; SANTOS, C.; MENEZES, R. Urolithins: Diet-Derived Bioavailable Metabolites to. **Nutrients**, [S. l.], v. 13, p. 4285, 2021.

REUTER, S; GUPTA, S; CHATURVEDI, M; AGGARWAL, B; Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

REYES-HINOJOSA, D. et al. Toxicity of cadmium in musculoskeletal diseases. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 72, p. 103219, 2019. DOI: 10.1016/j.etap.2019.103219.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant. Sci**, [S. l.], v. 2, p. 152–159, 1997.

RÍOS, José Luis; GINER, Rosa M.; MARÍN, Marta; RECIO, M. Carmen. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. **Planta Medica**, [S. l.], v. 84, n. 15, p. 1068–1093, 2018. DOI: 10.1055/a-0633-9492.

RODRIGUEZ-PORCEL, M; CHADE, A.; MILLER, J. Studies on Atherosclerosis. **Oxidative Stress in Applied Basis Research and Clinical Practice**, [S. l.], v. 1, 2017.

ROSILLO, M. A.; SANCHEZ-HIDALGO, M.; CÁRDENO, A.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 82, n. 7, p. 737–745, 2011. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.06.043.

ROSSI, Karoline Alves; ALMENARA, Camila; SIMÕES, Rakel; MULHER, Lorraine; KRAUSE, Maiara; CARNEIRO, Maria Tereza W. D.; PADILHA, Alessandra Simão. Short-term Effects of Cadmium Exposure on Blood Pressure and Vascular Function in Wistar Rats. [S. l.], p. 2645–2656, 2024.

ROZENTSVIT, Artur; VINOKUR, Kevin; SAMUEL, Sherin; LI, Ying; GERDES, A. Martin; CARRILLO-SEPULVEDA, Maria Alicia. Ellagic Acid Reduces High Glucose-Induced Vascular Oxidative Stress Through ERK1/2/NOX4 Signaling Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 1174–1187, 2017. DOI: 10.1159/000485448. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/485448>. Acesso em: 26 jul. 2022.

RUSSEL, J. B. **Química geral**. Makron Boo ed. São Paulo.

SAHA, Piu; YEOH, Beng San; SINGH, Rajbir; CHANDRASEKAR, Bhargavi; VEMULA, Praveen Kumar; HARIBABU, Bodduluri; VIJAY-KUMAR, Matam; JALA, Venkatakrishna R. Gut Microbiota conversion of dietary ellagic acid into bioactive phytochemical urolithin A inhibits heme peroxidases. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 1–21, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0156811.

SAKURAI, Masaru et al. The relationship between the urinary cadmium concentration and cause-specific mortality in subjects without severe renal damage: A 35-year follow-up study in a cadmium-polluted area of Japan. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 18, n. 15, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18157747.

SALEM, A.; MOHAMMADEN, T.; MOHAMED, M.; MOHAMED, E.; HASAN, H. Ellagic and ferulic acids alleviate gamma radiation and aluminium chloride-induced oxidative damage. **Life Sci**, [S. l.], v. 160, p. 2–11, 2016.

SALINGER-MARTINOVIC, SONJA; COSIC, VLADAN; STOJILJKOVIC, Nenad; et al.

Impact of ellagic acid application on doxorubicin-induced cardiovascular toxicity model. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 99, n. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0404>.

SANGARTIT, Weerapon; KUKONGVIRIYAPAN, Upa; DONPUNHA, Wanida; PAKDEECHOTE, Poungrat; KUKONGVIRIYAPAN, Veerapol; SURAWATTANAWAN, Praphassorn; GREENWALD, Stephen E. Tetrahydrocurcumin protects against cadmium-induced hypertension, raised arterial stiffness and vascular remodeling in mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0114908.

SANTAMARIA-JUAREZ, Celeste et al. Aortic dysfunction by chronic cadmium exposure is linked to multiple metabolic risk factors that converge in anion superoxide production. **Archives of Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1080/13813455.2020.1726403. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1726403>.

SARKAR, S.; YADAV, P.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes: A study with relation to time. **BioMetals**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 153–157, 1998. DOI: 10.1023/A:1009286130324. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9542068/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

SATARUG, Soisungwan. Dietary Cadmium Intake and Its Effects on Kidneys. **Toxics**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 15, 2018. DOI: 10.3390/toxics6010015.

