UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

SAMIA HASSAN HUSEIN KANAAN

O HIDROLISADO DE QUINOA VERMELHA PROTEGE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DOS DANOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO

Uruguaiana – RS, Brasil

2025

SAMIA HASSAN HUSEIN KANAAN

O HIDROLISADO DE QUINOA VERMELHA PROTEGE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DOS DANOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profª. Drª. Giulia A. Wiggers

Co-orientação: Dr. José Eudes Gomes Pinheiro Jr

Uruguaiana – RS, Brasil

2025

K16h Kanaan, Samia
O HIDROLISADO DE QUINOA VERMELHA PROTEGE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DOS DANOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO? / Samia Kanaan.
113 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2025.
"Orientação: Giulia Peçanha".

1. Cádmio. 2. Cardiovascular. 3. Quinoa. 4. Hidrolisado. I. Título.

SAMIA HASSAN HUSEIN KANAAN

O HIDROLISADO DE QUINOA VERMELHA PROTEGE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DOS DANOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO?

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em 22 de janeiro de 2025.

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Giulia Alessandra Wiggers
Orientadora – PMPGCF / UNIPAMPA

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz
Universidade Federal de Pernambuco

"A felicidade pode ser encontrada, mesmo nas horas mais sombrias,
se a pessoa se lembrar de acender a luz."
(Alvo Dumbledore)

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação e alegria que finalizo uma etapa muito importante da minha trajetória acadêmica. De maneira alguma cheguei aqui neste momento sozinha e vou usar este espaço para agradecer de coração e alma a todos aqueles que construíram essa caminhada ao meu lado.

Sempre quis muito da vida, sempre sonhei muito e quis ser muitas e diferentes versões de mim mesma….Vulcanóloga, Arqueóloga, Geóloga, Historiadora, Advogada, Política (Cientista Social), Bióloga, até que perambulei nas opções da área da saúde e por fim me graduei em Fisioterapia. E dentro desta profissão que me apaixonei, descobri a Ciência e a docência, e pensando agora, acredito que sempre esteve dentro de mim essa gana por pesquisar e lecionar.

Desde pequena sempre me inspirei muito em meus professores, por respeitá-los como mestres, mas além disso, por valorizar a arte de transmitir conhecimento. A todos meus mestres, desde a pré-escola até hoje, minha eterna e sincera gratidão.

Sou privilegiada por adentrar os espaços que consegui alcançar, como a Universidade Federal, e mais ainda a pós-graduação, ambas de altíssima qualidade e gratuitas, e por isso sou grata a todas as oportunidades que tive.

Agradeço muitíssimo a minha família, em especial meus pais, Mabel e Hassan, por toda garra e empenho em fornecer as melhores oportunidades para mim e meus irmãos, vocês sempre buscaram oferecer para nós tudo que não tiveram acesso, melhores escolas e melhores cursos, sempre cobrando estudo e dedicação, espero retribuir de alguma forma 1% de todo suor que dedicaram a nós e ao nosso futuro.

Minha irmã Galie, fortaleza da família, sou grata eternamente pelo incentivo e apoio. Aos meus irmãos Saed e Fade, agradeço por todo companheirismo, apoio e incansável incentivo. Aos meus primos Thaer e Feras, agradeço por todo apoio e incentivo. A Aida, uma irmã de coração, serei eternamente grata por todo incentivo e apoio em momentos difíceis. A toda minha família que me apoia na Palestina, minha eterna gratidão. A minha família sangue quente uruguaia, vocês aquecem meu coração, minha eterna gratidão. Tia Lili e Tio Richard, minha eterna saudade e imensa gratidão, que falta vocês fazem! Por vocês, sempre honrarei minhas raízes e jamais esquecerei minhas origens.

Serei eternamente grata, especialmente, à minha orientadora Profa. Giulia, mulher, mãe, cientista, professora e… bom, com certeza super-mulher, pois eu não saberia descrever todas

qualidades e papéis que desempenha tão bem. És minha maior inspiração acadêmica, mas para além disso, também me incentiva a olhar o mundo com olhares diferentes, me instigando a sempre querer mais. Luta pelo que acredita, é o pilar central do GPFisCar, orientando, ensinando e apoiando todos que passam por lá. Agradeço por todos os ensinamentos, paciência, confiança, incentivo e todas as oportunidades oferecidas a mim. Espero que nossa parceria tenha mais capítulos lindos para serem contados.

Ao prof. Franck, agradeço de coração por toda inspiração e ensinamentos, pelas conversas com café ou também com vinho (rsrsrsrsrsrs). Bixo, minha visão de mundo jamais será a mesma. Muito obrigada, por tudo!

José, a ti minha eterna gratidão! Obrigada por ter me recebido tão bem no laboratório em 2019, sem dúvidas tu que plantou em mim a semente da pós-graduação e agora encarou essa caminhada como meu co-orientador. Tu és luz, carrego tudo que vivi contigo no meu coração. És amigo, companheiro e inspiração. Por onde estiver e o que precisar, pode contar comigo.

A Paola, serei eternamente grata. Obrigada por ter encarado todos desafios e perrengues ao meu lado, sempre me incentivando, sendo alegria e não me deixando desistir. Nossa parceria vai além da bancada, forjadas na resiliência da estabilização da aorta, o mundo nos espera.

Agradeço eternamente a todos que passaram e contribuíram com meu projeto no GPFisCar. Katye, obrigada por ter encarado esse desafio comigo, os domingos de pletis que o digam, tens um futuro brilhante, obrigada por me permitir te co-orientar. Nathi, Gabi, Iasmin, Jaque e Cinthya, minha eterna gratidão, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração no laboratório, jovens mulheres cientistas, voem!

Ao Prof. Dalton, o Chefe, minha eterna gratidão! Agradeço por todo incentivo, suporte, conselhos, ensinamentos e por me instigar a pensar em diferentes possibilidades, além da zona de conforto, me tornando uma cientista melhor. És uma inspiração como cientista e ser humano. Muito obrigada por tudo!

Agradeço imensamente a Profa. Marta, mulher, cientista, empresária e visionária, és inspiração, serei eternamente grata pela confiança, apoio, conselhos e oportunidades concedidas. ¡Muchísimas gracias!

Serei eternamente grata a ti Pedro! Agradeço por todo apoio, incansável incentivo e por todo carinho, tudo fica mais suportável com tua companhia. Obrigada por compreender os momentos de “alta tensão” e sempre conseguir me fazer rir, …um poeta me contou. Muito obrigada!

Agradeço imensamente a todas minhas amigas, especialmente Camila H, Camila M, Joana e Gianne, obrigada por sempre me apoiarem, pelo ombro amigo e incentivo, sem vocês essa trajetória não teria sido nem um pouco fácil. Agradeço ao casal Marina e Murilo, vizinhos de laboratório, por todo apoio, incentivo e fofoquinhas, vocês fazem toda diferença no dia a dia de experimentos, obrigada por tudo!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, aos professores, colegas e funcionários pelas oportunidades concedidas, em especial a todos aqueles que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço imensamente ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudos concedida a mim. Agradeço a Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) por todo apoio financeiro e suporte a este projeto.

Com muito amor e gratidão, meus sinceros agradecimentos a todos!

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

O HIDROLISADO DE QUINOA VERMELHA PROTEGE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DOS DANOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO?

Autor: Samia Hassan Husein Kanaan

Orientador: Profª. Drª. Giulia Alessandra Wiggers

Co-orientador: Dr. José Eudes Gomes Pinheiro Júnior

Uruguaiana, 22 de janeiro de 2025

O Cádmio (Cd) um metal pesado, não-essencial, de longa meia-vida biológica, com alta toxicidade que afeta os humanos de forma ocupacional, acidental ou através de alimentos, água, solo e ar contaminados. Estes danos especificamente no sistema cardiovascular, levam à disfunção endotelial e ao aumento da vasoconstrição mediada pelo desequilíbrio redox gerado pelo aumento do estresse oxidativo, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e aumento da expressão de marcadores inflamatórios, principalmente COX-2. Alternativas terapêuticas naturais, principalmente derivadas das plantas, que gerem o menor impacto ambiental possível e que possam ser inseridas na dieta, devem ser incentivadas para tratar os danos causados por esse metal, pois estratégias convencionais podem trazer efeitos colaterais. Um Hidrolisado de Quinoa Vermelha (RQH) obtido por hidrólise com alcalase demonstrou propriedades anti-hipertensivas e antioxidantes em ratos espontaneamente hipertensos, pode ser uma alternativa útil na prevenção de danos vasculares provocados pelo Cd, devido ao alto poder oxidativo do metal. Dessa forma, objetivou-se investigar se o RQH protege o sistema cardiovascular dos danos induzidos pela exposição a altas concentrações de Cd. Para tal, ratos *Wistar* machos (12 semanas, ± 350g) foram tratados durante 14 dias e divididos em grupos (N=10): Controle (Ct): injeções intraperitoneais (i.p.) de água destilada e água de torneira por gavagem; Cádmio (Cd): 1mg/kg/dia i.p e água de torneira por gavagem; RQH - 1g/kg/dia por gavagem e água destilada i.p; CdRQH - ambos tratamentos (CEUA/Unipampa: 010/2023). Semanalmente foram

analisados o peso corporal, consumo de água e ração e pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia caudal. Ao final do tratamento os animais foram anestesiados e eutanasiados para análise de reatividade vascular e as vias envolvidas no dano induzido por Cd em artérias mesentéricas de resistência (MRA) em miógrafo de arame e aorta em sistema de banho de órgãos; medida de Cd no sangue total por espectrometria de massa de plasma; análises bioquímicas de parâmetros de estresse oxidativo em plasma, MRA e aorta; imunofluorescência para NOX-1 e COX-2 em MRA e aorta, eNOS, p47-phox e TNF-α em aorta. Os dados foram expressos em média ± EPM, comparados por ANOVA-2v e considerado significativo os valores de $p < 0,05$. O RQH possui peptídeos com potencial poder antioxidante, anti-inflamatório e quelante; e o co-tratamento com RQH: a) impediu o aumento dos níveis de PAS aumentados pela exposição ao Cd; b) melhorou o consumo de água e ração dos animais expostos ao Cd, além de retardar a redução do peso corporal; c) reduziu em ~20% os níveis de concentração sanguínea de Cd; d) impediu o aumento da resposta contrátil em MRA e aorta dos animais expostos ao Cd; e) manteve a biodisponibilidade de NO endotelial na resposta contrátil vascular, além de manter os níveis da expressão de eNOS em aorta; f) reduziu a participação de ROS e O_2^- na vasoconstrição de ambos leitos vasculares, reduzindo a expressão de NOX-1, além da subunidade p47-phox em aorta; g) preveniu o aumento de ROS vascular, impediu o aumento de peroxidação lipídica em plasma, MRA e aorta e manteve os níveis de capacidade antioxidante total normais em MRA e aorta; h) impediu o aumento da participação na resposta contrátil e expressão de COX-2 em ambos vasos estudados, além de reduzir a expressão de TNF-α em aorta. O RQH é uma potencial alternativa dietética terapêutica nos danos induzidos pela exposição ao Cd no sistema cardiovascular com propriedades anti-hipertensivas, antioxidantes e anti-inflamatórias, conferindo proteção ao organismo frente a exposição ao Cd.

ABSTRACT

Master's dissertation

Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences

RED QUINOA HYDROLYSATE PROTECT THE CARDIOVASCULAR SYSTEM FROM DAMAGE INDUCED BY CADMIUM EXPOSURE?

Author: Samia Hassan Husein Kanaan

Advisor: Profª. Drª. Giulia Alessandra Wiggers

Co-advisor: Dr. José Eudes Gomes Pinheiro Júnior

Uruguaiana, January 22, 2025

Cadmium (Cd) is a non-essential heavy metal with a long biological half-life and high toxicity affecting humans through occupational exposure, accidental release, or consumption of contaminated food, water, soil, and air. Its toxic effects, particularly on the cardiovascular system, result in endothelial dysfunction and increased vasoconstriction mediated by redox imbalance generated by oxidative stress, reduced nitric oxide bioavailability, and elevated expression of inflammatory markers, mainly COX-2. Natural therapeutic approaches that generate the lowest possible environmental impact and can be included in the diet should be encouraged to treat the damage caused by this metal since conventional strategies can lead to side effects. A Red Quinoa Hydrolysate (RQH), obtained through hydrolysis with alcalase and exhibiting antihypertensive and antioxidant properties in spontaneously hypertensive rats, could be a valuable alternative for preventing vascular damage induced by Cd due to the metal's high oxidative power. Thus, we aim to investigate whether RQH can protect the cardiovascular system from damage caused by exposure to high concentrations of Cd. For this, male Wistar rats (12 weeks, ± 350 g) were treated for 14 days and divided into groups (N = 10): Control (Ct): intraperitoneal (i.p.) injections of distilled water and tap water by gavage; Cadmium (Cd): 1mg/kg/day i.p. and tap water by gavage; RQH - 1g/kg/day by gavage and distilled water i.p.; CdRQH - both treatments (CEUA/Unipampa: 010/2023). Weekly body weight, water and feed consumption were analyzed, and systolic blood pressure (SBP) by caudal plethysmography. At

the end of the treatment, the animals were anesthetized and euthanized to analyze vascular reactivity and the pathways involved in Cd-induced damage in mesenteric resistance arteries (MRA) using a wire myograph and in the aorta using an organ bath system. Measurement of Cd in whole blood by plasma mass spectrometry; biochemical analysis of oxidative stress parameters in plasma, MRA, and aorta; immunofluorescence for NOX-1 and COX-2 in MRA and aorta, eNOS, p47-phox and TNF-α in aorta. Data were expressed as mean±SEM, compared by ANOVA-2v, and considered significant at $p < 0.05$. RQH contains peptides with potential antioxidant, anti-inflammatory, and chelating properties. Co-treatment with RQH: a) prevented the increase in SBP levels caused by Cd exposure; b) improved water and feed consumption in animals exposed to Cd while also delaying the reduction in body weight; c) reduced blood Cd concentration by approximately 20%; d) prevented the increase in the contractile response in the MRA and aorta of animals exposed to Cd; e) maintained the bioavailability of endothelial NO in the vascular contractile response and preserved eNOS expression levels in the aorta; f) reduced the participation of ROS and O_2^- in the vasoconstriction of both vascular beds, decreasing the expression of NOX-1 and the p47-phox subunit in the aorta; g) prevented increases in vascular ROS and lipid peroxidation in plasma, MRA, and aorta, while maintaining normal total antioxidant capacity in the MRA and aorta; h) inhibited the upregulation of COX-2 and TNF-α expression in both vascular beds, thereby reducing inflammation. RQH is a potential therapeutic dietary alternative for mitigating damage induced by Cd exposure to the cardiovascular system, exhibiting antihypertensive, antioxidant, and anti-inflammatory properties that protect against Cd exposure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito dos danos induzidos no sistema cardiovascular pela exposição ao Cádmio……..... **35**

Figura 2 - Imagem representativa da planta da quinoa, destaque para as sementes da quinoa e seus principais componentes ……..... **46**

Figura 3 - Representação esquemática da obtenção do Hidrolisado de Quinoa Vermelha (RQH) através da hidrólise com Alcalase por 2h……..... **54**

Figura 4 - Gel de SDS-PAGE (18%) demonstrando a ausência de proteínas ou peptídeos grandes ……..……..... **55**

Figura 5 - Desenho experimental do protocolo de tratamento e grupos experimentais ……..…… **58**

Figura 6 - (A) média do peso corporal (g) dos animais dos grupos Controle (Control - ●), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH - ▲), expostos a $CdCl_2$ (Cd - ■) e ambos tratamento (CdRQH - ♦) nos tempos 0 (antes do tratamento), aos 7 e 14 dias. Em (B) consumo médio de líquido (mL/dia) e (C) ração (g/dia) por grupo durante todo o período de tratamento …….....…..... **67**

Figura 7 - Comportamento da pressão arterial sistólica (SBP - mmHg) durante o tratamento (dias 0, 4 e 14) nos animais dos grupos Controle (Control - ●), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH - ▲), expostos a $CdCl_2$ (Cd ■) e ambos tratamento (CdRQH - ♦) **68**

Figura 8 - Efeitos da exposição ao $CdCl_2$ e do co-tratamento com RQH na resposta vasodilatadora das artérias aorta e MRA de ratos. (A) Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) e (B) nitroprussiato de sódio (SNP) em artérias aorta e MRA respectivamente **69**

Figura 9 - Efeitos da exposição ao $CdCl_2$ e do co-tratamento com RQH na resposta vasoconstritora das artérias aorta e MRA de ratos. (A) Curva concentração-resposta para fenilefrina (Phe) em anéis de artéria aorta e (B) curva concentração-resposta à noradrenalina (NE) em anéis de artérias mesentéricas (MRA). Os grupos estão representados por Controle (Control - círculos cheios pretos ●), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH - ▲), $CdCl_2$ (Cd - quadrado rosa ■) e (CdRQH - losango azul ♦)..... **70**

Figura 10 - Efeitos do co-tratamento com RQH nos danos vasculares endoteliais provocados pela exposição ao $CdCl_2$ em aorta. Curva concentração-resposta para Phe na presença (E+, símbolos cheios) e ausência de endotélio (E-, símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais **71**

Figura 11 - Efeitos do co-tratamento com RQH sobre a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) induzida pela exposição ao $CdCl_2$ em aorta e MRA. Curva concentração-resposta para Phe em aorta (painel superior) e para NE em MRA (painel inferior) em anéis intactos (E+, símbolos cheios) e incubados com L-NAME (100μM) (LNAME, símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais **72**

Figura 12 - Efeitos do co-tratamento com RQH no aumento da participação de ROS na resposta contrátil induzida por $CdCl_2$ em aorta e MRA. Curva concentração-resposta para Phe em aorta (painel superior) e para NE em MRA (painel inferior) em anéis intactos (E+, símbolos cheios) e incubados com TIRON (1 mmol/L) (LNAME, símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais..... **73**

Figura 13 - Efeitos do co-tratamento com RQH no aumento da participação de ânion superóxido na resposta contrátil induzida pela exposição ao $CdCl_2$ em aorta e MRA. Curva concentração-resposta para Phe em aorta (painel superior) e para NE em MRA (painel inferior) em anéis intactos (E+, símbolos cheios) e incubados com superóxido dismutase (150 U/mL) (SOD, símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais……..…… **75**

Figura 14 - Efeitos do co-tratamento com RQH na expressão de marcadores de estresse oxidativo induzido por $CdCl_2$ em aorta e MRA. Imagens representativas (ampliação de 40x e brilho em 50%) da expressão de NOX-1 em aorta e MRA (secções de 14μM), P47-phox e eNOS em aorta. As imagens correspondem a mescla (MERGE) da marcação dos núcleos pela DAPI em azul e NOX-1, eNOS e P47-phox em verde……..... **76**

Figura 15 - Efeitos do co-tratamento com RQH em parâmetros de estresse oxidativo em aorta MRA e plasma. Espécies reativas de oxigênio (ROS), níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e capacidade antioxidante total (FRAP) em aorta (painel superior), MRA (painel do meio) e plasma (painel inferior) dos grupos experimentais……..…… **77**

Figura 16 - Efeitos do co-tratamento com RQH no aumento da participação de COX-2 na resposta contrátil induzida pela exposição ao $CdCl_2$ em aorta e MRA. Curva concentração-resposta para Phe em aorta (painel superior) e para NE em MRA (painel inferior) em anéis intactos (E+, símbolos cheios) e incubados com NS398 (1 μM - símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais……..... **79**