SATARUG, Soisungwan; BAKER, Jason R.; URBENJAPOL, Supanee; HASWELL-ELKINS, Melissa; REILLY, Paul E. B.; WILLIAMS, David J.; MOORE, Michael R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 137, n. 1–2, p. 65–83, 2003. DOI: 10.1016/S0378-4274(02)00381-8.

SATARUG, Soisungwan; NISHIJO, Muneko; UJJIN, Pailin; VANAVANITKUN, Yuvaree; MOORE, Michael R. Cadmium-induced nephropathy in the development of high blood pressure. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 157, n. 1, p. 57–68, 2005. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.01.004.

SATARUG, Soisungwan; VESEY, David A.; GOBE, Glenda C. Kidney Cadmium Toxicity , Diabetes and High Blood Pressure : The Perfect Storm. **Tohoku J. Exp. Med.**, [S. l.], v. 241, p. 65–87, 2017. DOI: 10.1620/tjem.241.65. Correspondence.

SAVI, Monia; BOCCHI, Leonardo; MENA, Pedro; DALL'ASTA, Margherita; CROZIER, Alan; BRIGHENTI, Furio; STILLI, Donatella; DEL RIO, Daniele. In vivo administration of urolithin A and B prevents the occurrence of cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1186/s12933-017-0561-3.

SAVIC, I. et Al. The effect of complexation with cyclodextrins on the antioxidant and antimicrobial activity of ellagic acid. **Pharmaceutical Development and Technology**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 410–418, 2019.

SCHAEFFER, Colin; GHAMMRAOUI, Bahaa; TAGUCHI, Katsuyuki; GLICK, Stephen J. Theoretical comparison and optimization of cadmium telluride and gallium arsenide photon-counting detectors for contrast-enhanced spectral mammography. [S. l.], v. 10, p. 1–13, 2023. DOI: 10.1117/1.JMI.10.S2.S22406.

SEERAM N.P., LEE R., Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomogranate (punica granatum) juice. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 348, n. 1–2, p. 63–68, 2004.

SEERAM, Navindra P.; ADAMS, Lynn S.; HENNING, Susanne M.; NIU, Yantao; ZHANG, Yanjun; NAIR, Muraleedharan G.; HEBER, David. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 360–367, 2005. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.01.006.

SELMA, María V.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, Antonio; SALAS-SALVADÓ, Jordi; ANDRÉS-LACUEVA, Cristina; ALASALVAR, Cesarettin; ÖREM, Asım; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; ESPÍN, Juan C. The gut microbiota metabolism of pomegranate or walnut ellagitannins yields two urolithin-metabotypes that correlate with cardiometabolic risk biomarkers: Comparison between normoweight, overweight-obesity and metabolic syndrome. **Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 897–905, 2018. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.03.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2017.03.012>.

SEN, Sarbattama; SIMMONS, Rebecca A. Adiposity in the Offspring of Western Diet – Fed Rats. **Diabetes**, [S. l.], v. 59, n. December, 2010. DOI: 10.2337/db10-0301.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? **Nutrients**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 2090, 2019.

SHARIAT, Seyed; RASTQAR, Ali; JABBARI, Mostafa; TAHERI, Marzieh; KESHVARI, Mahtab. Cadmium Concentration in Cigarette Brands, Tobacco Leaves, and Smokers' Blood Samples. **Herbal Medicines Journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 11–18, 2019. DOI: 10.22087/herb.

SHARIFI-RAD, Javad et al. Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2022, p. 24, 2022. DOI: 10.1155/2022/3848084. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8885183/](https://pmc/articles/PMC8885183/). Acesso em: 22 jul. 2022.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; DE PAULA, T. D.; GRANDO, M. D.; BENDHACK, L. M. Endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase are activated by hydrogen peroxide in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 814, p. 87–94, 2017. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.07.047. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.07.047>.

SITIA, S. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. **Autoimmunity Reviews**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 830–834, 2010. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.07.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2010.07.016>.

SOHRAB, Golbon; EBRAHIMOF, Samira; SOTOUDEH, Giti; NEYESTANI, Tirang Reza; ANGOORANI, Pooneh; HEDAYATI, Mehdi; SIASI, Fereidoun. Effects of pomegranate juice consumption on oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a single-blind, randomized clinical trial. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 249–255, 2017. DOI: 10.1080/09637486.2016.1229760.

SOMPAMIT, Kwanjit; KUKONGVIRIYAPAN, Upa; DONPUNHA, Wanida; NAKMAREONG, Saowanee; KUKONGVIRIYAPAN, Veerapol. Reversal of cadmium-induced vascular dysfunction and oxidative stress by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in mice. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 198, n. 1, p. 77–82, 2010. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.04.007.

SOONG, Y.-Y.; BARLOW, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. **Food Chem**, [S. l.], v. 97, p. 524–530, 2006.

SORESCU, Dan et al. Superoxide production and expression of Nox family proteins in

human atherosclerosis. **Circulation**, [S. l.], v. 105, n. 12, p. 1429–1435, 2002. DOI: 10.1161/01.CIR.0000012917.74432.66.

STAESSEN, Jan A.; ROELS, Harry A.; EMELIANOV, Dmitri; KUZNETSOVA, Tatyana; THIJS, Lutgarde; VANGRONSVELD, Jaco; FAGARD, Robert. Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. **The Lancet**, [S. l.], v. 353, n. 9159, p. 1140–1144, 1999. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)09356-8.

SYLVESTER, Anthony L.; ZHANG, David X.; RAN, Sophia; ZINKEVICH, Natalya S. Inhibiting NADPH Oxidases to Target Vascular and Other Pathologies : An Update on Recent Experimental and Clinical Studies. [S. l.], 2022.

TAI, Yu Ting; CHOU, Shing Hsien; CHENG, Chia Yun; HO, Chien Te; LIN, Hung Chen; JUNG, Shih Ming; CHU, Pao Hsien; KO, Fu Hsiang. The preferential accumulation of cadmium ions among various tissues in mice. **Toxicology Reports**, [S. l.], v. 9, n. January, p. 111–119, 2022. DOI: 10.1016/j.toxrep.2022.01.002.

TANIYAMA, Yoshihiro; GRIENDLING, Kathy K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 1075–1081, 2003. DOI: 10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F.

TARAKINA, Nadezda V.; VERBERCK, Bart. A portrait of cadmium. **Nature Chemistry**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 96–96, 2017. DOI: 10.1038/nchem.2699.

TARHONSKA, Kateryna; LESICKA, Monika; JANASIK, Beata; ROSZAK, Joanna; RESZKA, Edyta; BRAUN, Marcin; KOŁACIŃSKA-WOW, Agnieszka; JABŁOŃSKA, Ewa. Cadmium and breast cancer – Current state and research gaps in the underlying mechanisms. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 361, p. 29–42, 2022. DOI: 10.1016/j.toxlet.2022.03.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35331840/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

TCHOUNWOU, Paul B.; YEDJOU, Clement G.; PATLOLLA, Anita K.; SUTTON, Dwayne J. Molecular, clinical and environmental toxicology Volume 3: Environmental Toxicology. **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**, [S. l.], v. 101, p. 133–164, 2012. DOI: 10.1007/978-3-7643-8340-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7643-8340-4>.

TELLEZ-PLAZA, Maria; GUALLAR, Eliseo; HOWARD, Barbara V.; UMANS, Jason G.; FRANCESCONI, Kevin A.; GOESSLER, Walter; SILBERGELD, Ellen K.; DEVEREUX, Richard B.; NAVAS-ACIEN, Ana. Cadmium Exposure and Incident Cardiovascular Disease. **Epidemiology**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 421–429, 2013. DOI: 10.1097/EDE.0b013e31828b0631.

TELLEZ-PLAZA, Maria; GUALLAR, Eliseo; NAVAS-ACIEN, Ana. Environmental metals and cardiovascular disease. **The BMJ**, [S. l.], v. 362, p. k3435, 2018. DOI: 10.1136/BMJ.K3435. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6283369/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

TELLEZ-PLAZA, Maria; NAVAS-ACIEN, Ana; MENKE, Andy; CRAINICEANU, Ciprian M.; PASTOR-BARRIUOSO, Roberto; GUALLAR, Eliseo. Cadmium Exposure and All-Cause and Cardiovascular Mortality in the U.S. General Population. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 120, n. 7, p. 1017–1022, 2012. DOI: 10.1289/ehp.1104352.

THEVENOD F, Lee WK. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. **Arch Toxicol**, [S. l.], v. 87, n. 10, p. 1743–1786, [s.d.]. DOI: . <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1110-9>.

THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive Toxicology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 304–315, 2008. DOI: 10.1016/j.reprotox.2008.02.001.

TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, Antonio; GARCÍA-VILLALBA, Rocío; NÚÑEZ-SÁNCHEZ, María A.; SELMA, María V.; GARCÍA-CONESA, María T.; ESPÍN, Juan Carlos. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. **Molecular Nutrition and Food Research**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 1–35, 2017. DOI: 10.1002/mnfr.201500901.