Figura 17 - Efeitos do co-tratamento com RQH na expressão de marcadores de processo inflamatório em aorta e MRA. Imagens representativas (ampliação de 40x e brilho em 50%) da expressão de COX-2 e em aorta e MRA (secções de 14μM) e TNF-α em aorta. As imagens correspondem a mescla (MERGE) da marcação dos núcleos pela DAPI em azul e COX-2 e TNF-α em verde…….....… **80**

Figura 18 - Resumo gráfico do presente estudo **95**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos que demonstram as propriedades da quinoa na forma hidrolisada in vivo e/ou in vitro……..... **49**

Tabela 2 - Peptídeos identificados nas frações menores de 3000 Da do hidrolisado de quinoa vermelha (RQH) com alcalase 2h, seus aminoácidos e efeito potencial.……..... **65**

Tabela 3 - Efeito do RQH na sensibilidade (pD2) e na resposta máxima (Rmax) a Phe a NE em anéis de artéria aorta e artérias de resistência mesentérica (MRA) de ratos expostos ao $CdCl_2$ por 14 dias……..... **81**

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**.....	**19**
1.1	**O Cádmio: Características Físico-químicas exposição e contaminação**…….	**19**
1.2	**Toxicocinética do Cd: deposição em órgãos, tecidos e vias de metabolização**…….	**24**
1.3	**Efeitos do Cd sobre o Sistema Cardiovascular** …….……	**29**
1.4	**Cd e a tríade: estresse oxidativo, inflamação e apoptose celular** ……...	**35**
1.5	**Alternativas Terapêuticas para a exposição ao Cd** ……	**39**
1.5.1	**Alimentos Funcionais e efeito sobre a intoxicação por Cd** ……	**40**
1.6	**Pseudocereais**…….	**43**
1.6.1	**Quinoa**……	**44**
1.6.2	**Hidrolisado de Quinoa** ……	**46**
1.6.2.1	**Hidrolisado de Quinoa Vermelha (RQH)**	**51**
2	**JUSTIFICATIVA**……...	**52**
3	**OBJETIVOS**……...	**53**
3.1	**Objetivo geral**…….	**53**
3.2	**Objetivos específicos**……	**53**
4	**MATERIAIS E MÉTODOS**…….	**54**
4.1	**Preparação do Hidrolisado de Quinoa Vermelha** ……....……	**54**
4.2	**4.2 Caracterização do Hidrolisado de Quinoa Vermelha**	**55**
4.2.1	**Obtenção de fração < 3000 Da e extração peptídica e preparação de análise de peptídeos** .....……...	**55**

4.2.2	**Cromatografia líquida de alta eficácia de fase reversa (RP-HPLC-MS/MS) do RQH**	**56**
4.2.3	**Identificação dos peptídeos bioativos** ……...	**56**
4.3	**Animais e desenho experimental** …….	**57**
4.4	**Medida de Pressão Arterial Sistólica** ……...	**58**
4.5	**Reatividade Vascular** ……...	**59**
4.6	**Medida de Concentração de Cádmio** …….	**60**
4.7	**Imunofluorescência** ……...	**60**
4.8	**Análises Bioquímicas de Parâmetros de Estresse Oxidativo**.....	**61**
4.9	**Expressão dos Dados e Análises Estatísticas** …….	**63**
5	**RESULTADOS** ……..……	**64**
6	**DISCUSSÃO** …….	**82**
7	**CONCLUSÃO** ……...	**96**
8	**REFERÊNCIAS**……	**97**
9	**ANEXO I - Carta de Aprovação do CEUA** ……..…..	**114**

INTRODUÇÃO

1.1 Cádmio: Características Físico-químicas, exposição e contaminação

O Cádmio, localizado no grupo 12 da tabela periódica e representado como Cd, é um metal pesado não-essencial à vida na terra, de número atômico 48, peso atômico 112,41. Foi primeiramente descrito como novo elemento em 1817, pelos alemães Karl Samuel Leberecht Hermann e Friedrich Stromeyer, quando estudavam amostras de Carbonato de Zinco ($ZnCO_3$) e observaram traços de outro elemento, o Cd (Nordberg, 2009; Cullen *et al.,* 2012; Bernhoft, 2013). O Cd apresenta densidade de 8,65g/cm³, ponto de ebulição de 767ºC, e oxida facilmente, principalmente na presença de vapor de água. É um metal de coloração branco-azulado ou "acinzentada", inodoro e pode ser encontrado com valência $^{+1}$, mas é predominante achado com valência $^{+2}$ (Hiatt *et al.,* 1975; Cullen *et al.,* 2012).

Em seu estado natural encontra-se ligado a outros elementos químicos como chumbo (Pb) e principalmente o zinco (Zn), assim como em rochas fosfatadas como as apatitas. No meio ambiente, o Cd não é encontrado livre, mas sim nas formas de minério, como greenockita (este o mais comum), haleyley, cadmoselite, otavita, monteponite e saukovita, porém essas não apresentam uma fonte significativa do metal, sua extração é majoritariamente realizada a partir do Zn (Friberg *et al.,* 1986; Peana *et al.,* 2022). Apresenta alta maleabilidade, resistência à corrosão, boa condutividade elétrica e estabilidade química, o que lhe confere característica valiosa para o uso em atividade industrial.

O Cd é encontrado na crosta terrestre em uma concentração aproximada de 0.1-0.2 ppm (partes por milhão), o que configura uma quantidade baixa quando comparado com o Zn, por exemplo, que tem uma concentração 650 vezes maior (Friberg *et al.,* 1986; Cullen *et al.,* 2012). Sua extração está diretamente relacionada a extração do Zn, para cada tonelada de minério de Zn processado, pode-se obter de 1 a 5 kg de cádmio em depósitos minerais típicos (Kim et al., 1990; Yuan *et al.,* 2019).

As fontes antropogênicas correspondem a maior parte da emissão atmosférica, e atualmente se produz cerca de 21-25.000 toneladas/ ano de Cd no mundo, e só na China este valor é de aproximadamente 7.500 toneladas/ ano (Peana *et al.*, 2022; Cullen *et al.,* 2013). O incremento da emissão de Cd foi marcada pela explosão da revolução industrial no século XVIII e pela mineração. Soma-se a isto, um crescente agravante dado pela queima de combustíveis fósseis, além de outras atividades como fundição, incineração de lixo,

utilização e descarte inadequado de produtos com Cd e outras emissões industriais (Kim et al., 1990; Yuan *et al.,* 2019; Peana *et al.*, 2022).

Atualmente uma das principais utilizações industriais do Cd é a fabricação de baterias Níquel-Cádmio, mesmo sendo uma fonte de contaminação, seu uso é continuado, a despeito do risco ambiental, devido a sua maior durabilidade nos ciclos de recargas e maior densidade energética que outras opções disponíveis no mercado (Satarug *et al.,* 2010; Friberg *et al.*, 1986; Chu *et al.,* 2022). Ainda, o Cd é utilizado na produção de tintas, onde o metal é usado como pigmento especialmente em plásticos com grande estabilidade térmica e durabilidade, todavia, o produto final se torna altamente nocivo e contaminante (Faulkner et al., 2003). Também é utilizado na indústria naval, aeronáutica e militar na galvanização e revestimentos de peças metálicas por sua propriedade anticorrosiva, (Satarug *et al.*, 2010; Peana *et al.,* 2022; Yuan *et al.,* 2019), produção de ligas metálicas como ligas de cobre e latão, além de ser utilizado em estabilizadores para plásticos à base de PVC, em células fotovoltaicas (painéis solares) e dentre outros dispositivos eletrônicos (Maani *et al.,* 2020).

Embora a maior parte da emissão deste metal provenha de fonte antropogênica, estima-se um valor aproximado de 1.400 toneladas/ ano de Cd liberado na atmosfera, através de fontes naturais, como a atividade vulcânicas, combustão de biomassas e intemperismo de material rochoso, dentre outras (Peana *et al.,* 2022; Yuan *et al.,* 2019).

As fontes de emissão naturais e principalmente antropogênicas são a causa da contaminação do meio-ambiente e humana. A contaminação de solos e águas, especialmente pelo uso de fertilizantes fosfatados ou resíduos industriais, foram identificados em culturas agrícolas, como arroz, trigo, vegetais de folha verde e tubérculos, além de frutos do mar (WHO, 2011; ATSDR, 2012; FAO/WHO, 2010). O próprio descarte inadequado de baterias e reciclagem de eletrônicos, queima de combustível e lixo são fontes de exposição humana com risco de contaminação.

A exposição humana ao Cd pode ocorrer de forma intencional por meio do tabagismo, onde pela presença de Cd na planta do tabaco devido ao uso de fertilizantes nas plantações, o ato de fumar expõe diretamente o homem ao metal e outra forma comum é a exposição ocupacional, que ocorre em ambientes de trabalho onde o cádmio é extraído, processado ou utilizado, estas são as duas formas mais diretas e de maior magnitude de exposição a este metal (Satarug *et al.,* 2010; Mérida-Ortega *et al.,* 2021).

As principais vias de absorção do Cd são o trato gastrointestinal (TGI), a pele e a via respiratória. Esta última está intimamente ligada a intoxicação e acúmulo do metal relacionado ao tabagismo. O acúmulo do metal na planta ocorre pela afinidade química do

Cd com o Zn, quando há a queima do cigarro, o Cd é liberado pela fumaça mais facilmente que outros metais presentes no tabaco. Estima-se que o fumante fique exposto a 1.7 μg de Cd por cigarro, sendo que 10% do óxido de Cd inalado da queima do cigarro é depositado nos pulmões e cerca de 40% é transportado na corrente sanguínea e pode se depositar em outros órgãos e tecidos. Estudos já demonstraram que fumantes têm 4 a 5 vezes maior concentração de Cd no sangue do que não-fumantes (Satarug *et al.,* 2004; ATSDR, 2012; Mérida-Ortega et al., 2021). Um estudo de coorte transversal realizado nos Estados Unidos, analisou amostras de mais de 34 mil pacientes, fumantes e não fumantes, eles relacionaram a concentração de cotinina no sangue (metabólito da nicotina) com os anos de tabagismo e a concentração de Cd na urina dos pacientes, e demonstraram que há relação com o aumento da concentração de Cd no sangue quanto aos anos de tabagismo e proporcionalmente é aumentado o risco de mortalidade para diferentes causas (câncer, doenças pulmonares e doenças cardiovasculares) (Kim *et al., 2*023).

Embora a via inalatória relacionada ao consumo de cigarro seja importante, o uso do Cd na indústria é um fato, e a discussão sobre as consequências de utilizá-lo e liberá-lo em grande quantidade na natureza é antiga, assim como os riscos inerentes à saúde humana. No início do século XX, por volta dos anos 1930-1940, os danos renais, pulmonares e no tecido ósseo causados pela exposição ao Cd foram reportados em trabalhadores industriais (Rani et al., 2013; Friberg *et al.,* 1986). Mais recentemente, em uma indústria de reciclagem de eletrônicos no Canadá (2023), os trabalhadores foram expostos à poeira contendo metais pesados como chumbo e Cd, principalmente aqueles que realizavam a tarefa de desmontar tubos de raios catódicos, a concentração dos metais estava em níveis mais elevados do permitido, com risco de danos renais e pulmonares a longo prazo (Gravel *et al.*, 2023). Em 2004, trabalhadores de uma fábrica de baterias níquel-Cd na China foram intoxicados com poeira de cádmio e apresentaram concentrações de Cd na urina elevados durante um período de 10 anos e sintomas de insuficiência renal (Gao *et al.,* 2016). No Brasil, também há registros de exposição ocupacional. Na Bahia, em meados da década de 80 foi detectado níveis elevados (0,074 - 2,3 μmol/L) de Cd no sangue de trabalhadores de reforma de baterias para veículos automotores (Carvalho *et al.*, 1985).

Além dos acidentes ocupacionais, os desastres ambientais colocam em risco a saúde humana em maior escala. Em meados do ano de 1910, no entanto, os danos foram relacionados com o Cd por volta de 1950, dejetos industriais de Zinco e Chumbo foram jogados no rio Jinzu, na cidade de Toyama no Japão, levando a contaminação dos alimentos, água, solo, animais e da população que foi exposta a altos níveis de Cd. Este desastre

ambiental acarretou cronicamente danos sistêmicos graves como disfunções tubulares e glomerulares, osteoporose e osteomalácia (as lesões no tecido ósseo ocorreram pela afinidade do Cd com o Cálcio), e a evolução da doença leva a intensas dores ósseas, fraturas e necessidade de acamamento dos pacientes, o que foi nominado de doença de "Itai-itai", que significa "dor nos ossos" (Nogawa *et al.,* 1983; Inaba *et al.,* 2005; Norberg, 2009; Kinuthia *et al.,* 2020). Para se ter um parâmetro da magnitude da contaminação deste evento, pesquisas da época mostraram que o solo de plantações de arroz da região afetada apresentava uma concentração de 8 mg/kg de Cd, hoje o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) considera seguro para agricultura uma concentração de no máximo 1 mg/kg (peso seco) de Cd no solo (CONAMA, 2009). Já a União Europeia (UE), considera aceitável o nível de no máximo 0,2 mg/kg de Cd no solo, enquanto a FAO/WHO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura/ Organização Mundial da Saúde) considera seguro o valor máximo de 0,07 mg/kg de Cd no solo de plantações para a viabilidade do posterior consumo humano (Kah *et al.,* 2012; Bouida *et al.,* 2022).

Outros graves desastres ambientais, envolvendo a contaminação por Cd, ocorreram mundo afora. No ano de 2012, no Rio Long - China, um acidente ambiental afetou um raio de 300 km da região, quando 21 toneladas de Cd foram despejadas no leito do rio. A agência de controle ambiental chinesa, estimou uma concentração de Cd de 80 vezes maior do que a permitida. Este acidente afetou o abastecimento de água potável da cidade de Liuzhou, além de gerar sérios danos ambientais à região, afetando negativamente a agricultura, a aquicultura e consequentemente a subsistência dos moradores ao redor (Wang *et al.,* 2024; Zhang *et al.,* 2017).

Nos anos de 2015 e 2019 no Brasil, dois acidentes ambientais de grandes proporções causaram danos catastróficos ao meio ambiente e à população das cidades de Mariana e Brumadinho em Minas Gerais. Em Mariana, a barragem de Fundão rompeu, levando rejeitos de mineração (50 milhões de m^3), composta por minérios e substâncias tóxicas, incluindo o Cd e vitimando no total 118 pessoas. A barragem que rompeu era de propriedade da empresa Samarco (Vale S/A), essa tragédia evidenciou sérias falhas de fiscalização e de monitoramento ambiental, que culminou na contaminação de cerca de 600 Km do Rio Doce, desde a barragem até a foz do rio no Espírito Santo (Freitas *et al.,* 2019; Pinheiro *et al.,* 2021).

Em Brumadinho, ocorreu o rompimento da barragem Córrego do Feijão, a lama se espalhou na extensão de 300 Km^2, afetando diretamente a cidade de Brumadinho e o Rio Paraopeba, que era fundamental para o abastecimento de água potável da região e sustento

das comunidades ribeirinhas. A lama também atingiu e prejudicou severamente áreas de preservação ambiental, como a vegetação nativa e os ecossistemas aquáticos. A tragédia vitimizou diretamente 272 pessoas, 3 destas ainda permanecem desaparecidas. A presença de metais pesados nos rejeitos da barragem, como Arsênio, Mercúrio, Ferro, Alumínio, Chumbo e o Cd contaminou a água do Rio Paraopeba em níveis superiores aos padrões de segurança do CONAMA (0,001 mg/L de Cd em águas doces), excedendo em 10 vezes e em alguns pontos do rio em até 70 vezes os valores de referência (Vergilio *et al.,* 2020; Alberto *et al.,* 2024; Freitas *et al.,* 2019; Pinheiro *et al.,* 2021). Em sedimentos também foram encontrados níveis de Cd extremamente altos em relação com os valores máximos de referência, em alguns locais de amostragem do rio e dos entornos os valores de Cd chegaram a cerca de 33 µg/g nos sedimentos da região, sendo que o PEL (níveis de efeito provável) que indica o nível máximo de uma substância no ambiente, que caso atingida, pode causar efeitos adversos à saúde humana ou ao meio ambiente, é de no máximo 3,53 µg/g de Cd nos sedimentos (Vergilio *et al.,* 2020).

Após nove anos do desastre de Mariana-MG, pesquisadores descobriram que metais pesados liberados pelos rejeitos de mineração, como o Cd, chegaram a afetar a vida marinha no litoral do Espírito Santo. A contaminação foi observada em baleias que migraram para a região, com níveis de Cd sendo detectados no organismo desses animais. Outro animal marinho afetado foram as tartarugas-cabeçudas, que apresentaram níveis elevados de Cd e outros metais pesados no plasma. Estes dados foram apresentados em um relatório anual do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA) do Espírito Santo (PMBA/ES - RA2023). Vale ressaltar, que ambos os desastres ambientais não foram incidentes pontuais, as consequências vão perdurar por anos, e aos poucos pesquisadores vão compreendendo as proporções dos danos que afetam a biodiversidade local e que reverbera por um extenso ecossistema que se conecta.

Outro desastre ambiental e também recente foram as intensas chuvas e enchentes no Rio Grande do Sul em maio e abril de 2024, segundo reportagem do veículo de notícias CNN Brasil (2024), estudos preliminares da Universidade do Rio dos Sinos (UNISINOS) indicam a presença de metais pesados como Cobre, Chumbo, Níquel e Cd em amostras de água, lama e sedimentos da Bacia do Rio dos Sinos e também de regiões urbanas da cidade de São Leopoldo-RS. Os níveis de Cd ultrapassaram valores de segurança (CONAMA) em pelo menos 1 ponto de amostra coletado em área urbana. A inundação provocou o deslocamento de resíduos industriais e agrícolas, outra fonte pode ter sido as baterias de carros submersos aumentando a liberação de cádmio e outras substâncias tóxicas na água, potencializando os

riscos de contaminação para a população local e o meio ambiente. No entanto, as coletas não foram concluídas devido a grave extensão da enchente no estado, novas coletas foram realizadas em outubro de 2024 e o estudo segue em andamento (Dayres *et al.*, 2024).

Visto que o Cd está presente no solo, água e ar, tanto de forma natural, pela ação antropogênica e também por desastres naturais, o ser humano fica exposto ao ingerir alimentos e água contaminados, inalar fumaça e está suscetível também a exposição não só de forma ocupacional, mas também acidental.

É importante ressaltar que as entidades internacionais estipularam valores de referência considerados seguros para a ingestão mensal e diária de Cd para adultos e crianças. A OMS (Organização Mundial da Saúde) e a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) estabeleceram um valor de 1 µg/Kg diário e 7 µg/Kg semanal toleráveis de exposição ao Cd (FAO/WHO, 1989). Contudo, estudos ao longo do tempo demonstram que mesmo em exposição a níveis inferiores aos valores de referência ditos seguros, podem ocasionar danos aos órgãos e tecidos (Satarug *et al.*, 2004).

Levando em consideração que a contaminação dos ecossistemas e por consequência da população humana ao Cd é inevitável, e também sabendo-se que sua meia-vida biológica é duradoura, compreender os mecanismos e a sua forma de distribuição no organismo, características estas que tornam o metal extremamente lesivo, é fundamental para que se possa pensar e testar alternativas que possam remediar esses danos. Sendo assim, será apresentado a seguir os mecanismos e distribuição da deposição do Cd no organismo.