TOUSOULIS, Dimitris; KAMPOLI, Anna-maria; TENTOLOURIS, Costas; PAPAGEORGIOU, Nikolaos. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. **Current Vascular Pharmacology**, [S. l.], v. 10, p. 4–18, 2012.

TOUYZ, Rhian M.; BRIONES, Ana M.; SEDEEK, Mona. NOX Isoforms and Reactive Oxygen Species in Vascular Health. **Molecular intervention**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 27–35, 2011.

TREVIÑO, Samuel; WAALKES, Michael P.; FLORES HERNÁNDEZ, José Angel; LEÓN-CHAVEZ, Bertha Alicia; AGUILAR-ALONSO, Patricia; BRAMBILA, Eduardo. Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 583, p. 27–35, 2015. DOI: 10.1016/j.abb.2015.07.010.

TRICOT, Olivier; MALLAT, Ziad; HEYMES, Christophe; BELMIN, Joël; LESÈCHE, Guy; TEDGUI, Alain. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. **Circulation**, [S. l.], v. 101, n. 21, p. 2450–2453, 2000. DOI: 10.1161/01.CIR.101.21.2450. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10831515/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

TRIGGLE, C. R. et al. The endothelium in health and disease-- a target for therapeutic intervention. **Journal of Smooth Muscle Research**, [S. l.], v. 69, n. 6, p. 249–267, 2003. DOI: 10.1540/jsmr.39.249.

TUBSAKUL, Akarachai; SANGARTIT, Weerapon; PAKDEECHOTE, Poungrat; KUKONGVIRIYAPAN, Veerapol; APAJIT, Kwanjit; KUKONGVIRIYAPAN, Upa. Curcumin Mitigates Hypertension, Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Rats with Chronic Exposure to Lead and Cadmium. **Tohoku J. Exp. Med.**, [S. l.], v. 253, p. 69–76, 2021. DOI: 10.1620/tjem.253.69.Correspondence.

TZOTZES, Vassilios et al. Effects of acute and chronic cadmium administration on the vascular reactivity of rat aorta. **BioMetals**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 83–91, 2007. DOI: 10.1007/s10534-006-9017-z.

VACCHI-SUZZI, Caterina; KRUSE, Danielle; HARRINGTON, James; LEVINE, Keith; MELIKER, Jaymie R. Is Urinary Cadmium a Biomarker of Long-term Exposure in Humans? A Review. **Current Environmental Health Reports**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 450–458, 2016. DOI: 10.1007/s40572-016-0107-y.

VALKO, M. MORRIS, H. CRONIN, M. T. .. An exploratory analysis of urinary organophosphate ester metabolites and oxidative stress among pregnant women in Puerto Rico. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 703, p. 1161–1208, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134798.

VELJKOVIC, Andrej R. et al. Protective effects of glutathione and lipoic acid against cadmium-induced oxidative stress in rat's kidney. **Renal Failure**, [S. l.], v. 34, n. 10, p. 1281–1287, 2012. DOI: 10.3109/0886022X.2012.723661. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23009295/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

VENKATARAMAN, Krishnan; KHURANA, Sandhya; TAI, T. C. Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 17897–17925, 2013. DOI: 10.3390/ijms140917897.

VORMITTAG, E.; OLIVEIRA, M.; GLERIANO, J. Avaliação de saúde da população de Barra Longa afetada pelo desastre de Mariana, Brasil. **Ambiente & Sociedade**, [S. l.], v. 21, 2018.

WAALKES, M. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 533, n. 1–2, p. 107–120, 2003. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.011.

WAISBERG, Michael; JOSEPH, Pius; HALE, Beverley; BEYERSMANN, Detmar. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, [S. l.], v. 192, n. 2–3, p. 95–117, 2003. DOI: 10.1016/S0300-483X(03)00305-6.

WANG, X. et Al. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes , cardiovascular disease , and cancer : systematic review and dose-response meta-analysis. **BMJ**, [S. l.], v. 349, 2014. DOI: 10.1136/bmj.g5472.

WANG, Yizi; REN, Fang; LI, Bo; SONG, Zixuan; CHEN, Peng; OUYANG, Ling. Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. **Journal of cancer**, [S. l.], v. 10, 2019. DOI: 10.7150/jca.29738.