1.2 Toxicocinética do Cd: deposição em órgãos, tecidos e vias de metabolização

Destaca-se a longa meia-vida biológica do Cd no organismo, variando entre 25-30 anos (Genchi *et al.,* 2020). Essa informação esclarece que o Cd para desintegrar metade dos seus átomos leva este longo período, favorecendo a sua acumulação progressiva no organismo e desencadeando sua ação tóxica (Bernard *et al.,* 1984). Como já citado anteriormente, o Cd tem três principais vias de absorção no organismo: via TGI, via dérmica (de menor exposição e pouca relevância na literatura) e a via inalatória/ respiratória (de maior exposição).

Dando enfoque nas duas principais vias de entrada no Cd no organismo, a absorção pela via inalatória se dá por vapores contaminados, como a fumaça de cigarro e em áreas industriais. Em algumas áreas industriais ou residenciais poluídas pela fumaça tóxica, a absorção de Cd por via inalatória pode superar a da ingestão, mesmo em não-fumantes

(Jumarie *et al.,* 2002). Foi relatado em um estudo que trabalhadores de indústria de fundição expostos por via inalatória, a principal via de absorção, onde a concentração no ar variava de 17,1 a 1530 μg/m3, níveis considerados "moderados", apresentaram concentrações elevadas de Cd na urina e danos ao sistema olfativo (Mascagni et al., 2003). Atualmente é determinado para exposição ocupacional, os níveis de Cd no ar não devem ultrapassar 0,005 mg/m3 em um turno de 8h de trabalho (OSHA, Administração de Segurança e Saúde Ocupacional - EUA, 2008).

Como mencionado no tópico anterior, a concentração de Cd no sangue de pessoas fumantes é 4-5 vezes maior do que não fumantes (Satarug *et al.,* 2004). O óxido de Cd gerado na queima do tabaco é altamente biodisponível e após a inalação do metal, a pequena quantidade que se deposita nos pulmões pode gerar processos inflamatórios, edema crônico, bronquite, enfisema pulmonar e até mesmo câncer (Ragan *et al.,* 1990; Jumarie *et al.,* 2002; Jumarie *et al.,* 2002; Satarug *et al.,* 2004; Ganguly *et al.,* 2018; Mérida-Ortega *et al.,* 2021). Outra boa parte do metal inalado atravessa a barreira epitelial pulmonar e é absorvido pelos pneumócitos do tipo II, sendo transportado pela circulação pulmonar e na sequência pela circulação sistêmica, através de sua afinidade pelas proteínas transmembranares (Jumarie *et al.,* 2002).

Pelo TGI a absorção de Cd ocorre no epitélio digestivo e varia entre 3-10% (com uma média padrão de 5%), sendo que esta absorção depende da quantidade de metal ingerida e do estado nutricional de cada indivíduo (Bishak *et al.,* 2015). Sabe-se que o Cd tem alta afinidade por grupamentos sulfidrila (-SH), em especial aqueles que têm terminação cisteína, principalmente algumas proteínas em abundância no plasma como a albumina, ou ligado a uma proteína de membrana o transportador de metal divalente 1 (DMT1) e também uma proteína importante presente em abundância no fígado, as metalotioneínas (MTs). O Cd compete com os sítios de ligação de outros minerais e metais, como o cálcio, zinco, magnésio e o ferro, alguns estudos demonstraram que a baixa ingesta de proteínas e esses componentes citados pode aumentar a absorção de Cd no organismo. Portanto, foi relacionado que a baixa ingesta de proteínas e cálcio no Japão, em meados do fim da Segunda Guerra Mundial, pode ter colaborado ainda mais para o maior acúmulo de Cd em pacientes que desenvolveram a doença de Itai-itai na época (Bernard *et al.,* 1984; Bishak *et al.,* 2015; Mudgal *et al.,* 2010).

Importante frisar que o Cd depois que é absorvido no organismo, independente da via de absorção, não é degradado, podendo permanecer no tecido sem realizar ligações ou se ligando a proteínas, competindo com outros metais essenciais, entrando na circulação

sanguínea e bioacumulando em órgãos alvo do Cd já estabelecidos na literatura, estes que serão apresentados adiante.

As MTs ganham destaque quando falamos de toxicidade do Cd, são proteínas não-enzimáticas, de baixo peso molecular (6 - 7 kDa) o que torna sua estrutura compacta e flexível, facilitando sua ligação com os outros metais e também favorece sua mobilidade através das células (Swindell *et al.,* 2011). Sua composição de aminoácidos é interessante, pois não possui aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, 33% de seus resíduos são cisteínas, essa característica contribui para a ligação do Cd com as MTs, pela sua alta afinidade com grupamentos tióis (-SH) (George *et al.,* 1976; Klaassen *et al.,* 1999). Já foram identificados quatro isoformas de MTs, a 1 e 2 são as mais expressas em diferentes tipos celulares e na maioria dos órgãos, a 3 é a mais frequente em células nervosas, como neurônios e células da glia, mas também é relatado sua presença em células de órgãos do sistema reprodutor masculino (Ebadi *et al.,* 1996). Por fim, a isoforma do tipo 4 é expressa em células do epitélio escamoso estratificado (Park *et al.,* 2001).

Pelo menos 7 íons de Cd se ligam a uma proteína MT, sendo que cada MT tem pelo menos 20 resíduos de cisteína. Essa ligação ocorre principalmente quando o Cd chega no fígado através da corrente sanguínea, estimulando a produção de MTs, formando o complexo Cd-MT. O Cd se assemelha com o zinco, atua no organismo substituindo o Zn no complexo Zn-MT, destacando que o Cd 2+ também utiliza canais de zinco, como o Zip 8 e Zip 14, para atravessar as membranas celulares, devido sua afinidade. O Cd-MT bioacumula nos hepatócitos neste formato e protege o fígado da toxicidade do metal (Fujishiro *et al.,* 2012). Uma parte do complexo Cd-MT é redistribuída gradualmente para os rins, que são um dos principais órgãos-alvo de dano do Cd. O complexo Cd-MT é clivado nas células tubulares renais e os íons Cd 2+ são finalmente excretados na urina, os responsáveis por essa dissociação são os lisossomos (esse processo é facilitado em meios ácidos com pH 3,5-4,5), presentes em todas as células eucarióticas. No entanto, a excreção diária de Cd através da urina é ínfima, levando em consideração sua longa meia-vida biológica (Klaassen *et al.,* 1999; Park *et al.,* 2001; Genchi *et al.,* 2020).

Apesar das MTs atuarem protegendo o fígado e o rim dos íons Cd^{2+} livres, esse processo de biossíntese de MTs não é suficiente para manter esses íons danosos estáveis, essas proteínas, mais especificamente seus resíduos de cisteína, também captam peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (-OH) do meio, agindo constantemente para evitar os danos do estresse oxidativo ao DNA celular, no entanto nesse processo também libera para o meio mais íons Cd (Genchi *et al.,* 2020). Um processo de exposição contínua ou aguda ao Cd,

altas ou baixas doses, culmina em desbalanço redox e por consequência desencadeia séries de respostas danosas às células e órgãos do corpo.

Como já mencionado, o fígado é o primeiro órgão que metaboliza o Cd através das MTs e também se torna um órgão suscetível à citotoxicidade do metal. Um estudo com modelo de baixa e alta dose (2,5 mg/kg e 5 mg/kg p/ três dias) de exposição ao Cd em ratos, demonstrou que em ambas doses houve um aumento significativo da ferroptose de hepatócitos, um tipo diferente de apoptose celular, caracterizada pelo desequilíbrio no metabolismo do Ferro, acompanhado do aumento dos níveis de peroxidação lipídica e desequilíbrio redox pelo aumento de espécies reativas e redução de enzimas antioxidantes, como GPX e GSH, bem como o aumento de expressão de marcadores inflamatórios como COX-2 (He *et al.,* 2022; Gu *et al.,* 2022).

Outros estudos relataram que a exposição ao Cd pode induzir no fígado aumento significativo de expressão de sinalizadores celulares como a Proteína Quinase Ativada por AMP, que pode induzir autogafia das células de maneira descontrolada e levar a apoptose celular, além da expressão de marcadores de sinalização inflamatória como NFKB (Fator Nuclear Kappa B) (Ma *et al.,* 2022). Também é relatado na literatura a relação com a exposição a baixas doses de Cd (10 mg/L de $CdCl_2$ em água de beber/ 20 semanas, em camundongos machos) com o desenvolvimento de esteatose hepática não-alcoólica (Go *et al.,* 2015).

No entanto, um dos órgãos que mais sofre com a exposição ao Cd é o rim, cerca de 30% do Cd absorvido no organismo é depositado nos túbulos renais, em especial nos túbulos proximais, estes que são essenciais para a homeostase do organismo e da função renal. O dano tubular provocado pela bioacumulação de Cd é proporcional à quantidade de Cd 2+ livre não ligados as MTs, que é diretamente proporcional com o nível de exposição ao metal que cada organismo sofre (Genchi *et al.,* 2020). Na literatura já foi demonstrado que a exposição ao Cd, em diferentes doses de exposição, causa aumento do estresse oxidativo, através da peroxidação lipídica, ferroptose, deficiência renal de ferro e poliúria e proteinúria (devido a hipertrofia causada nas células tubulares proximais) (Johri *et al.*, 2010; Ma *et al.,* 2023; Yang *et al.,* 2015). Supõe-se que a causa dos danos renais provocados pelo Cd é o estresse oxidativo/ desbalanço redox e a origem seja o aumento desenfreado da produção de espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*, ROS) (Yan *et al.,* 2021).

Outro tecido diretamente afetado pela exposição ao Cd, é o tecido ósseo, como apresentado anteriormente por exemplo, na doença de "Itai-itai" além dos danos renais, a população afetada pela doença desenvolveu osteomalácia e osteoporose, sofrendo com fortes

dores e deformações ósseas (Nordberg, 2009; Kinuthia *et al.,* 2020). A competitividade do Cd em formar ligações, competindo com elementos essenciais ao organismo, provoca a redução de absorção de vitamina D nos rins e também dificulta a absorção de Cálcio, tanto a nível intestinal como nos rins através dos túbulos proximais (Kjellström *et al.,* 1992; Genchi *et al.,* 2020).

Alguns estudos indicam que o Cd ativa osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea, levando a perda do tecido ósseo, condição compatível com a osteoporose. E em contrapartida, o Cd reduz a atividade dos osteoblastos, células responsáveis por produzir a parte orgânica da matriz óssea. Alguns estudos in vivo demonstraram que a exposição a baixas e altas doses de Cd reduziram a mineralização e densidade óssea, tornando o tecido mais suscetível a fraturas e osteoporose (Engström *et al.,* 2012; Ciosek *et al.,* 2023). Além disso, a exposição ao Cd também já foi descrita na literatura sendo capaz de induzir estresse oxidativo e dano osteoblástico que resulta em apoptose no tecido ósseo (Ma *et al.,* 2021).

Há também estudos que mostram fortes evidências que a exposição ao Cd pode causar danos ao tecido nervoso, induzindo toxicidade cerebral, disfunção neurológica, déficits cognitivos em crianças e adultos expostos (Genchi *et al.,* 2020; Arruebarrena *et al.,* 2023). A exposição ao Cd também é relacionada na literatura com a neuropatia periférica e com doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Pacini *et al.,* 2018). O Cd tem duas rotas de absorção no sistema nervoso (SN) ou se dá pela corrente sanguínea, onde ele pode danificar a barreira hematoencefálica (BHE) e se acumular no tecido, ou outra forma ainda mais direta é pela inalação, já que o sistema olfatório não tem a proteção da BHE. Como o Cd é um cátion divalente ele rapidamente se liga a transportadores de outros metais essenciais ao organismo, como cálcio e zinco, e atravessa facilmente pelas membranas celulares no SN bioacumulando e ativando cascatas inflamatórias e de estresse oxidativo (Arruebarrena *et al.,* 2023; Wen *et al.,* 2024). Um estudo do nosso grupo, demonstrou que a exposição ao Cd em ratos (1 mg/Kg/dia por 14 dias), induziu comportamento ansioso, déficits na sensibilidade térmica e motora dos animais, além de aumentar os níveis de ROS, peroxidação lipídica e reduzir a atividade de enzimas antioxidantes no corpo estriado (Pinheiro Jr. *et al.,* 2024).

Os órgãos do sistema reprodutor, tanto feminino quanto masculino, sofrem severamente com a exposição ao Cd, sendo considerados também órgãos-alvo deste metal. Estudos mostraram que o Cd pode bioacumular no endométrio, tecido que reveste

internamente o útero e de grande importância na fase gestacional, em especial em mulheres tabagistas (Rzymski *et al.,* 2014). O Cd é considerado também um potencial causador de doenças relacionadas com alterações hormonais, principalmente dependentes do estrogênio como câncer de mama, endometriose, câncer endometrial e também ocasionar abortos espontâneos. Isso pode ocorrer pelo fato do Cd também competir pelos receptores alfa e beta de estrogênio, além de estimular a produção de progesterona (Rzymski *et al.*, 2015; Nasiadek *et al.,* 2019).

Já no sistema reprodutor masculino a exposição ao Cd, tanto em baixas e altas doses está relacionado com redução da qualidade do esperma e da espermatogênese, através de atrofia, necrose e apoptose das células germinativas, redução da motilidade e mobilidade dos espermatozoides, danos na função testicular e por consequência até infertilidade (Ragan *et al.,* 1990; Bhardwaj *et al.,* 2024). Em humanos foi observado redução da qualidade seminal e aumento de estresse oxidativo, que gerou lesão ao DNA dos espermatozóides, bem como apoptose com aumento de marcadores como Caspase - 3 e Caspase - 9, importantes enzimas proteolíticas que regulam a apoptose celular (Gaëlle *et al.*, 2010). A exposição ao Cd também proporciona a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise, gerando disfunção na espermatogênese, desregularidade da puberdade e infertilidade (Artega-Silva *et al.,* 2021). Em um estudo de exposição a altas concentrações de Cd em ratos (1 mg/Kg/dia por 14 dias), foi observado severos danos ao sistema reprodutor masculino como acúmulo de Cd em testículo e epidídimo dos animais, aumentando a expressão de ROS nesses tecidos, além de reduzir a qualidade espermática e produção de espermatozóides (Pinheiro Jr. *et al.,* 2020).

Uma vez que o objeto de estudo desta dissertação é o sistema cardiovascular, a seguir um capítulo somente sobre os efeitos deste metal sobre este sistema.

1.3 Efeitos do Cd sobre o Sistema Cardiovascular

Os efeitos da exposição ao Cd sobre o sistema cardiovascular em humanos foram inicialmente pouco reportados. No entanto, desde a década de 60, estudos em ratos já associavam a exposição a este metal ao desenvolvimento de hipertensão (Schroeder *et al.,* 1964). A correlação entre exposição ao Cd e desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente hipertensão, foi sugerida em humanos em um estudo de 1966 (Carroll *et al.*, 1966). Perry *et al.* (1974), realizou um estudo com ratos durante um ano e expôs os animais a uma concentração de 1 ppm de Cd na água de beber e correlacionou altos níveis de Cd no tecido renal ao aumento dos níveis da pressão arterial sistólica.

Nas décadas subsequentes, outros estudos mais robustos com humanos foram publicados, um estudo de coorte realizado na comunidade indígena estadunidense, coletou amostras de mais de 3 mil participantes, na década de 90, eles demonstraram que quanto maior os níveis de Cd na urina dos pacientes, maiores chances do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs) como infarto, hipertensão, AVC, insuficiência cardíaca e por consequência maior o índice de mortalidade devido DCVs (Tellez-Plaza *et al.*, 2013). Em um outro estudo transversal realizado com a população francesa entre os anos de 2014 e 2016, pesquisadores constataram que há correlação positiva entre maior concentração de Cd na urina e os níveis de PA mais elevados, eles destacaram que esse aumento de PA está diretamente relacionado também com o sexo (homens apresentaram níveis de PA um pouco mais elevado que mulheres), tabagismo e função renal (Vallée *et al.*, 2020).

Uma revisão sistemática analisou estudos publicados entre os anos de 2005-2023, que associavam o risco de desenvolvimento de DCVs com os níveis de Cd no sangue e urina de pacientes, eles analisaram 26 estudos e observaram que níveis de Cd no sangue acima de 1 μg/L e na urina acima de 0,5 μg/L geram uma correlação positiva para o aumento de risco de de hipertensão, insuficiência cardíaca, doença coronariana e acidente vascular cerebral, além do aumento de mortalidade por DCVs (Verzelloni *et al.,* 2024). Um outro estudo analisou amostras de sangue de mais de 30 mil pacientes que participaram do programa NHANES (Pesquisa Nacional de Exame de Saúde e Nutrição) dos EUA, eles correlacionaram que os níveis aumentados de Cd (1.45 a 2.73 μg/L) no sangue está diretamente ligado com o aumento de risco de DCVs (Ma *et al., 2*022).

Cabe ressaltar que, a hipertensão induzida pela exposição ao Cd aguda ou cronicamente, desde sua descoberta, foi atribuída aos efeitos do metal, sobre o mau funcionamento dos rins, sobre o tecido cardíaco e vasos sanguíneos (Prozialeck *et al.*, 2008; Genchi *et al.*, 2021). Embora a exposição ao Cd mesmo em doses consideradas seguras por órgãos de saúde (~0.3 μg/L de sangue) esteja diretamente relacionada com o desenvolvimento de hipertensão arterial e DCVs (Tellez-Plaza *et al.*, 2008; ATSDR, 2012; Deering *et al.*, 2018; Lin et al., 2021), é sabido que este metal se deposita no tecido cardíaco e vascular (Messner *et al.,* 2010). O estudo de Abu-Hayyeh et al. (2001), demonstrou que há um aumento do depósito de Cd em aorta de tabagistas (7 mmol/L), principalmente na túnica média.

O Cd se difunde através de "gaps" endoteliais até a túnica média do vaso, e fica retido principalmente no tecido muscular liso. Assim, concorre pelos sítios de ligações com outros minerais essenciais e também utiliza de canais iônicos para ser transportado, como os canais

de Ca^{2+}, estes fundamentais para o músculo cardíaco e para as respostas fisiológicas dos vasos sanguíneos, desencadeando efeitos citotóxicos, estimulando a proliferação celular, modificando o perfil lipídico dos vasos, levando a aterosclerose, e ativando cascatas pró-inflamatórias (Matsuo *et al.,* 2005; Lin *et al.,* 2021).

Os efeitos cardíacos deletérios do Cd estão associados a disfunção mitocondrial que leva ao aumento de estresse oxidativo nas células musculares lisas e cardiomiócitos, aumento da proliferação fibroblástica e aumento da deposição de colágeno que leva a fibrose do miocárdio, que resulta em perda da elasticidade e em disfunção do tecido cardíaco (Lin *et al.,* 2021; Arbi *et al.,* 2021). Em animais expostos a altas e baixas doses de Cd (100 e 200 mg/ L/ dia na água de beber por 12 semanas), foi observado em tecido cardíaco aumento de necrose focal, desorganização dos sarcômeros, fibrose perivascular, aumento da apoptose de cardiomiócitos e aumentou a expressão de metaloproteinases (Chou *et al.*, 2023).

Porém, é importante destacar, que as disfunções no tecido cardíaco também podem ser resultado de disfunções vasculares no corpo, como a aorta que devido sua parede elástica exerce papel fundamental em reduzir o esforço do músculo cardíaco e de distribuição do sangue para órgãos vitais, já o aumento da PA está diretamente relacionado com o aumento da resistência vascular periférica, além dos vasos exercerem funções metabólicas e fisiológicas essenciais para a homeostase do organismo (Aires, 2018).

Quanto aos vasos sanguíneos, observa-se que a exposição ao Cd, tanto crônica quanto aguda, promove a redução de NO endotelial, que culmina em aumento da vasoconstrição arterial e por consequência retroalimenta um ciclo de estresse oxidativo e processo inflamatório no tecido (Cuypers *et al.,* 2010; Nwokocha *et al.*, 2013; Angeli *et al.*, 2013; Pinheiro Jr. *et al.*, 2020). Essa redução de NO endotelial se dá principalmente pelo aumento de ROS, através da exacerbação da atividade da NADPH oxidase, em especial de suas isoformas NOX-1 e NOX-4, mais presentes no endotélio vascular e músculo liso. O O_2^- gerado pela atividade da NADPH oxidase reage com o NO endotelial formando $ONOO^-$, uma espécie reativa altamente danosa aos vasos, em especial ao DNA celular (Lassègueb *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, foi observado que a exposição a altas doses de $CdCl_2$ em ratos machos (1 mg/Kg por dia, via intraperitoneal, por 14 dias), além de provocar hipertensão arterial, reduziu a participação de NO na resposta contrátil de artérias de resistência (MRA) e de aorta, demonstrando uma redução de sua biodisponibilidade endotelial, além de aumento da expressão de e NOX-1 e COX-2 no leito vascular (Pinheiro Jr. *et al.*, 2020).

O notório papel oxidativo do Cd e a importância da inibição da NADPH oxidase para suprimir os efeitos do metal também foi demonstrado em estudo em ratos expostos a baixas doses de $CdCl_2$ (100 ppm de Cd na água de beber por 8 semanas) e tratados com Apocinina (50 e 100 mg/Kg/ dia de Apocinina por gavagem), um antioxidante. Neste, observaram que ao inibir a NADPH oxidase nos animais expostos ao Cd, houve redução da PA, aumento de eNOS (NO sintase endotelial) e por consequência aumentou a biodisponibilidade de NO vascular, proporcionando vasodilatação (Nwokocha *et al.*, 2013). Vale destacar que um estudo mimetizando a exposição crônica humana ocupacional também demonstrou que a exposição ao Cd reduziu a biodisponibilidade de NO, aumentando a expressão de NOX-2 e gp91phox em aorta de ratos (Almenara *et al.,* 2013).

Em um estudo in vitro com células endoteliais humanas, os pesquisadores expuseram as células ao Cd (0–10mM de Cd) por 24h, e um dia antes da exposição incubaram com drogas inibidoras da NADPH oxidase (cloreto de difenilenoiodônio - DPI) e o antioxidante apocinina, a inibição dessas vias suprimiu a expressão do gene MMP-9 (metaloproteinase - 9), que desempenha papel carcinogênico, indicando que a expressão deste gene pode estar intimamente relacionado com o aumento de ROS via NADPH oxidase, além disso eles também observaram que a exposição a 10mM de Cd, aumentou a translocação da subunidade p47-phox para a membrana celular, aumentando a ativação do complexo (Lian *et al.,* 2015).

Outro dano vascular induzido pelo Cd é a aterosclerose, observada em modelo animal ApoE–/– em ratos e ratas expostos cronicamente a baixas doses de de $CdCl_2$ (100 mg/L) na água de beber por 28 ou 12 semanas dias, respectivamente. Os animais apresentaram redução na biodisponibilidade de NO, diminuição da resposta vasodilatadora na aorta, aumento do estresse oxidativo, evidenciado pelo incremento de O_2^-, H_2O_2 e $ONOO^-$ (peroxinitrito) no plasma, além de maior deposição de placas ateroscleróticas na aorta (Fernandes *et al.*, 2018). Em ratas houve aumento da expressão de marcadores inflamatórios (CD68, CD25, CD3 e Hsp60) e proteína de adesão vascular 1 (VCAM 1) em aorta (Knoflach et al., 2011).

As vias descritas acima estão envolvidas no desenvolvimento desses danos, o aumento do estresse oxidativo está diretamente relacionado com a redução da biodisponibilidade de NO, um dos fatores vasodilatadores derivados do endotélio de maior importância vascular. Além disso, o aumento de citocinas inflamatórias, favorece o aumento da vasoconstrição, podendo levar a dano no tecido vascular, danos endoteliais e por consequência aumento da PA (Satarug *et al.,* 2006; Lin *et al.,* 2021; Prozialeck *et al.,* 2008).

Ademais do estresse oxidativo, pode-se destacar que em vasos o processo inflamatório também é uma via chave dos efeitos deste metal, ainda não se sabe qual via

desencadeia a outra, porém sempre aparecem na literatura em sinergia e se sugere que grande parte de vias e cascacatas inflamatórias sejam ativadas primordialmente por ROS, que podem atuar como moléculas de sinalização. A exacerbação de respostas oxidativas e de inflamação na exposição ao Cd, pode culminar em respostas apoptóticas no tecido vascular (Prozialeck *et al.,* 2008; Lin *et al.,* 2021). Em modelo de exposição a uma baixa e alta dose (15 e 100 ppm) de Cd em água de beber por 60 dias, foi observado em aorta torácica de ratos aumento de marcadores pró-inflamatórios como VCAM-1 e de proteínas pró-apoptóticas como Bcl-2 e Bax-2 (Pérez Díaz *et al.*, 2019).

Corroborando a participação de via inflamatória nos danos induzidos pelo Cd, em exposição subcrônica ao Cd em ratos, foi demonstrado em aorta danos estruturais e funcionais nas camadas íntima e média desta artéria, associado ao aumento da expressão de moléculas de adesão celular e citocinas pró-inflamatórias, aumento de estresse oxidativo e da expressão de proteínas pró-apoptóticas, indicando morte celular nas camadas íntima e média, levando a disfunção endotelial e contribuindo para o desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão (Lin et al., 2021; Chou *et al.*, 2023). Células endoteliais humanas e derivadas do endotélio cerebral de rato foram expostas a concentração de 10 μM Cd em um estudo, eles demonstraram que logo após 2h de exposição havia níveis aumentos da expressão de VCAM-1, eles também demonstraram que nos tempos de 5, 15 e 60 minutos de exposição foi observado um aumento da expressão da fosforilação de proteínas quinases pró-inflamatórias como p38-MAPK, JNK e ERK (Park *et al.,* 2009).

Outra rota inflamatória de importância quando investigamos os danos do Cd no sistema cardiovascular, é a via das cicloxigenases, em especial do produto enzimático COX-2, que dela derivam prostaglandinas e tromboxanos com poder vasoconstritor, de agregação plaquetária, aumento de edema e desenvolvimento de aterosclerose, além de ativar respostas imunomodulatórias e apoptóticas no organismo. Alguns estudos já demonstraram em ratos, que a exposição aguda (10mM de Cd diretamente nos anéis de aorta em banho de órgãos) e subcrônica (1 mg/Kg, intraperitoneal, por 14 dias) aumentou a participação de COX-2 na resposta contrátil tanto de artéria aorta, quanto também de artéria mesentérica de resistência, além de aumentar a expressão desta enzima no leito vascular de ambas as artérias (Angeli *et al.,* 2013; Pinheiro Jr. *et al.*, 2020). Um estudo in vitro utilizando células endoteliais cerebrovasculares de camundongos, demonstrou que em uma exposição de 2 μM de Cd houve um aumento da significativo da liberação de PGE2 (prostaglandina derivada da COX-2), no entanto ao realizar a incubação de um antioxidante, N-acetilcisteína (NAC), a

atividade e expressão da PGE2 foi atenuada, sugerindo que a ativação desta cascata inflamatória pode ser via oxidante (Seok *et al.,* 2006).

Dada a suscetibilidade da população humana à contaminação por cádmio (Cd), é altamente encorajada a investigação de alternativas terapêuticas capazes de mitigar ou minimizar os danos cardiovasculares associados a essa exposição. Tais alternativas devem apresentar propriedades anti-hipertensivas, antioxidantes e anti-inflamatórias, visando agir nas principais vias de dano ativadas pelo Cd, como estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. Essas abordagens são essenciais para reduzir os impactos tóxicos e promover a proteção do sistema cardiovascular. Assim, a partir do item 1.5 abordaremos algumas das alternativas terapêuticas existentes na literatura e a proposta pelo presente estudo.

Todos esses estudos relatando que a exposição ao Cd gera danos no tecido cardíaco e vascular, trazem possíveis rotas que desencadeiam o surgimento de aterosclerose, o aumento da PA, de expressão de ROS, citocinas pró-inflamatórias e proteínas e proteases apoptóticas. No entanto, é necessário compreender de uma forma mais aprofundada os mecanismos por trás dos danos do Cd no sistema cardiovascular em diferentes doses de exposição, além de fomentar mais pesquisas que investiguem os efeitos deste metal nos vasos, para se buscar soluções mais objetivas frente aos danos.

Neste próximo capítulo abordaremos as principais vias descritas na literatura, por serem pontos chave nos danos induzidos pela exposição ao Cd no organismo, dando enfoque àquelas mais relevantes ao sistema cardiovascular e que são ativadas frente a diferentes doses, aguda ou cronicamente, de exposição ao Cd (Figura 1).

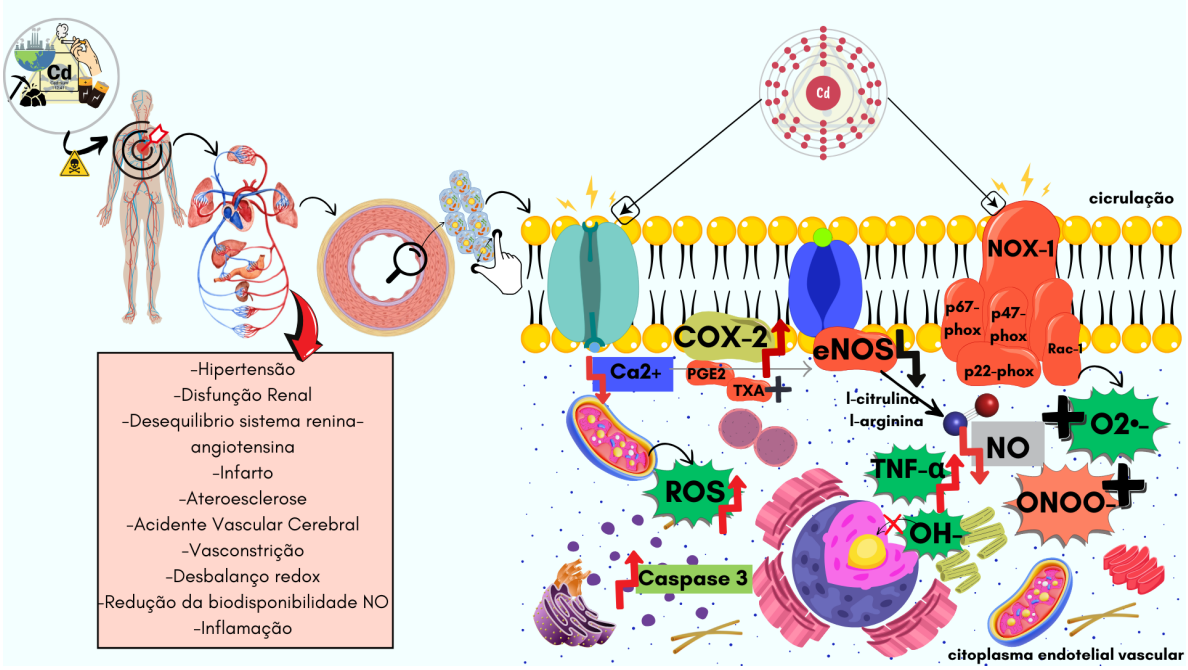

Figura 1 - Efeito dos danos induzidos no sistema cardiovascular pela exposição ao Cádmio (fonte: própria autora).

1.4 Cd e a tríade: estresse oxidativo, inflamação e apoptose celular

Com a constatação de que a exposição ao cádmio (Cd) causa danos aos tecidos, os mecanismos envolvidos na toxicidade desse metal têm sido amplamente explorados, com algumas vias moleculares sendo identificadas como cruciais para seus efeitos tóxicos, atuando de maneira independente ou inter-relacionada (Genchi *et al.,* 2020; Peana *et al.,* 2022). Neste tópico, serão exploradas as principais vias de ação deste metal, principalmente aquelas relacionadas com os efeitos no sistema cardiovascular já descritos acima.

Uma das formas de promover dano tecidual induzido pelo cádmio (Cd) é sua capacidade de competir ou antagonizar o sítio de ligação de outros elementos essenciais, como o zinco (Zn) e o cálcio (Ca), ou formar ligações com proteínas transportadoras, como a albumina e a metalotioneína, prejudicando o transporte de elementos essenciais, como o ferro (Fe) e o selênio (Se), que são essenciais na homeostase redox, na síntese de enzimas antioxidantes e no funcionamento adequado do sistema nervoso e cardiovascular (Klassen *et al.,* 1999; Park *et al,* 2001; Cullen *et al.,* 2012).

Embora se tenham evidências que a exposição ao Cd esteja relacionada a um aumento da presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos tecidos lesados pelo metal, levando a danos oxidativos nas células, o mecanismo que ativa diretamente o aumento

de estresse oxidativo ainda não é completamente conhecido (Matović *et al.*, 2011). Sugere-se que a alta afinidade do Cd aos grupamentos -SH (tióis) seja uma fonte de estresse oxidativo, pois ao formar ligações com enzimas antioxidantes do organismo como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase e Glutationa peroxidase (GPx), há redução de sua disponibilidade favorecendo o aumento do estresse oxidativo (Mężyńska *et al.*, 2018; Goyal *et al.,* 2020).

Outra forma pela qual o Cd contribui para o estresse oxidativo é aumentando os níveis de ferro livre (Fe^{2+}) no organismo, por competir pelos sítios de ligação proteicos do ferro. Esse aumento na concentração de Fe^{2+} intensifica a reação de Fenton, na qual íons Fe^{2+} reagem com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), promovendo sua decomposição em radicais hidroxila altamente reativos e gerando íons Fe^{3+} como subproduto. Deste processo ocorre a liberação de radicais -OH, que são altamente reativos e podem causar danos a lipídios, ao DNA celular, que contribuem com o surgimento de doenças como as neurodegenerativas e até mesmo câncer (Cuypers *et al.*, 2010).

Há outra via de importância pela qual há um aumento do estresse oxidativo e da produção de espécies reativas, que é pela super ativação do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases (NOX) - conhecido como NADPH oxidase, que tem grande relevância no sistema cardiovascular. A NADPH oxidase é um complexo enzimático cuja principal função é gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), em especial o ânion superóxido (O_2^-). Esse ânion pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de forma espontânea ou mediada pela superóxido dismutase (SOD), desempenhando papéis importantes na sinalização celular, defesa imunológica e regulação de processos inflamatórios (Babior *et al.,* 2004). A família NADPH oxidase (NOX) possui sete isoformas principais (NOX1–NOX5, DUOX1 e DUOX2), que podem estar localizadas tanto na membrana plasmática quanto em compartimentos intracelulares, como no retículo endoplasmático e endossomos. A NOX1, uma das isoformas mais bem caracterizadas, induzida pela subunidade gp91phox, é um complexo enzimático formado por várias subunidades, que podem ser divididas em subunidades constitutivas e subunidades reguladoras/ativadoras (Babior *et al.,* 2004; Lassègueb *et al.,* 2010; Rabêlo *et al.,* 2010)

As subunidades reguladoras (p47phox, p40phox, p67phox) são citosólicas e recrutadas para a membrana plasmática após estímulos específicos. Além disso, este complexo requer a presença de proteínas GTPases da família Rho (Rac1 ou Rac2) que atuam para a ativação funcional do complexo, promovendo interações estruturais e funcionais entre as subunidades. O complexo catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio

molecular através da membrana, formando diretamente o ânion superóxido (O_2^-). Este mecanismo é essencial para funções como na defesa imunológica, mas o desbalanço na produção de ROS pode levar a danos oxidativos e desenvolvimentos de doenças, como as DCVs (Cuypers *et al.,* 2010; Rabêlo et al, 2010; Drummond et al., 2011).

Não se sabe ao certo na literatura qual mecanismo leva ao Cd a gerar a exacerbação da atividade da NADPH oxidase, especialmente nos vasos, é sugerido que devido a presença de Cd intracelular ele gera disfunção mitocondrial, aumentando a circulação de ROS no meio, e também como dito anteriormente o Cd forma ligações com enzimas antioxidantes do organismo, permitindo que mais ROS fique livre dentro das células, desta forma acredita-se que o aumento de ROS sinalize para a ativação do complexo NADPH (Ray et al., 2005). Outra fonte que pode levar ao recrutamento exacerbado deste complexo, é a presença de proteínas quinases (pró-inflamatórias) que geram a fosforilação de subunidades, como a p47-phox, que translocam-se para a membrana e gera o complexo ativo da NADPH oxidase (Babior *et al.,* 2004; Lassègueb *et al.,* 2010; Bardbori *et al.,* 2014; Rabêlo *et al.,* 2010).

A relação entre a exposição ao Cd culminar na exacerbação da atividade do complexo da NADPH oxidase, aumenta ainda mais o estresse oxidativo e recrutamento de citocinas pró-inflamatórias a nível vascular, contribuindo intimamente para a redução da biodisponibilidade de NO endotelial, favorecendo o aumento da vasoconstrição e disfunção endotelial, aumentando a toxicidade do metal ao organismo (Mohammadi-Bardbori *et al.,* 2014; Nemmiche *et al.,* 2016; Tarafdar *et al.,* 2018; Pinheiro Jr. *et al.,* 2020). É importante salientar que na literatura as disfunções vasculares induzidas pela exposição ao Cd estão mais vinculadas ao aumento de estresse oxidativo, via aumento da expressão de ROS e redução das defesas antioxidantes. No entanto, há também relação do aumento do estresse oxidativo com a sinalização para ativação de cascatas inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias (Cuypers *et al.,* 2010; Angeli *et al.,* 2013; Pinheiro Jr. *et al.,* 2020)

Alguns autores sugerem que o aumento de ROS circulante sinaliza para ativação de fatores de transcrição como NFKB e também pode ativar a via do ácido araquidônico que culmina na ativação da COX-2 (Cuypers *et al.,* 2010; Angeli *et al.*, 2013; Pinheiro Jr. et al., 2020). A COX-2 é uma importante enzima, que sintetiza prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, em condições fisiológicas esta enzima é raramente detectada no organismo. Da COX-2 derivam prostaglandinas responsáveis por expressar os sinais clássicos de um processo inflamatório e induzir a ativação de outras vias como dos tromboxanos (TXA), responsáveis por respostas vasculares danosas, como agregação plaquetária e vasoconstrição (Olszowski *et al.,* 2012; Hossein *et al.,* 2019).

A exposição crônica ao Cd (1,2 mg/kg p/ dia de Cd por 9 semanas) aumentou significativamente a expressão de COX-2 e MTs no tecido renal de ratos machos (Morales *et al.,* 2006). Também há relatos do aumento da participação de COX-2 e de TXA-2 em respostas contráteis de artérias aorta de ratos machos, onde os anéis aórticos foram expostos a 10 μM de $CdCl_2$ diretamente, concentração semelhante de Cd encontrada em aorta de tabagistas (Abu-Hayyeh *et al.,* 2001; Angeli *et al.*, 2013).