WANG, Yudong; FANG, Jing; LEONARD, Stephen S.; KRISHNA RAO, K. Mural. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces Reactive Oxygen Species. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 36, n. 11, p. 1434–1443, 2004. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010.

WANG, Yun Kai; HONG, Ya Jun; YAO, Yong Hua; HUANG, Xiao Min; LIU, Xue Bo; ZHANG, Chun Yu; ZHANG, Lei; XU, Xiaoliang Leon. 6-shogaol protects against oxidized LDL-induced endothelial injuries by inhibiting oxidized LDL-evoked LOX-1 signaling. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/503521.

WARDHANA, Agung Satria; NIRWANA, Intan; BUDI, Hendrik Setia; SURBOYO, Meircurius Dwi Condro. Role of Hydroxyapatite and Ellagic Acid in the Osteogenesis. **European Journal of Dentistry**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 8–12, 2020. DOI: 10.1055/s-0040-1714039.

WESELER, Antje R.; BAST, Aalt. Oxidative stress and vascular function: Implications for pharmacologic treatments. **Current Hypertension Reports**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 154–161, 2010. DOI: 10.1007/S11906-010-0103-9,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20424954/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

WHO, World Health Organization. Environmental Health Criteria 134: Cadmium. **IPCS, Geneva**, [S. l.], p. 148, 1992.

WILSON, Douglas W.; NASH, Paul; SINGH, Harpal; GRIFFITHS, Keith; SINGH, Ram; DE MEESTER, Fabien; HORIUCHI, Rie; TAKAHASHI, Toru. The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: An overview. **Antioxidants**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 1–20, 2017. DOI: 10.3390/antiox6040081.

WIND, Sven et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. **Hypertension**, [S. l.], v. 56, n. 3, p. 490–497, 2010. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149187,. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20606112/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

WOLF, Matthew B.; BAYNES, John W. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. **Biomaterials**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 73–81, 2007.

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

WUFUER, Reziyamu; FAN, Zhuo; LIU, Keli; ZHANG, Yiguo. Differential yet integral contributions of Nrf1 and Nrf2 in the human HepG2 cells on antioxidant cytoprotective response against tert-butylhydroquinone as a pro-oxidative stressor. **Antioxidants**, [S. l.], v. 10, n. 10, 2021. DOI: 10.3390/antiox10101610.

WUFUER, Reziyamu; FAN, Zhuo; YUAN, Jianxin; ZHENG, Ze; HU, Shaofan; SUN, Guiyin; ZHANG, Yiguo. Distinct Roles of Nrf1 and Nrf2 in Monitoring the Reductive Stress Response to Dithiothreitol (DTT). **Antioxidants**, [S. l.], v. 11, n. 8, 2022. DOI: 10.3390/antiox11081535.

XU, Mengyang; LIU, Pei; JIA, Xiaodong; WU, Baocheng; GUO, Zhongren. Metabolic profiling revealed the organ-specific distribution differences of tannins and flavonols in pecan. [S. l.], n. June, p. 4987–5006, 2020. DOI: 10.1002/fsn3.1797.

XU, Qiuying; SHEN, Mingkan; HAN, Yuxin; DIAO, Hui. Effects of Ellagic Acid Supplementation on Jejunal Morphology, Digestive Enzyme Activities, Antioxidant Capacity, and Microbiota in Mice. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, p. 1–7, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.793576.

XUE, Jiahong; FAN, Jiali; LI, Yuan; WU, Wenhuan; YAN, Qing; ZHENG, Qiangsun. ABCG1 attenuates oxidative stress induced by H₂O₂ through the inhibition of NADPH oxidase and the upregulation of Nrf2-mediated antioxidant defense in endothelial cells. **Analytical Cellular Pathology**, [S. l.], v. 2020, p. 14–16, 2020. DOI: 10.1155/2020/2095645.

XUE, Peiyu; ZHANG, Guangjie; ZHANG, Jie; REN, Li. Synergism of ellagic acid in combination with radiotherapy and chemotherapy for cancer treatment. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 99, 2022. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.153998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35217437/>. Acesso em: 7 maio. 2025.

YAN, Jia; LI, Jingjie; ZHANG, Lei; SUN, Yu; JIANG, Jue; HUANG, Yan; XU, Hui; JIANG, Hong; HU, Rong. Nrf2 protects against acute lung injury and inflammation by modulating TLR4 and Akt signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 121, p. 78–85, 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.557. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.557>.