É relatado na literatura que a exposição ao Cd, o aumento expressão de ROS e a exacerbada ativação de COX-2 também resulta na ativação de TNF-α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) uma importante citocina pró-inflamatória e que também induz a atividade de proteínas quinases ativadas por estresse como as JNK (c-Jun N-terminal quinase), estas que ativam a família das MAPK (quinases ativadas por mitógenos) que participam de inúmeras respostas celulares, regulando apoptose celular, respostas inflamatórias e expressão gênica (Rockwell *et al.*, 2004; Nemmiche *et al.,* 2016; Sharma *et al.,* 2020). Estudo *in vitro* com células de astrócitos humanos demonstrou que concentrações consideradas não-tóxicas de Cd (1-10 μM de Cd) foi capaz de induzir a expressão de IL-6 e IL-8 (citocinas que participam na resposta imune do organismo) através da fosforilação de MAPK e da ativação de NFKB (Phuagkhaopong *et al.*, 2017).

É fato que a exposição ao Cd aumenta a atividade de proteases e proteínas que regulam a morte celular, como as Caspases 3, 8 e 9 e Bcl-2, e a ativação destas está estritamente relacionada com o aumento da atividade de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e também com o aumento de expressão de COX-2. Foi observado que ratos expostos ao Cd (25 mg/kg/ dia na água de beber, por 7 dias) tiveram os níveis de TNF-α, Caspase-3, Bcl-3 e 2, COX-2 e p38-MAPK aumentados em tecido cerebral, indicando altos níveis de neurotoxicidade induzida pelo Cd (Yildiz *et al.,* 2022).

Estudo in vitro com linfócitos humanos, demonstrou que a exposição ao Cd além de gerar danos a integridade da membrana e reduzir o tamanho do núcleo das células, também aumentou significativamente a imunoreatividade de Caspase-3 no citoplasma celular (Mirkamali *et al.,* 2022). Outro estudo demonstrou que ratos expostos a 2 mg/kg/dia de $CdCl_2$ durante 3 semanas, apresentaram elevada peroxidação lipídica em tecido renal, indicando aumento de estresse oxidativo e também significativo aumento da expressão de Caspase 3 e 9, fundamentais para a execução da apoptose da célula (Huang *et al.*, 2022).

Sabe-se as possíveis vias de dano que a exposição ao Cd ativa no organismo, estas que foram apresentadas acima, outro importante fator é que este dano possa ser dose-dependente, quanto maior a dose de exposição piores serão os danos provocados no

organismo. No entanto, não se sabe ainda de forma clara se a exposição ao Cd ativa inicialmente estresse oxidativo/ ROS ou se estimula primeiro as vias inflamatórias e respostas imunes no organismo, e estas levam ao aumento de estresse ou vice-versa. O que se pode afirmar é que na presença de desbalanço redox, há ativação de cascatas inflamatórias e por consequência há um "upregulation" de marcadores apoptóticos, formando a tríade de citotoxicidade induzida pelo Cd no organismo, em especial no sistema cardiovascular.

Após compreender o potencial deletério da exposição a diferentes doses de Cd ao organismo, e em especial ao sistema cardiovascular, adentrar nos mecanismos e correlacionar as principais vias de sinalização que geram todos os efeitos danosos do Cd, possíveis estratégias terapêuticas para tratar e prevenir esses danos devem ser valorizadas. O próximo tópico irá abordar as principais terapias convencionais e justificar a necessidade de buscarmos terapias naturais que reduzam o impacto da exposição a metais tóxicos como o Cd.

1.5 Alternativas terapêuticas para a exposição ao Cd

As alternativas convencionais farmacológicas para reduzir os impactos danosos provocados pelo Cd no organismo são baseadas no uso de quelantes como o clássico EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), com a função de sequestrar íons metálicos e favorecer a excreção do metal pela urina. No entanto, o uso desta substância também age quelando metais essenciais como Zinco, Ferro e Manganês, podendo causar deficiência destes e, em alguns casos já registrados, até mesmo o surgimento de anemia (Waters *et al.,* 2001). Embora a maior parte do uso de quelantes seja isolado, um estudo clínico propôs a associação de EDTA e Glutationa, e demonstrou maior efetividade na excreção do metal do que quando isolados (Gil *et al.,* 2011). Outras alternativas de quelantes utilizados na clínica são o Dimercaprol (considerado o mais tóxico), o DMSA (ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico) e DMPS (ácido dimercapto propanosulfônico) que também são ligantes de Cd, facilitando sua excreção (Bernhoft *et al.,* 2013).

Importante salientar que o uso de quelantes é mais difundido em exposições agudas, em exposições crônicas deve-se analisar com cuidado se há ou não indicação do uso, para não ocorrer sobrecarga renal, principalmente no caso do Cd que gera danos graves aos túbulos renais, mesmo em exposições a baixas doses (Bernhoft *et al.,* 2013).

Os quelantes convencionais podem ser efetivos em excretar os metais pesados em casos de envenenamento, porém há de se considerar os riscos clínicos para cada tipo de

paciente. Já se sabe os efeitos colaterais que o uso dos quelantes pode causar, além da deficiência de minerais essenciais, dano renal, ocasionado principalmente no uso do EDTA, o Dimercaprol pode causar reações alérgicas sérias nos indivíduos que façam uso, como desconforto respiratório, febre e até mesmo lesão hepática (Kelley *et al,* 1999; Waters *et al.,* 2001; Rafati *et al.,* 2017). Embora os quelantes permaneçam na primeira escolha a despeito dos efeitos colaterais, geralmente também podem ser agregados a terapia convencional algumas substâncias antioxidantes como a vitamina C, vitamina E, NAC (N-acetilcisteína) e selênio, além do uso de corticosteróides e reposição de minerais essenciais como zinco e cálcio, que competem com o Cd, ajudando a reduzir sua absorção nos tecidos (Zhai *et al.,* 2015).

Devido aos efeitos colaterais dos tratamentos convencionais e baixo acesso pela população, por se tratar de fármacos, é importante fomentar na ciência a pesquisa por alternativas terapêuticas naturais, que possam ser inseridas na dieta da população e que sejam de fácil acesso. Por isso, tem se estudado e incentivado o uso de alimentos com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias em intoxicações por metais pesados. Uma vez que uma estratégia alimentar seja introduzida na dieta de forma suplementar, ela pode agir prevenindo e remediando os danos causados pela exposição aos metais, como o Cd, além do mais considerando que a exposição ao Cd é inerente ao ser humano.

1.5.1 Alimentos Funcionais e efeito sobre a intoxicação por Cd

Para compreender o potencial uso de alimentos como uma terapia não farmacológica para a intoxicação por metais, como o Cd, é essencial abordar alguns conceitos sobre os alimentos funcionais e suas propriedades. Este tópico abordará esses aspectos, explicando como alimentos funcionais podem oferecer benefícios à saúde além da nutrição básica, contribuindo para mitigar os danos causados por exposições tóxicas.

Hipócrates (460 - 377 a. C.), um importante médico da Grécia antiga, disse a famosa frase: *"Que seu remédio seja seu alimento, e que seu alimento seja seu remédio".* Desde então, tem se relacionado a importância de ter uma alimentação saudável, baseada em legumes, cereais, frutas e fontes de proteínas naturais para prevenir alguns tipos de doenças, inclusive as DCVs (Block *et al.,* 1992; Goran *et al.,* 2007).

O termo "alimento funcional" foi referenciado pela primeira vez no Japão em meados dos anos 80, e se referia a alimentos suplementados com probióticos, microorganismos, naturais ou processados, mas que continham em sua composição compostos biologicamente

ativos (Asgary *et al.,* 2018). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) não tem uma definição nem regulamentação para o termo "alimento funcional", mas sim para "substância bioativa", que se refere a um nutriente ou não-nutriente, que seja consumido como parte de um alimento, que tenha função metabólica ou fisiológica específica no organismo e que seja seguro de consumir sem supervisão médica (ANVISA, 2018).

Atualmente, os benefícios de um alimento funcional estão relacionados com a presença de substâncias bioativas (uma molécula específica ou peptídeos ou um composto químico) que exerça no organismo função antioxidante, antiinflamatória e/ ou imunomodulatória (Sancho *et al.,* 2016). Os alimentos funcionais podem ser classificados em três tipos: I - alimentos convencionais, que contêm naturalmente substâncias bioativas, sem sofrer alteração na sua estrutura; II - alimentos modificados, que sofreram algum processo químico de alteração de sua estrutura original, com o objetivo de potencializar suas características benéficas; III - ingredientes alimentares sintetizados, que são substâncias criadas em laboratório, como alguns carboidratos com função probiótica (Sancho *et al.,* 2016; Henry et al., 2010).

Sabe-se que há um maior fomento na indústria por suplementos alimentares com propriedades antioxidantes, uma vez que, em países desenvolvidos, cerca de ⅓ da população consome algum tipo de suplemento antioxidante (Millen *et al.,* 2004). Muito deste fenômeno é devido ao grande marketing realizado em cima do termo "alimento funcional" e há falta de regulamentação mundial para a divulgação e venda desses produtos. No entanto, deve-se estimular estudos científicos que comprovem os benefícios dos alimentos e que também descrevam seus compostos bioativos, bem como suas propriedades funcionais (Sancho *et al.,* 2016; Henry *et al.,* 2010).

Além disso, tem se discutido a importância da conscientização por dietas alimentares saudáveis, funcionais e sustentáveis, minimizando o impacto ambiental, ajudando na preservação da biodiversidade e no equilíbrio ecológico global (Lynch *et al.,* 2018; Wolk *et al.,* 2016). Sabe-se que em termos populacionais e ambientais, aumentar o consumo de proteína vegetal e reduzir o consumo de proteína animal é mais sustentável, uma vez que além do impacto ambiental negativo (elevada emissão de gases tóxicos, alto uso de água potável e desmatamento de vegetações nativas) a produção de proteína animal, principalmente a ultra-processada, também está relacionada diretamente com o surgimento de doenças crônicas como câncer, diabetes e DCVs (Bouvard *et al.,* 2015; Lynch *et al.,* 2018; Wolk *et al.,* 2016; Soret *et al.,* 2014).

Os efeitos benéficos do uso de alternativas terapêuticas derivadas de plantas aos danos induzidos por metais pesados, incluindo do Cd, em diferentes sistemas e tecidos do organismo, foi atribuído em parte a presença de compostos fenólicos, que são estruturas que tem na sua composição anéis aromáticos e hidroxilas, esta característica confere a este composto poder antioxidante e antiinflamatório (Yahia *et al.,* 2019).

A terapia com óleo essencial de sementes de Endro (5 mg/kg/dia de $CdCl_2$ por 30 dias) demonstrou efeitos protetores contra os danos induzidos pelo cádmio. Esse tratamento reduziu a perda de peso corporal, diminuiu a deposição hepática de Cd e melhorou indicadores de peroxidação lipídica, capacidade antioxidante e marcadores inflamatórios no fígado, rim e cérebro de camundongos (Negin et al., 2020). Além disso, o uso de extrato de gengibre seco (*Zingiber officinale*) foi avaliado em um modelo de intoxicação por Cd (3 mg/kg/dia de $CdCl_2$ por 28 dias) em ratos machos. O tratamento com gengibre, administrado oralmente, foi eficaz em mitigar os efeitos deletérios do Cd, reduzindo os níveis de peroxidação lipídica em testículo e rim, prevenindo a perda de peso dos órgãos e promovendo a recuperação de parâmetros hematológicos prejudicados (Onwuka *et al.,* 2011).

No tecido cardiovascular, diversos tratamentos mostraram efeitos protetores significativos contra os danos induzidos pela exposição ao cádmio (Cd) envolvendo melhora na atividade antioxidante de diferentes substâncias. O tratamento com tetrahidrocurcumina (THU), um derivado bioativo da curcumina, demonstrou benefícios em ratos expostos cronicamente a 100 mg/L de $CdCl_2$ na água de beber por 28 dias. Observou-se uma redução significativa na pressão arterial, melhora das respostas vasculares e na integridade estrutural da aorta, com destaque para a normalização da deposição de colágeno e elastina. Além disso, o tratamento aumentou a atividade antioxidante da glutationa nos tecidos e reduziu as concentrações de Cd no sangue, aorta, rim, fígado e coração (Sangartit *et al.*, 2014).

O uso de extrato de cebola também demonstrou eficácia no sistema cardiovascular em um modelo de exposição ao Cd (1 mg/kg/dia de $CdCl_2$, por injeções subcutâneas durante 30 dias). Esse tratamento reduziu os níveis de peroxidação lipídica e preveniu a diminuição de enzimas antioxidantes importantes, como SOD, catalase, GSH e GPx, além de inibir a apoptose de cardiomiócitos, protegendo a estrutura e a funcionalidade do tecido cardíaco (Alpsoy *et al.*, 2014). Há também um estudo demonstrando que o uso do extrato de folhas de Curry (*Murraya koenigii*) em um modelo de exposição a baixas doses de Cd (0,44 mg/Kg de $CdCl_2$, via subcutânea, em dias alternados com o extrato, por 15 dias), o tratamento demonstrou redução da concentração de Cd no tecido cardíaco, redução dos níveis de LDH1

(isoenzima da lactato desidrogenase) e SGOT (transaminase glutâmico-oxalacética sérica), demonstrando proteção do tecido cardíaco e hepático, além de reduzir os níveis de peroxidação lipídica e de proteínas carboniladas no coração de ratos machos e melhorar as respostas enzimáticas antioxidantes (Mitra *et al.,* 2012).

Devido o potencial benéfico de alimentos funcionais e substâncias bioativas derivadas das plantas (plant-based), deve-se incentivar as pesquisas e o consumo de alimentos funcionais, que tenham benefícios fisiológicos a longo prazo e que sejam sustentáveis ao meio ambiente, em todas suas etapas de produção.

1.6 Pseudocereais

É importante destacar que há necessidade em termos globais de buscar alternativas alimentares para suprir a brecha entre o crescimento populacional e o acesso a alimentos que forneçam os nutrientes e proteínas necessários para os seres humanos se manterem saudáveis e que também consigam ser acessíveis para a toda a população (Mir *et al.,* 2018). Dados atualizados das Nações Unidas indicam que até 2080 a população mundial vai atingir um pico de aproximadamente 10,3 bilhões de pessoas no mundo, e é necessário buscar alternativas para se obter segurança alimentar no futuro (Nações Unidas - World Population Prospects 2024). Os alimentos considerados "sub-explorados" podem ser uma boa opção para atender esta necessidade emergente global, estes são alimentos que faziam parte de diferentes dietas e culturas antes da virada do milênio, e após foram substituídos por outros tipos de alimentos produzidos em alta escala (Mir *et al.,* 2018; Nandan *et al.,* 2024).

Um grupo de alimentos considerados subexplorados são os pseudocereais, eles têm um alto valor nutricional e potencial uso de forma funcional para a população por apresentarem componentes bioativos, no entanto, não são amplamente comercializados no mundo (Morales *et al.,* 2020; Nandan *et al.*, 2024). Na botânica, os pseudocereais são consideradas plantas dicotiledôneas, não gramíneas, diferentes dos cereais que são gramíneas, e apresentam características semelhantes aos cereais como o tipo de uso, palatabilidade, quantidade de amido e de outros nutrientes (Morales *et al.,* 2020).

Além dos valores nutricionais, esses alimentos possuem alta adaptabilidade a diferentes tipos de solo e clima, além de demandarem baixos volumes de água e pouco uso de fertilizantes para sua produção, conferindo a essa classe de alimentos um caráter sustentável e ambientalmente vantajoso. Os pseudocereais são alimentos ricos em proteínas e lipídios, apresentando menor teor de carboidratos/ açúcares que os cereais como o trigo e

o arroz. Eles também são livres de glúten, atendendo a demanda de pessoas com doença celíaca no mundo (Mir *et al.,* 2018; Pirzadah *et al.,* 2020). Apresentam uma abundância de substâncias bioativas, são ricos em fibras, flavonóides e polifenóis antioxidantes, ácidos graxos insaturadas, saponinas, minerais (zinco, cálcio e ferro), vitaminas e proteínas que apresentam cadeias de aminoácidos com alta biodisponibilidade e ricas em macronutrientes (Martínez-Villaluenga *et al.,* 2020).

O consumo de alimentos do grupo dos pseudocereais podem trazer benefícios significativos para a saúde devido às suas propriedades anti-hipertensivas, hipolipidêmicas, antidiabéticas, antioxidantes e anti-inflamatórias, já demonstrados na literatura (Martínez-Villaluenga *et al.,* 2020; Morales *et al.,* 2020; Pirzadah *et al.,* 2020).

Os maiores representantes desse grupo de alimentos são a Quinoa (*Chenopodium quinoa*), o Amaranto (*Amaranthus spp*), o Trigo Sarraceno (*Fagopyrum spp.*) e a Chia (*Salvia hispanica*). Antes da conquista espanhola nos povos andinos, as civilizações Maia, inca e Asteca eram grandes produtores e consumidores destes cereais, e após a colonização passaram a produzir e consumir trigo e arroz, e hoje em dia a produção é em menor escala. No entanto, com a redescoberta dos benefícios e os estudos indicando as propriedades benéficas desses alimentos, países como Japão, e até mesmo o Brasil, passaram a produzir e comercializar esses grãos (Mir *et al.,* 2018; Arcaro *et al.,* 2022).

1.6.1 Quinoa

A quinoa (*Chenopodium quinoa*) é um dos principais representantes dos pseudocereais, especialmente na América Latina. Cultivada há mais de cinco mil anos nos Andes, destaca-se em países como Bolívia, Peru e Equador, sendo que seu cultivo também tem se expandido recentemente para regiões como Argentina, Colômbia, Chile e Brasil. Essa planta se caracteriza pela notável resistência a diversos estresses abióticos, incluindo salinidade, temperaturas extremas, secas e solos pobres em nutrientes (Dakhili *et al*., 2019; Angeli *et al.*, 2020). Nos últimos anos, o interesse global pela quinoa cresceu devido aos seus benefícios para a saúde e às suas excelentes características agronômicas. Isso impulsionou sua produção, comercialização e consumo além da América do Sul, alcançando mercados na Europa, América do Norte, Ásia, África e Oriente Médio (Guo *et al.*, 2020).

Existem cerca de 250 variedades de quinoa catalogadas, porém para o consumidor final, geralmente, são categorizadas em quinoa branca, preta ou vermelha. Os grãos de

quinoa, com algumas diferenças entre as variedades, mas no geral são ricos em nutrientes, com uma gama de aminoácidos, entre eles lisina, cisteína e triptofano, que são considerados essenciais para a homeostase do organismo, bem como minerais, vitaminas, fibras e compostos antioxidantes (Figura 2) (Kozioł *et al.*, 1992; Dakhili *et al.,* 2019).

Na composição de seus nutrientes para melhor compreender seus efeitos benéficos, observamos que a quinoa é composta por 14% de proteínas em seu peso seco, desses, cerca de 44% são albuminas e 66% globulinas (Angeli *et al.*, 2020; Niro *et al.*, 2019). Essas características também configuram a quinoa o fato dela ser livre de glúten, o que beneficia uma grande parte da população que é celíaca, só no Brasil a Fenacelbra (Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil) estima que haja 2 milhões de celíacos no país, e destes a maioria não tem diagnóstico (Fenacelbra, 2016; Bastos *et al.,* 2016). Os carboidratos/ hidratos de carbono, constituem cerca de 60-80% do peso seco na quinoa, e destes cerca de 40% é o amido, uma boa fonte de energia, além de 20% de fibra dietética, em uma proporção de cerca de 14% (insolúveis) e 6% (solúveis) de seu peso seco, esses valores configuram a quinoa vantagens sobre os cereais convencionais (Figura 2) (Niro *et al.*, 2019; Angeli *et al.*, 2020; Martínez-Villaluenga *et al.*, 2020; Moreno *et al.*, 2022).