YANG, Chung-shi; TZOU, Bo-cheng; LIU, Yu-peng; TSAI, May-jywan; SHYUE, Song-kun. Inhibition of Cadmium-Induced Oxidative Injury in Rat Primary Astrocytes by the Addition of Antioxidants and the Reduction of Intracellular Calcium. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 834, p. 825–834, 2008. DOI: 10.1002/jcb.21452.

YOOPAN, Nattaporn; WATCHARASIT, Piyajit; WONGSAWATKUL, Orapin; PIYACHATURAWAT, Pawinee; SATAYAVIVAD, Jutamaad. Attenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 176, n. 2, p. 157–161, 2008. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.11.002.

YOUSUF, Mohd; SHAMSI, Anas; KHAN, Parvez; SHAHBAAZ, Mohd; ALAJMI, Mohamed F. Ellagic Acid Controls Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells via Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 6. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, 2020. DOI: 10.3390/ijms21103526.

YÜCE, Abdurrauf; ATE, Ahmet; OSMAN, Ali; AKSAKAL, Mesut. Ellagic Acid Prevents Cisplatin-Induced Oxidative Stress in Liver and Heart Tissue of Rats. **Basic & Clinical**

Pharmacology & Toxicology, [S. l.], v. 101, p. 345–349, 2007. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2007.00129.x.

YUNIARTI, W. ...; PRIMARIZKY, H. ...; LUKISWANTO, B. The activity of pomegranate extract standardized 40% ellagic acid during the healing process of incision wounds in albino rats (*Rattus norvegicus*). **Veterinary World**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 321–326, 2018.

ZEB, Alam. Ellagic acid in suppressing in vivo and in vitro oxidative stresses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 448, n. 1–2, p. 27–41, 2018. DOI: 10.1007/s11010-018-3310-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-018-3310-3>.

ZHANG, Xiangyu; WANG, Shilan; WU, Yujun; LIU, Xiaoyi; WANG, Junjun; HAN, Dandan. Ellagic Acid Alleviates Diquat-Induced Jejunal Oxidative Stress in C57BL/6 Mice through Activating Nrf2 Mediated Signaling Pathway. **Nutrients**, [S. l.], v. 14, n. 1103, 2022. DOI: 10.3390/nu14051103.

ZHANG, Xiaoyu et al. Cadmium contributes to cardiac metabolic disruption by activating endothelial HIF1A-GLUT1 axis. **Cellular Signalling**, [S. l.], v. 119, p. 111170, 2024. DOI: 10.1016/J.CELLSIG.2024.111170. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656824001384?via%3Dihub#b0025>. Acesso em: 27 maio. 2025.

ZHAO, Wenhua; WANG, Lixue; HALLER, Viktoria; RITSCH, Andreas. A Novel Candidate for Prevention and Treatment of Atherosclerosis: Urolithin B Decreases Lipid Plaque Deposition in apoE $-/-$ Mice and Increases Early Stages of Reverse Cholesterol Transport in ox-LDL Treated Macrophages Cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, [S. l.], v. 63, n. 10, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1002/mnfr.201800887.

ZHOU, Benhong; LI, Qiaoling; WANG, Jing; CHEN, Peng; JIANG, Shan. Ellagic acid attenuates streptozocin induced diabetic nephropathy via the regulation of oxidative stress and inflammatory signaling. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 123, p. 16–27, 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2018.10.036. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.036>.

ZHOU, Zhou et al. Cadmium Exposure is Associated with the Prevalence of Dyslipidemia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 40, n. 3–4, p. 633–643, 2016. DOI: 10.1159/000452576.

ZINKEVICH, Natalya S.; GUTTERMAN, David D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 301, n. 3, p. H647, 2011. DOI: 10.1152/AJPHEART.01271.2010. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3191081/>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ZOVICO PV, Curty VM, Leal MA, Meira EF, Dias DV, Rodrigues LC, Meyrelles SD, De Oliveira EM, Vassallo PF, Barauna VG. Effects of controlled doses of Oxyelite Pro on physical performance in rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2016 Dec 6;13:90. doi: 10.1186/s12986-016-0152-4. PMID: 27980599; PMCID: PMC5139112.

ZUCCARI, Guendalina; BALDASSARI, Sara; AILUNO, Giorgia; TURRINI, Federica; ALFEI, Silvana; CAVIGLIOLI, Gabriele. Formulation strategies to improve oral bioavailability of ellagic acid. **Applied Sciences (Switzerland)**, [S. l.], v. 10, n. 10, 2020. DOI: 10.3390/APP10103353.