Ademais, apresenta um conteúdo lipídico de cerca de 6% do seu peso seco, também apresenta um alto teor de ácidos graxos insaturados. Porém, estudos in vitro em modelo celular de obesidade utilizando quinoa na forma hidrolisada apontam seu poder anti-adipogênico com potente inibição de acumulação lipídica, inibição da ECA, ação antioxidantes e anti-trombóticas (Shi *et al.*, 2019).

Vitaminas e minerais também compõem o quadro de nutrientes da quinoa. Ela é rica em ferro, zinco, magnésio, cobre, potássio, cálcio e fósforo. E as principais vitaminas identificadas na sua composição são: Vitamina E, Vitamina C, Vitamina B1, 2 e 9 (Angeli *et al.*, 2020; Moreno *et al.*, 2022). Também já foram identificados na composição da quinoa compostos fenólicos, saponinas e flavonóides, estes que configuram a quinoa capacidade antioxidante que tem sido explorada em diversos estudos (Figura 2) (Moreno *et al.*, 2022; Morales *et al.*, 2020; Mudgil *et al*., 2020).

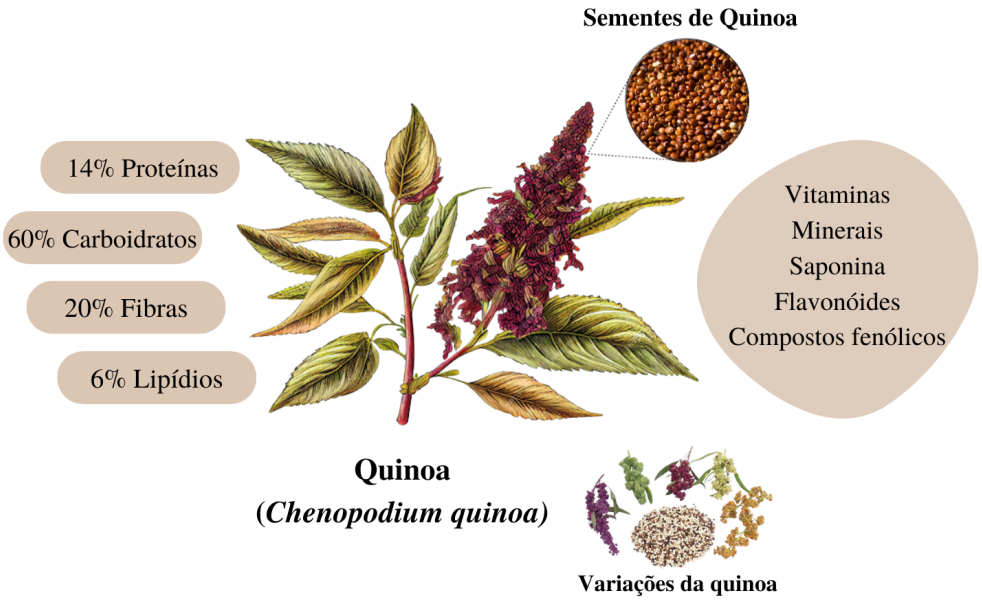

Figura 2 - Imagem representativa da planta da quinoa, destaque para as sementes da quinoa e seus principais componentes (fonte: própria autora).

1.6.2 Quinoa Hidrolisada

O processo de hidrólise de um alimento, em particular das proteínas que compõem esse alimento, agregam benefícios nutricionais e fisiológicos ao organismo, melhorando a digestibilidade e potencializando suas propriedades funcionais. Ao realizar a hidrólise das proteínas presentes no alimento, seus efeitos bioativos podem ser potencializados quando as proteínas estão acompanhadas de outros elementos como açúcares e outros aminoácidos, também há relatos que a proteína hidrolisada pode ter maior potencial antioxidante do que proteínas purificadas e/ ou isoladas (Morales *et al.*, 2020; Hajfathalian *et al.,* 2017).

Ao realizar o processo de hidrólise enzimática, em grãos de quinoa, por adquirir um menor peso molecular, ocorre um aumento da digestibilidade e absorção intestinal dos peptídeos entregues ao organismo, com isso há uma potencialização dos efeitos benéficos já demonstrados no alimento "puro" e pode conferir ao alimento outros efeitos positivos (Guo *et al., 2*020). Foi observado em um estudo que ao realizar a hidrólise da quinoa com Alcalase, os peptídeos de menor peso molecular apresentaram ação de "scavenger" de radicais livres e ação inibidora da ECA (Aluko *et al*., 2003).

O processo de hidrólise da quinoa com as enzimas Bromelaína, Quimotripsina e Pronase E, demonstrou propriedades antidiabéticas, ao inibir a ação de marcadores de diabetes como o dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) e a Alfa-glucosidase (AG) e também foi capaz de se obter efeitos anti-hipertensivos através do poder inibitório da ECA (Mudgil *et al.*, 2020; Vilcacundo *et al.*, 2017). Em um estudo utilizando quinoa hidrolisada com Alcalase e Tripsina, ao isolaram peptídeos bioativos derivados exclusivamente da albumina da quinoa, observaram que algumas sequências peptídicas apresentaram poder inibitório da ECA e alto poder antioxidante, reforçando que a quinoa hidrolisada é um potencial anti-hipertensivo e antioxidante (Zheng *et al.*, 2019).

Ao ofertar a animais espontaneamente hipertensos (SHR) a proteína da quinoa hidrolisada com pepsina, pesquisadores observaram redução da PA sistólica e diastólica, eles também realizaram a digestão gastrointestinal simulada da quinoa e obtiveram potenciais peptídeos com função inibidora da ECA, corroborando com os achados de outros estudos que indicam o potencial anti-hipertensivo da quinoa hidrolisada (Guo *et al., 2*020). Em um estudo realizado in vitro com células de câncer de cólon (Caco-2 cells), foi testado os benefícios da proteína de sementes de quinoa hidrolisada com tripsina, eles identificaram peptídeos com potencial anticancerígenos (FHPFPR, NWFPLPR e HYNPYFPG), além de demonstrarem a redução na expressão proteica de marcadores inflamatórios como NFKB, IL-6 e IL-8 e marcadores de apoptose programada Bcl-2 e Caspase-3 (Fan et al., 2022).

Também foi identificado o potencial anti-hipercolesterolêmico da proteína da quinoa hidrolisada com quimotripsina, protease e bromelaína, as sequências peptídicas QHPHGLGALCAAPPST, HVQGHPALPGVPAHW e ASNLDNPSPEGTVM foram identificadas como potenciais inibidoras do colesterol esterase e FSAGGLP, QHPHGLGALCAAPPST, KIVLDSDDPLFGGF e MFVPVPH foram identificados com poder inibitório da lipase pancreática (Ajayi *et al.,* 2023). Em outro estudo in vitro (3T3-L1 cells - pré-adipócitos) foi observado o poder anti-adipogênico das sementes da quinoa hidrolisada com papaína, pepsina e pancreatina, demonstrando alto poder anti-inflamatório, além de inibir o acúmulo lipídico celular, a caracterização peptídica dos hidrolisados também constatou que o hidrolisado da quinoa com pepsina apresentou sequências peptídicas com poder inibitório da ECA, antioxidante e anti-trombótica (Shi *et al.,* 2019). Todos estes estudos citados demonstraram o potencial da quinoa na forma hidrolisada como um alimento funcional terapêutico.

Como comentado, a quinoa é um pseudocereal de baixo custo, fácil acesso, alta adaptabilidade a diferentes climas e solos e altamente nutritiva. Apesar de muitos estudos

acusarem o potencial benéfico da quinoa na forma hidrolisada, a literatura ainda carece de mais análises a respeito. Portanto, deve-se incentivar mais pesquisas com este alimento, para compreender melhor os mecanismos de ação e todos os benefícios que esse alimento pode oferecer à população.

Tabela 1 – Estudos que demonstram as propriedades da quinoa na forma hidrolisada in vivo e/ou in vitro.

APRESENTAÇÃO DA QUINOA	MODELO / DOSE/TEMPO	EFEITOS	REFERÊNCIA
Quinoa Vermelha Hidrolisada (QrH) com Alcalase p/ 2h	Ratos SHR QrH 1000 mg/ Kg/ dia/ água de beber/ por 8 semanas	Anti-hipertensivo Antioxidante	Moreno *et al.,* 2023
Quinoa Hidrolisada (QH) com Alcalase p/ 1h	Camundongos fêmea prenhas (modelo mimético de diabetes mellitus) QH 500 mg/Kg p/ dia na água de beber/ por 4 semanas	Peptídeo com potencial bioativo: FHPFPR Redução peso fetal Redução de Triglicerídeos hepáticos Antidiabetogênicos	Busso *et al.,* 2023
Quinoa Hidrolisada com quimotripsina, protease e bromelaína	In vitro - caracterização peptídica em 3D	Peptídeos bioativos: QHPHGLGALCAAPPST e HVQGHPALPGVPAHW Inibição lipase pancreática Inibição da colesterol esterase	Ajayi *et al.,* 2023
Proteína isolada da semente da Quinoa Hidrolisada com tripsina (QHp) e pepsina	Camundongos (AOM/DSS) - Modelo de CRC QHp e QH 100 e 400 mg/ Kg/ dia por gavagem/ por 8 semanas	Melhora na disbiose intestinal; Anti-câncer	Fan *et al.,* 2023
Proteína isolada da semente da quinoa Hidrolisada com tripsina (QHp)	In vitro – células Caco-2 1–8 g/L de QHp	Peptídeos com potencial anticâncer (FHPFPR, NWFPLPR e HYNPYFPG) Redução da expressão de marcadores inflamatórios (NFKB, IL-6 e IL-8)	Fan *et al.,* 2022
Quinoa, germinada e não-germinada, Hidrolisada por digestão gástrica simulada com Pepsina e Pancreatina	In vitro - caracterização peptídica a partir de hidrólise gástrica simulada	Inibição da α-glucosidase Antidiabetogênico	Salami *et al., 2*022
Saponina hidrolisada de extrato de Quinoa Vermelha (HQE) com pepsina e pancreatina	In vitro - digestão gastrointestinal simulada	Antidiabetogênico Antiobesogênico Inibição da lipase pancreática Redução de colesterol bioacessível	Navarro *et al.,* 2021
Quinoa hidrolisada por digestão gástrica simulada com pancreatina e pepsina (QHP)	Ratos SHR QHP 100, 200 e 400 mg/Kg via oral/ por 8h e 5 semanasn In vitro – caracterização peptídica in sílica e simulação da digestão gastrointestinal	Anti-hipertensivo Peptídeos FHPFPR, NWFPLPR e NIFRPF alta capacidade inibitória da ECA	Guo *et al.,* 2020

Quinoa Hidrolisada com quimotripsina, bromelina protease E p/ 6h	In vitro Caracterização peptídica	Capacidade anti-diabetogênica Inibição da ECA	Mudgil *et al.,* 2020
Quinoa Hidrolisada com pepsina, papaína e pancreatina	In vitro – células 3T3-L1 pré-adipócitos; Caracterização peptídica	Anti-adipogênico Anti-inflamatório Peptídeos com potencial inibitório da ECA Antioxidante Anti-trombóticos	Shi *et al.,* 2019
Albumina Hidrolisada do farelo de Quinoa (QBAH) com Alcalase (1h) e Tripsina (30 min)	In vitro - caracterização peptídica Ratos SHR QBAH 50 - 150 mg/ Kg/ via oral/ por 5 semanas	Peptídeos inibidores da ECA (RGQVIYVL) Peptídeo antioxidante (ASPKPSSA e QFLLAGR) Anti-hipertensivo	Zheng *et al.*, 2019
Hidrolisado de proteína de Iogurte de Quinoa	In vitro Caracterização peptídica	Peptídeos com poder inibitório da ECA e Alfa-glucosidase (AG)	Obaroakpo *et al.*, 2019
Proteína da Quinoa branca, preta e vermelha hidrolisada com pepsina	In vitro - digestão gastrointestinal simulada com pepsinaa In vivo – Zebrafish/ 2 mg/mL /por 4h	Antioxidante	Piñuel *et al.,* 2019
Quinoa hidrolisada por digestão gástrica simulada com pancreatina	In vitro - digestão gastrointestinal simulada	Peptídeos Antidiabetogênico	Vilcacundo *et al.*, 2017
Proteína de Quinoa concentrada e hidrolisada por digestão gástrica simulada com pepsina	In vivo – Zebrafish QPC 1.25, 2.5 e 5 mg/mL /por 48h	Antioxidante Inibição da peroxidação lipídica em larvas de Zebrafish	Vilcacundo *et al.*, 2017
Quinoa Hidrolisada com papaína (QHp)	In vitro	Antioxidante, Alta capacidade inibitória da dipeptidil peptidase IV (DPP-IV)	Nongonierma *et al.,* 2015
Quinoa Hidrolisada com Alcalase p/ 4h	In vitro Caracterização peptídeos funcionais	Atividade inibitória da ECA Antioxidante	Aluko *et al.*, 2003

1.6.2.1 Hidrolisado de Quinoa Vermelha (RQH)

Moreno *et al.* (2022), realizou testes com quinoa branca, preta e vermelha, hidrolisadas com diferentes enzimas (Promod, Pepsina, Alcalase e Flavorpro) e em diferentes tempos de hidrólise (1, 2, 4, 6 e 24h). Os melhores resultados a partir de testes de odor, sensorial e palatabilidade, que foram realizados por uma banca de avaliação interna do Instituto de Pesquisa em Ciências da Alimentação (CIAL - Espanha), foram do RQH com Alcalase 2.4 LFG por 2h.

Ao testar *in vitro* o poder antioxidante dos diferentes hidrolisados obtidos, o RQH com alcalase 2h foi também o que desempenhou os melhores resultados de poder antioxidante total (1118,4 ± 17,9 μmol equivalente de Trolox/g de proteína). Estudo anterior de Liu *et al.* (2020), porém utilizando sementes de quinoa vermelha demonstraram maior carga de compostos fenólicos e atividade antioxidante em comparação com outros tipos de quinoa (branca e preta), além de demonstrar *in vitro* potencial antiinflamatório e anticancerígeno.

Após as análises in vitro e a seleção do RQH obtido pela hidrólise com Alcalase por 2h, foram realizadas análises *in vivo* para testar as capacidades antioxidantes e também protetoras cardiovasculares do RQH. Para isso, animais SHR foram tratados por 8 semanas com RQH nas doses de 250 mg/Kg e 1000 mg/Kg dia na água de beber, e na dose 1000 mg/Kg houve redução dos níveis de PA dos animais hipertensos (−9.8 ± 4.5 mmHg) além da melhora na resposta de alodinia mecânica, indicando potencial protetor de neuropatia mecânica. Soma-se a estes efeitos, ao analisar o papel do RQH no estado redox dos animais, um aumento da capacidade antioxidante em rim, aumento dos níveis de glutationa em fígado, redução da peroxidação lipídica em rim, plasma e coração em relação com os animais SHR (López-Moreno *et al.*, 2023).

Levando em consideração todos os benefícios fisiológicos, metabólicos e ambientais de um hidrolisado feito a partir da quinoa vermelha, um pseudocereal, que tem uma miríade de propriedades funcionais interessantes para o organismo, além de alto teor de proteínas bioativas, e comprovada capacidade antioxidante e anti-hipertensiva, deve-se investigar ao máximo todas as possibilidades de uso deste alimento. Tendo em vista a toxicidade causada pela exposição aos metais, em especial ao Cd, e a necessidade de se investigar alternativas terapêuticas naturais, principalmente aquelas advindas das plantas, o RQH apresenta ser um potencial agente protetor aos danos induzidos pela exposição ao Cd no sistema cardiovascular. Para a execução dos experimentos relacionados a esta dissertação, foi utilizado o RQH, obtido por hidrólise com Alcalase 2.4 LFG 2h, este que foi cedido pela Prof. Dra. Marta Miguel-Castro (CSIC-CIAL, Madrid - Espanha) para uso e avaliação de suas propriedades neste trabalho de dissertação de mestrado.

2 JUSTIFICATIVA

A exposição humana ao Cádmio (Cd), ocorre pela atividade industrial, agricultura, mineração, exposição à fumaça de cigarro, alimentos contaminados, água, solos e desastres ambientais. Este metal tóxico e não essencial provoca danos ao sistema cardiovascular, resultando em repercussões vasculares, elevação da pressão arterial, além de causar estresse oxidativo e inflamação nesse sistema. Investigações de alternativas terapêuticas naturais que possam agir prevenindo e/ou tratando os danos cardiovasculares causados por esse metal são pouco exploradas.

Neste contexto, o hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), obtido por hidrólise com alcalase, destaca-se por seus efeitos anti-hipertensivo e antioxidante já comprovados em modelos de ratos espontaneamente hipertensos. Além disso, a quinoa, como pseudocereal, apresenta vantagens significativas, incluindo baixo custo, menor impacto ambiental e alta sustentabilidade. Assim, investigar o potencial protetor do RQH contra os danos cardiovasculares induzidos pelo Cd pode representar uma estratégia promissora para mitigar e/ou minimizar os efeitos nocivos desse metal tóxico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar se o Hidrolisado de Quinoa Vermelha (RQH) protege o sistema cardiovascular dos danos induzidos pela exposição a altas concentrações de Cd em ratos.

3.2 Específicos

- Caracterizar o hidrolisado de quinoa vermelha e identificar sequências peptídicas potencialmente ativas.
- Avaliar se o RQH melhora:

- A hipertensão arterial induzida pela exposição ao Cd;

- O dano vascular em artérias de condutância (aorta) e resistência (mesentérica) de ratos machos, relativo a capacidade de vasoconstrição e vasodilatação, analisando a participação do endotélio na resposta vascular, bem como as vias envolvidas nesta resposta;

- O aumento de estresse oxidativo e processo inflamatório induzido pela exposição ao Cd.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação do Hidrolisado de Quinoa Vermelha (RQH)

O Hidrolisado de Quinoa Vermelha foi obtido no processo descrito abaixo, no Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación / CIAL do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC) no Grupo de Pesquisa BIPEP, e cedido para os experimentos pela Dra. Marta Miguel-Castro.

A quinoa vermelha (*Chenopodium Quinoa Willd*) *in natura* foi adquirida da Legumbres Astorga (Burgos, Espanha). Para a obtenção do RQH, a quinoa foi triturada em um moedor de pedra (Conasi, Jaén, Espanha), a farinha resultante deste processo foi diluída em água destilada em uma proporção de 1:12,5 (w/v). Subsequentemente, foi realizada a hidrólise com Alcalase 2.4 LFG (Subtilisina (E.C. 3.4.21.62) 2.4 AU-A/g), uma enzima protease produzida pela bactéria *Bacillus Licheniformis* (Novozymes - Copenhague, Dinamarca), este processo teve duração de 2h em um banho termostático, regulado à uma temperatura de 55ºC, em constante agitação. Para a inativação enzimática, a amostra foi submetida a uma temperatura de 90 ºC durante 15 minutos. Após, o hidrolisado foi centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e congelado a -20ºC para posterior liofilização (Moreno *et al.*, 2022). O hidrolisado já liofilizado foi armazenado a vácuo e congelado a -20ºC. Para a administração diária via gavagem nos animais experimentais o hidrolisado foi ressuspendido em água de torneira (Figura 1).

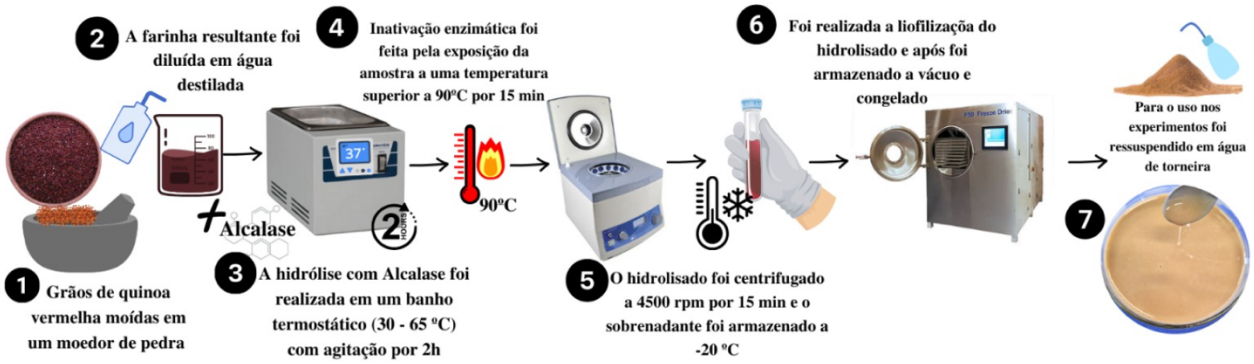

Figura 3 - Representação esquemática da obtenção do Hidrolisado de Quinoa Vermelha (RQH) através da hidrólise com Alcalase por 2h (fonte: própria autora).

4.2 Caracterização do Hidrolisado de Quinoa Vermelha

4.2.1 Obtenção de fração < 3000 Da e extração peptídica e preparação de análise de peptídeos

O sobrenadante obtido após a centrifugação do hidrolisado, foi ultrafiltrado por um concentrador de proteínas (Pierce™ PES, 3K MWCO - Termofisher, Espanha), através da centrifugação a 5000 x g por 60 min e a fração < 3000 Da foi armazenada a -20ºC. Uma porção de 1 ml do ultrafiltrado obtido foi concentrada a 500 µl em um concentrador a vácuo (SpeedVac). Anteriormente a análise espectrométrica de massa, as amostras (concentradas e não concentradas) foram submetidas a SDS-PAGE a 18% usando marcadores de proteína (Sigma Aldrich, Espanha) e coradas com azul de Coomassie para verificar a ausência de proteínas ou peptídeos grandes, as amostras concentradas também passaram por um processo de dessalinização em pontas de pipeta ZipTip C18 (Figura 4) (Millipore, Espanha) o que garante um bom processo de hidrólise.



Figura 4 - Gel de SDS-PAGE (18%) demonstrando a ausência de proteínas ou peptídeos grandes (fonte: imagem fornecida pela Dra. Marta Miguel-Castro).

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficácia de fase reversa (RP-HPLC-MS/MS) do RQH

A análise proteômica foi realizada no Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa, que pertence à ProteoRed (CSIC - Madrid, Espanha). Os peptídeos que foram dessalinizados, secos, ressuspensos em 10 µl de ácido fórmico (0,1%) e analisados por RP-LC-MS/MS em um sistema Easy-nLC 1200 acoplado a um espectrômetro de massa híbrido LTQ-Orbitrap-Velos-Pro com armadilha de íons (Thermo Scientific). Os peptídeos foram concentrados por cromatografia de fase reversa usando uma pré-coluna C18 RP de 0,1 mm × 20 mm (Thermo Scientific) e, em seguida, separados usando uma coluna bioZen 2,6 mm Peptide XB-C18 RP de 0,075 mm x 250 mm (Phenomenex) operando a 0,25 µl/min. Os peptídeos foram eluídos usando um gradiente duplo de 60 min. O perfil do gradiente foi definido da seguinte forma: 5-25% de solvente B por 45 min, 25-40% de solvente B por 15 min, 40-100% de solvente B por 2 min e 100% de solvente B por 18 min (Solvente A: 0,1% de ácido fórmico em água, solvente B: 0,1% de ácido fórmico e 80% de acetonitrila em água). A ionização foi feita usando uma interface Nano-bore Emitters Stainless Steel ID 30 µm (Proxeon) com tensão de spray de 2,1 kV com S-Lens de 60%. A resolução do Orbitrap foi definida em 30.000 (Alonso *et al*, 2015). Os peptídeos foram detectados em varreduras de pesquisa de 400 a 1600 amu (1 µscan), seguidos por vinte varreduras MS/MS dependentes de dados (Top 20), usando uma largura de isolamento de 2 u (em unidades de razão massa-carga), energia de colisão normalizada de 35% e exclusão dinâmica aplicada durante períodos de 60 segundos.

4.2.3 Identificação dos peptídeos bioativos

A identificação dos peptídeos através dos dados brutos foi realizada utilizando o mecanismo de busca PEAKS Studio v11.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontário, Canadá). A pesquisa no banco de dados foi feita com uniprot-chenopodium-quinoa.fasta (33949 entradas; UniProt liberação 07/2024) (banco de dados decoy-fusion). As seguintes restrições foram usadas para as buscas: modo de digestão inespecífico, até dois locais perdidos de clivagem e tolerâncias de 20 ppm para íons precursores e 0,6 Da para íons de fragmentos MS/MS. As taxas de descoberta falsa (FDR) para correspondências de espectro de peptídeos (PSM) e para proteínas foram limitadas a 0,01. Apenas as proteínas com pelo menos dois peptídeos exclusivos sendo descobertos a partir de análises LC/MS/MS foram consideradas (África Sanchiz *et al,* 2020).

Primeiro foram selecionados os íons moleculares dos diferentes peptídeos presentes no hidrolisado. Para isso, escolheu-se o íon precursor, que pode ser o íon molecular ou o íon molecular duplamente carregado, que se fragmentou, dando origem a uma série de fragmentos que permitem identificar os aminoácidos que formam a sequência peptídica. A identificação foi feita realizando uma busca das massas e sequências parciais obtidas por ESI-MS/MS, em um banco de dados de proteínas de *Chenopodium quinoa*, podendo ser selecionada a enzima específica utilizada para a digestão e geração de peptídeos. Como resultado, foi obtida uma lista de peptídeos classificados com base no nível de concordância entre os aspectos observados teóricos e experimentais. Após a identificação das sequências peptídicas, a cada peptídeo foi atribuído a uma proteína de origem, dando um valor que indica o grau de confiança dessa atribuição. Desta forma, este trabalho conseguiu a identificação de diversas sequências peptídicas do RQH, e após foi realizada uma seleção daquelas que apresentaram potencial atividade antioxidante de acordo com sua estrutura.

4.3 Animais e Desenho Experimental

Foram utilizados 40 ratos, *Rattus Norvegicus* da linhagem *Wistar* machos de 3 meses de idade (~350g). Os animais foram obtidos no Biotério da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e mantidos em ambiente com temperatura e umidade constantes e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e à água em gabinete próprio. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes para pesquisa biomédica definidas pelas Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa, com número de protocolo 010/2023 (ANEXO l).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (Figura 2) e tratados por 14 dias. Diariamente, durante o tratamento foi realizado o controle da ingesta de água e ração dos animais e semanalmente o controle ponderal:

a) **Grupo Controle (Control):** Água de torneira via gavagem + Água destilada via intraperitoneal (i.p.);
b) **Grupo Cádmio (Cd):** Água de torneira via gavagem + $CdCl_2$ - 1 mg/kg i.p. (Balaraman *et al,* 1989);
c) **Grupo Hidrolisado de Quinoa Vermelha (RQH)**: Hidrolisado de Quinoa Vermelha 1g/kg/dia + Água destilada via intraperitoneal (i.p.) (Moreno, 2022);

d) Grupo Cádmio + Hidrolisado de Quinoa Vermelha (CdRQH): $CdCl_2$ - 1 mg/kg i.p. + Hidrolisado de Quinoa Vermelha 1g/kg/dia via gavagem;

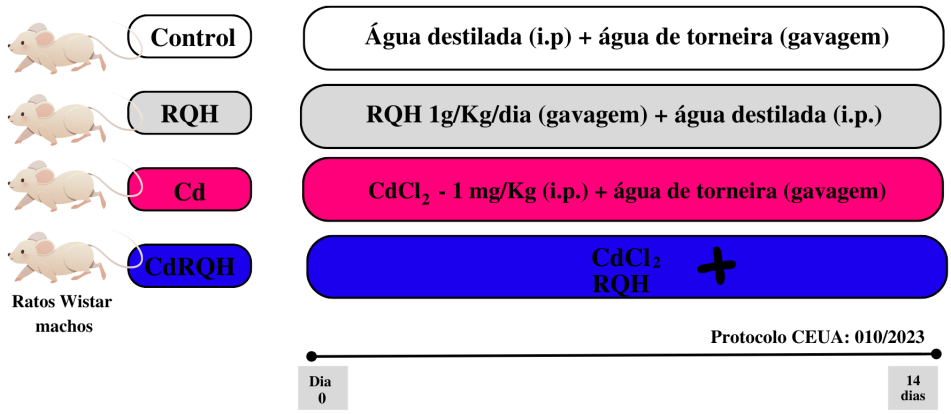

Figura 5 - Desenho experimental do protocolo de tratamento e grupos experimentais (fonte: própria autora).

4.4 Medida de Pressão Arterial Sistólica

A análise da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada semanalmente de maneira indireta, pelo método de pletismografia caudal (LE 5002 / V03/200L, Panlab s.l., Barcelona, Espanha), de acordo com protocolo descrito por Buñag (1973). Na semana anterior a primeira medida os animais realizaram procedimento de habituação, que consistiu em condicionamento ao ambiente do experimento, manipulação do animal pelo avaliador, inserção do animal no contensor, aquecimento da cauda a 37 ºC e insuflação do cuff caudal com medidas de pressão sequenciais a fim de minimizar o estresse para a medida intencional.

No dia 0, que correspondeu a condição em que nenhum animal estava sob tratamento, com o animal consciente foi realizada a primeira medida. Após aquecimento a 37 ºC, um manguito inflável foi colocado na base da cauda, conectado a um transdutor de pressão e este a um sistema de aquisição de dados (Transdutor pneumático, ADInstruments Pty Ltd., Bella Vista, NSW, Austrália). O manguito foi inflado até ocluir o fluxo sanguíneo caudal e, ao desinflar lentamente, o retorno do fluxo foi detectado pela pletismografia, para obter a medida da pressão sistólica do animal, foi registrado o valor do segundo ponto mais alto da curva após o retorno da pulsação, marcando assim a medida da pressão sistólica. Foram realizadas dez medidas e a média

destas foi considerada a medida de PAS do animal. Nos dias 7 e 14 do tratamento foram novamente realizadas a medida de pressão arterial sistólica utilizando-se o mesmo método.

Ao final do tratamento (15º dia) os animais foram anestesiados (Cetamina - 87 mg/kg, i.p. e Xilazina 13 mg/kg, i.p.) e na sequência eutanasiados por exsanguinação. Foi realizada a coleta de sangue total, através de punção direta da aorta abdominal, para análise de conteúdo cádmio e a partir da centrifugação a 3500 rpm, por 10 minutos em uma temperatura de 4ºC de parte do sangue total obteve-se o plasma que foi armazenado a -20ºC para as análises bioquímicas.

Além disto foram extraídos para o experimento de reatividade vascular, análises bioquímicas e de imunofluorescência as artérias Aorta e mesentérica de resistência (MRA).

4.5 Reatividade Vascular

As artérias aorta e MRA foram cuidadosamente dissecadas, e todo tecido adiposo presente no em torno das artérias foi cuidadosamente removido. Anéis de 2 - 4 mm foram cortados e montados em seus respectivos sistemas. A reatividade vascular foi avaliada nas artérias, em um sistema de banho de órgãos Aorta: TSD125BX8 - Biopac Systems, Inc; CA, conectado a um sistema de aquisição de dados (MP150WSW-SYS - Biopac Systems, Inc; CA), e MRA: Powerlab 8/35 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália.

O registro de tensão isométrica foi realizado de acordo com o método descrito por Nielsen & Owman (1971) para aorta e Mulvany & Halpern (1977) para MRA. Primeiramente, os anéis foram submetidos a um período de estabilização de 30 minutos, onde foram mantidos aerados com mistura carbogênica (95 % O_2 e 5% CO_2) e imersos em solução de Krebs–Henseleit (KHS, em mM: 115 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 11.1 glicose, 4.7 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.2 KH_2PO_4 e 0.01 Na_2EDTA, pH 7.4). Após os segmentos passaram por uma avaliação da integridade funcional e foram contraídos com cloreto de potássio, registrada a contração máxima, novo período de estabilização e nova administração de KCl (KCl, 75 mM - aorta e 120 mM - MRA).

Em seguida, as artérias foram pré-contraídas (a 50% da contração máxima realizada com o KCl) com fenilefrina (Phe) - aorta e noradrenalina (NE) - MRA, e uma curva de relaxamento à acetilcolina (ACh - 0,1–1 mmol/L) foi realizada, quando os segmentos foram capazes de relaxar pelo menos 80% da pré-contração, a integridade do endotélio foi constatada. Alguns anéis de aorta tiveram o endotélio removido mecanicamente, para avaliação da participação da via endotelial na resposta vasoconstritora a Phe, e a remoção do endotélio foi considerada efetiva quando o segmento foi capaz de relaxar no máximo 10% da pré-contração a Phe. Na sequência, curvas concentração-resposta à Phea e NE, foram realizadas na presença do endotélio e também

na ausência de endotélio em aorta, e para investigação de possíveis vias envolvidas foram incubados fármacos como, um inibidor não-seletivo da Óxido Nítrico Sintase (L-NAME - N-nitro-L-arginine methyl ester, - 100μM), inibidor não-seletivo de Espécies Reativas de Oxigênio - ROS (Tiron - 1 mmol/L), enzima conversora de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (SOD - Superóxido Dismutase - 150 U/mL) e o inibidor seletivo de cicloxigenase-2, COX-2 (NS398 - 1 μM). Também foi avaliado o relaxamento independente do endotélio em curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP 1–30 μmol/L).

4.6 Medida de Concentração de Cádmio

O teor de Cd foi medido no sangue total pelo método de espectrometria de massa de plasma (ICP-MS), conforme descrito por Batista (2009). Em resumo, o equipamento utilizado para as análises foi um espectrômetro de massa de plasma acoplado por indução (ICP-DRC-MS - ELAN DRC II, Perkin Elmer, SCIEX, Norwalk, EUA), operando com argônio de alta pureza e gás de reação (99,99%, Praxair) e H_2/Ar (5/95%). A amostra foi introduzida em uma câmara pulverizada de quartzo e um nebulizador (Meinhard) conectado por tubos (Tygon), ligado a bomba peristáltica do ICP-MS (ajustada a 20 rpm). Nas amostras de sangue total, foi adicionado 1 ml de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH) a 50% (v/v), e permaneceram incubadas em um homogeneizador rotacional em temperatura ambiente por 12h. As amostras foram calibradas com ácido nítrico a 10%, por fim, cada amostra foi analisada 5 vezes para precisão dos dados. Estas análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Toxicologia Analítica e de Sistemas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (ASTox) de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Barbosa.

4.7 Imunofluorescência

Segmentos de artérias aorta e artéria mesentérica foram fixadas em paraformaldeído a 4% (1 banho de PFA 4% por 2h, seguido de 3 banhos em tampão PBS 7.4 pH de 10 minutos cada e por fim 1 banho de sacarose 30% por 1h) e posteriormente embebidas em Tissue Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80ºC até a realização do experimento. Foram realizados cortes em criostato (Leica Microsystems, Alemanha, modelo CM1850) dos anéis dos respectivos vasos em secções de 14μm e montadas em lâminas gelatinizadas. Na sequência, os cortes foram lavados com solução tampão fosfato (PBS) e permeabilizados com tampão Citrato de Sódio (10mM, pH 6.0) em constante aquecimento, até a ebulição mas sem a evaporação do tampão, esse processo foi feito para para a reativação das proteínas, com o objetivo de romper as ligações que poderiam existir na amostra

e facilitar a ligação do antígeno com o anticorpo de escolha, após as lâminas serem lavadas 3x com PBS foram incubadas com solução blocking por 1h (Triton + soro de cabra normal a 2% + BSA 1%). A seguir do período de ativação dos sítios de ligação, as lâminas de aorta e MRA foram incubadas com os anticorpos primários COX-2 (1:200) e NOX-1 (1:200), as lâminas de aorta também foram incubadas com TNF-α (1:400), eNOS (1:500) e p47-phox (1:400) (as diluições foram estabelecidas conforme especificações do fabricante - Sigma-Aldrich, Brasil) e permaneceram em câmara fria por 24h. Após este período as lâminas foram cuidadosamente lavadas 3x com PBS seguido pela incubação do anticorpo secundário, Alexa fluor 488 nm, (anti-mouse – Alexa fluor green 488 nm, 1: 200; Thermo Fisher Scientific, EUA) em câmara escura, no período de 1h. Imediatamente após a lavagem 3x com PBS, os núcleos foram corados com DAPI (1:1000), esse processo consistiu na incubação de DAPI por 15 minutos e posterior lavagem das lâminas com PBS. Como controle negativo foi usado a omissão do anticorpo primário em algumas lâminas (Jimenez-Altayó et al., 2005). Ao final, as lâminas foram secadas com papel nas bordas e foi utilizado o meio de montagem líquido Fluoromount-G (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para a fixação da lamínula.

As imagens foram geradas usando o EVOS® Floid® Cell Imaging Station (Life Technologies, Carlsbad, CA) (ampliação de 40x, 50% de brilho para a captura em verde (anticorpo primário + Alexa) e 10% de brilho para captura em azul (DAPI)). Após a captação das imagens, foi realizada a quantificação das Unidades de Fluorescência (FU) utilizando o programa ImageJ (Image processing and Analysis in Java) versão 1.53q, para tal, para cada grupo pelo menos um N=6 capturas foi obtida e gerada uma média de FU por grupo e incubação (a leitura da fluorescência foi realizada a partir das imagens verdes). Para a representação na figura foi utilizado as imagens mescladas (MERGE) em azul que corresponde a marcação dos núcleos (DAPI) e em verde que corresponde a ligação do anticorpo primário com o anticorpo secundário.

4.8 Análises Bioquímicas de Parâmetros de Estresse Oxidativo

As amostras de plasma foram diluídas com Tris-HCL 50mM (pH 7.4) na concentração de 1:10. Os anéis de aorta e MRA foram homogeneizados com Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) na proporção de 1:10 (peso - tecido: volume - Tris), centrifugados e o sobrenadante foi diluído com Tris-HCl 50mM (1:10) e congelado a -20ºC para o uso nas seguintes análises bioquímicas de parâmetros de estresse oxidativo:

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em amostras de aorta e artérias mesentéricas de resistência (MRA) foram mensurados utilizando o método fluorimétrico descrito por Loetchutinat *et al.* (2005). Foi feito um sistema com as amostras homogeneizadas e diluídas,

Tris-HCl 10mM (pH 7.4) e foi adicionado o composto 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) na concentração final de 1 mM. Esse composto, uma vez no interior dos tecidos, é convertido pela ação de esterases em 2,7-diclorofluoresceína (DCF), que é oxidada na presença de ROS, resultando em emissão de fluorescência. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C, protegidas da luz, para permitir a reação entre as ROS e o DCFH-DA. A fluorescência foi medida utilizando o espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, EUA), com parâmetros de excitação a 480 nm e emissão a 520 nm, durante o período de incubação foram feitas leituras da fluorescência a cada 15 minutos. Os níveis de ROS foram expressos em unidades de fluorescência (FU), sendo a intensidade da fluorescência diretamente proporcional à quantidade de ROS presente nas amostras. Amostras controle, sem DCFH-DA, foram utilizadas para definir a fluorescência basal e evitar falsos positivos. Como valor final de FU foi feito a média do delta das amostras, entre a última leitura de FU (60 min) e a primeira leitura (0 min).

Também mensuramos os níveis de peroxidação lipídica no plasma e nas artérias por meio da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando o método colorimétrico descrito por Ohkawa *et al.* (1979). Esse ensaio mediu a formação de malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica, como marcador do estresse oxidativo. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um complexo corado, cuja intensidade pode ser quantificada por espectrofotometria. Inicialmente, as amostras (plasma ou homogenato das artérias) foram preparadas e misturadas com uma solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8%, tampão ácido acético ajustado para pH 3,5 e dodecilsulfato de sódio (SDS) a 8,1%. Após as amostras foram incubadas por 60 minutos a 95°C em banho seco, o que permite a reação entre o TBA e o MDA, formando o complexo rosa típico. Após o período de incubação, as amostras foram resfriadas para interromper a reação. Em seguida, a leitura foi realizada em um espectrofotômetro na absorbância de 532 nm, comprimento de onda específico para detectar o complexo TBA-MDA. A quantidade de MDA presente nas amostras foi calculada utilizando uma curva padrão de MDA previamente estabelecida e expressa em nanomoles de MDA pelo volume da amostra. Amostras controle, contendo reagentes sem material biológico (branco), foram processadas paralelamente para subtrair a absorbância de fundo e garantir a precisão dos resultados.

Por fim, a capacidade antioxidante total (FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Potential*) no plasma e nas artérias foi avaliada pela capacidade das amostras de reduzir íons férricos (Fe^{3+}) a íons ferrosos (Fe^{2+}), seguindo o método descrito por Benzie & Strain (1996). Esse ensaio colorimétrico é baseado na formação de um complexo azul entre o Fe^{2+} e o TPTZ (*2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina*), que pode ser quantificado por espectrofotometria e reflete a capacidade

redutora dos antioxidantes presentes na amostra. Inicialmente, foi preparado o reagente de trabalho, composto por tampão acetato de sódio 300 mM (pH 3,6), TPTZ a 10 mM dissolvido em HCl 40 mM e cloreto férrico ($FeCl_3$) a 20 mM. As amostras diluídas foram misturadas com o reagente de trabalho e incubadas em banho seco por 15 minutos a 37°C, permitindo a reação completa entre os antioxidantes presentes e os íons férricos, resultando na formação do complexo azul de Fe^{2+}-TPTZ. Após a incubação, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices, CA, EUA) a 593 nm, que corresponde ao pico de absorção do complexo formado. Para a quantificação, foi realizada uma curva padrão de Trolox (50 - 1000 μM), um antioxidante solúvel em água que mimetiza a atividade da vitamina E, usado como referência para expressar os resultados. As absorbâncias das amostras foram comparadas à curva de Trolox, e os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox (mMol/L).

4.9 Expressão dos Dados e Análises Estatísticas

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Para a análise dos resultados, foi realizada análise de variância (*ANOVA*) de duas vias para medidas repetidas. Quando a *ANOVA* apresentou significância estatística, o teste *post-hoc* de *Bonferroni* foi utilizado. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no software *PrismGraph* 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

Neste trabalho foram identificados dezenas de sequências peptídicas do hidrolisado de quinoa vermelha com alcalase 2h por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (RP-HPLC-MS/MS), das quais foram selecionadas aquelas que apresentaram potencial atividade antioxidante de acordo com sua estrutura e que corrobora com característica de terminações de aminoácidos ou sequência descritos na literatura da área consultada (Tabela 2). A identificação foi através de uma busca das massas e sequências parciais obtidas por ESI-MS/MS, em um banco de dados de proteínas de *Chenopodium quinoa*, onde se utilizou a enzima específica utilizada para a digestão e geração de peptídeos. Ressalta-se que nenhum dos peptídeos selecionados já havia sido descrito na literatura anteriormente. O efeito potencial de cada sequência está pautado na composição, estrutura e localização de seus aminoácidos especialmente terminais (Akira *et al.,* 1992). A capacidade antioxidante, amplamente descrita em outros hidrolisados (Elias *et al.,* 2008) é atribuída a histidina, tirosina e fenilalanina. Os efeitos anti-inflamatório em alguns estudos é atrelado a presença de aspartato (Cicero *et al.,* 2016), assim como o potencial quelante a presença de glutamato (Udechukwu *et al.,* 2016).

Tabela 2 - Peptídeos identificados nas frações < 3000 Da do hidrolisado de quinoa vermelha (RQH) com alcalase 2h, seus aminoácidos e efeito potencial.

Sequência	Massa Molecular (Da)	Aminoácidos	Efeito Potencial
FDVGVK	663,36	Fenilalanina (F), Aspartato (D), Valina (V), Glicina (G), Lisina (K)	Antioxidante Anti-inflamatório
KLYGPE	705,37	Lisina (K), Leucina (L), Tirosina (Y), Glicina (G), Prolina (P), Glutamato (E)	Antioxidante Anti-inflamatório Quelante
PIYEGY	740,34	Prolina (P), Isoleucina (I), Tirosina (Y), Glutamato (E), Glicina (G), Tirosina (Y)	Antioxidante Anti-inflamatório Quelante
TETVRFF	898,45	Treonina (T), Glutamina (E), Tirosina (Y), Valina (V), Fenilalanina (F), Fenilalanina (F)	Antioxidante Anti-inflamatório
VDHPVFL	825,44	Valina (V), Aspartato (D), Histidina (H), Prolina (P), Fenilalanina (F), Leucina (L)	Antioxidante Anti-inflamatório Quelante
VPIYEGY	839,41	Valina (V), Prolina (P), Isoleucina (I), Tirosina (Y), Glutamato (E), Glicina (G), Tirosina (Y)	Antioxidante Anti-inflamatório Quelante
YIRRGEAKL	1104,64	Tirosina (Y), Isoleucina (I), Arginina (R), Glutamato (E), Alanina (A), Lisina (L)	Antioxidante Anti-inflamatório Quelante
YPIIADPK	915,51	Tirosina (Y), Prolina (P), Isoleucina (I), Ácido Aspártico (D), Prolina (P), Lisina (K)	Antioxidante Anti-inflamatório
YTEQPL	749,36	Tirosina (Y), Treonina (T), Glutamina (E), Glutamato (E), Prolina (P), Leucina (L)	Antioxidante Anti-inflamatório Quelante

Aminoácidos presentes nas sequências apresentadas: A: Alanina; **D**: Ácido Aspártico; **E**: Ácido Glutâmico; **F**: Fenilalanina; **G**: Glicina; **H**: Histidina; **I**: Isoleucina; **K**: Lisina; **L**: Leucina; **P**: Prolina; **Q**: Glutamina; **R**: Arginina; **T**: Treonina; **V**: Valina; **Y**: Tirosina

A análise espectrofotométrica da concentração do conteúdo de Cd no sangue total dos animais demonstrou que a exposição por 14 dias ao Cd aumentou significativamente os níveis do metal no sangue dos animais expostos. O tratamento concomitante com o RQH de ratos expostos ao Cd reduziu significativamente os níveis de Cd quando comparados ao grupo que somente recebeu o metal, no entanto, ressaltamos que permaneceu elevado quando comparado ao grupo controle (Ct: 0,36 ± 0,01; RQH: 0,34 ± 0,02; Cd: 245,03 ± 11,02*; CdRQH: 199,21 ± 12,47$^{*\#}$ µg/L * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd $p<0.05$).

Ao analisar o peso corporal dos animais observamos que no início do tratamento, os animais de todos os grupos estudados estavam com pesos similares. No sétimo dia o peso dos animais tratados apenas com $CdCl_2$, (grupo Cd) apresentaram uma perda significativa de peso corporal comparado ao seu peso inicial. Os animais co-tratados com RQH (Grupo CdRQH) não apresentaram perda de peso até este momento. Porém ao final dos 14 dias de tratamento, ambos grupos que foram expostos à altas doses de $CdCl_2$ reduziram significativamente o peso corporal em relação ao início do tratamento e comparado ao grupo Controle. Ainda, o co-tratamento com RQH não impediu a perda de peso induzida pelo metal (Figura 6A). É importante ressaltar que não foram observadas diferenças no peso dos animais tratados apenas com o hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), em comparação com o grupo Controle, estes animais ganharam o peso esperado e típico durante o período de tratamento.

Os dados de média de consumo de água e ração dos animais durante o tratamento não demonstraram diferenças entre o grupo controle e o grupo RQH, indicando que apenas o tratamento com o hidrolisado não altera o apetite e sede dos animais. Já os animais expostos ao Cd em média consumiram significativamente menor quantidade de água e ração durante o tratamento, o que corrobora com a perda de peso corporal observada nos grupos. No entanto, o co-tratamento com RQH (Grupo CdRQH) melhorou significativamente a ingesta de água e ração dos animais durante todo período de tratamento (Figura 6B e C).

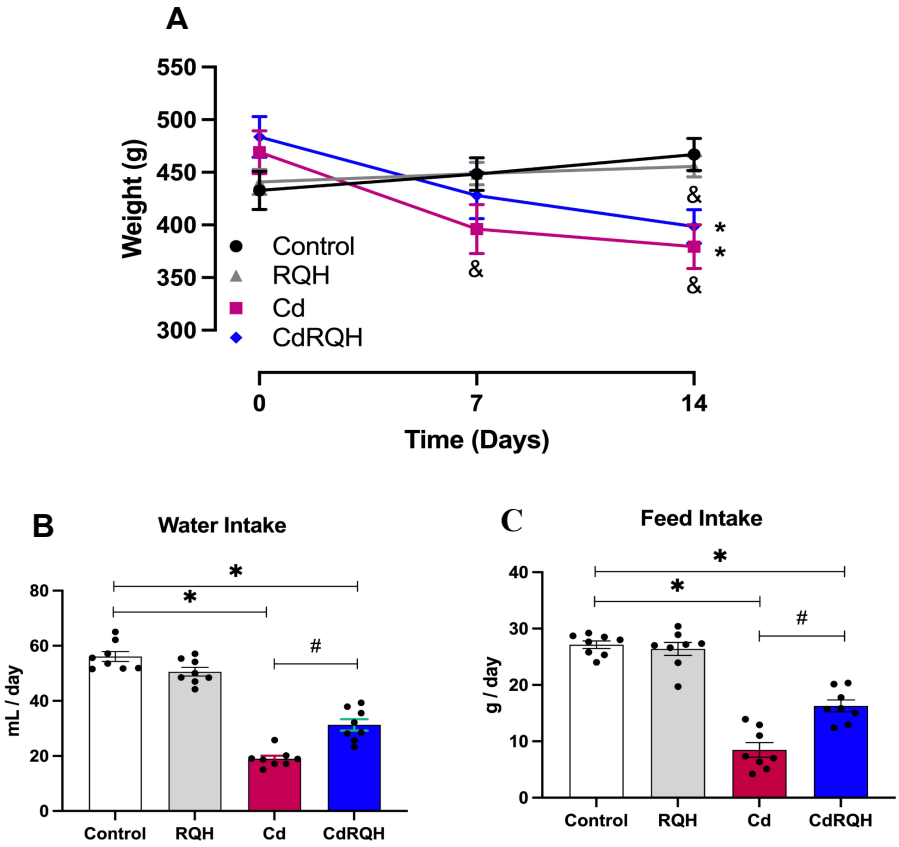

Figura 6 - (A) média do peso corporal (g) dos animais dos grupos Controle (Control - ●), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH - ▲), expostos a $CdCl_2$ (Cd - ■) e ambos tratamento (CdRQH - ♦) nos tempos 0 (antes do tratamento), aos 7 e 14 dias. Em (B) consumo médio de líquido (mL/dia) e (C) ração (g/dia) por grupo durante todo o período de tratamento. Os dados estão expressos em média ± EPM (N=8). * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd e $^{\&}$ vs tempo 0 (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Ao avaliarmos o comportamento da pressão arterial sistólica (SBP - Systolic Blood Pressure), observamos que inicialmente a SBP foi similar entre os grupos (dia 0) e não houve modificação deste parâmetro em 7 dias de tratamento em nenhum dos grupos estudados. No entanto, ao final do tratamento (14º dia) os animais do grupo Cd apresentaram um aumento significativo dos níveis de pressão arterial sistólica (140,8 ± 2,6 *vs Control), representando um grau de hipertensão estágio 1, reproduzindo o que já foi observado pelo nosso grupo neste modelo anteriormente. A administração de RQH isoladamente não alterou a SBP durante todo o tempo de tratamento. Todavia, de maneira surpreendente, quando sob co-tratamento (Grupo CdRQH) concomitante a exposição ao metal, impediu o aumento pressórico induzido pelo metal (Figura 7).

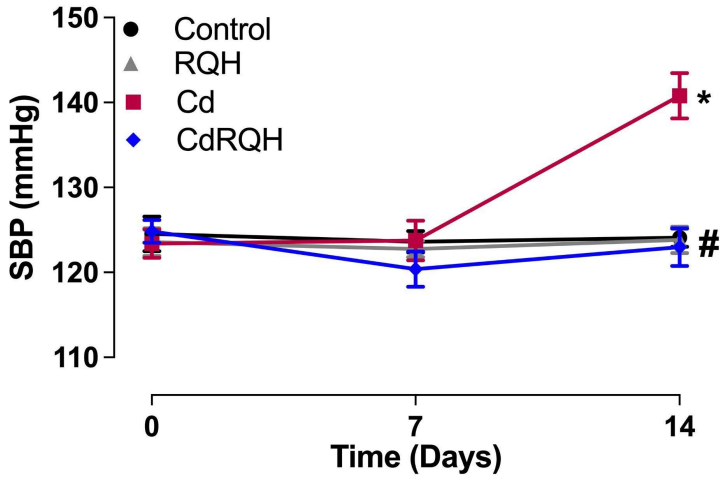

Figura 7 - Comportamento da pressão arterial sistólica (SBP - mmHg) durante o tratamento (dias 0, 4 e 14) nos animais dos grupos Controle (Control - ●), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH - ▲), expostos a $CdCl_2$ (Cd - ■) e ambos tratamento (CdRQH - ♦). Os dados estão expressos em média ± EPM (N=8). * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd e $^{\&}$ vs tempo 0 (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Além do componente pressórico, avaliamos o comportamento da reatividade vascular em artérias de condutância (aorta) e resistência (mesentérica) para tentar elucidar os potenciais vias de ação/proteção deste novo hidrolisado frente ao dano promovido por este metal.

Inicialmente avaliamos a viabilidade e integridade das células musculares lisas vasculares por meio da resposta máxima ao cloreto de potássio (KCl) em artéria aorta (ΔKCl 75 mM - Ct: 2.0 ± 0.0; RQH: 2.0 ± 0.0; Cd: 1.9 ± 0.0; CdRQH: 2.1 ± 0.0 g) e em MRA (KCl 120mM - Ct: 4.4 ± 0.3; RQH: 4.0 ± 0.2; Cd: 3.5 ± 0.3; CdRQH: 4.0 ± 0.2 mN/mm) e não foi observado diferenças entre os grupos.

Para as artérias mesentéricas avaliamos o diâmetro interno o que garante que as diferenças observadas nas respostas vasculares sejam atribuídas as intervenções experimentais em vez de variações anatômicas que poderiam influenciar os resultados, e observamos similaridade nos diâmetros das artérias entre os grupos estudados (MRA - Ct: 258.9 ± 6.9; RQH: 282.1 ± 8.1; Cd: 255.1 ± 6.7; CdRQH: 259.2 ± 7.4 µm).

Inicialmente investigamos se a exposição ao $CdCl_2$ e/ou a suplementação com RHQ poderia afetar/interferir no relaxamento dependente ou independente do endotélio por meio de curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato de sódio, um doador direto de óxido nítrico (SNP) ao músculo liso vascular. Observamos que não houve modificação no

relaxamento, tanto dependente quanto independente do endotélio, em ambas as artérias estudadas em nenhum dos grupos experimentais analisados (Figura 8).

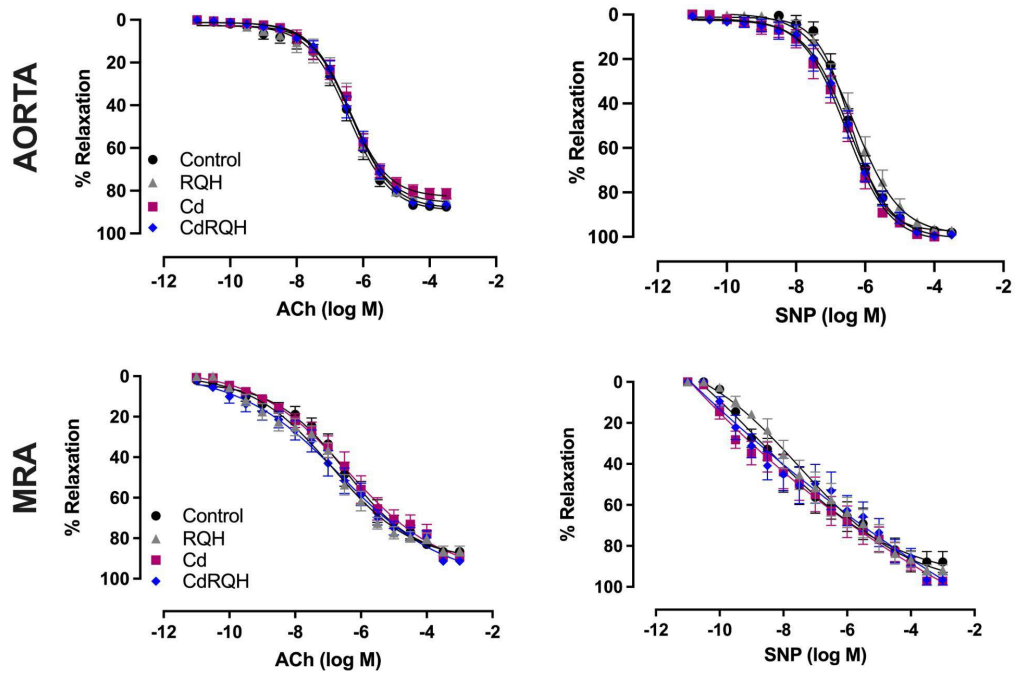

Figura 8 - Efeitos da exposição ao $CdCl_2$ e do co-tratamento com RQH na resposta vasodilatadora das artérias aorta e MRA de ratos. (A) Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) e (B) nitroprussiato de sódio (SNP) em artérias aorta e MRA respectivamente. Os dados estão expressos em média ± EPM (N=10). * $p<0.05$ (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

No entanto, quando avaliamos o comportamento dos vasos (aorta e MRA) estudados na contração a Phe ou NE respectivamente, observamos que os animais que receberam somente RQH não modificaram a resposta contrátil relativo ao grupo controle. Porém, as artérias de animais expostos ao Cd (Grupo Cd) apresentaram um aumento significativo na resposta contrátil a Phe ou NE em aorta e MRA respectivamente. Este dado não foi observado a partir de diferenças por alteração na sensibilidade a Phe ou NE (Tabela 3), e sim pelo aumento significativo na resposta máxima a estes agonistas alfa adrenérgicos no grupo tratados apenas com $CdCl_2$ (Tabela 3). De forma bastante eficiente, o co-tratamento com RQH impediu o aumento da reatividade promovida pelo metal, normalizando a curva de contração a níveis de grupo controle (Figura 9A e B). Esse achado corrobora com o dado da pressão arterial (Figura 7), o que nos levou a investigar as possíveis vias envolvidas nesta proteção vascular atribuída ao RQH.

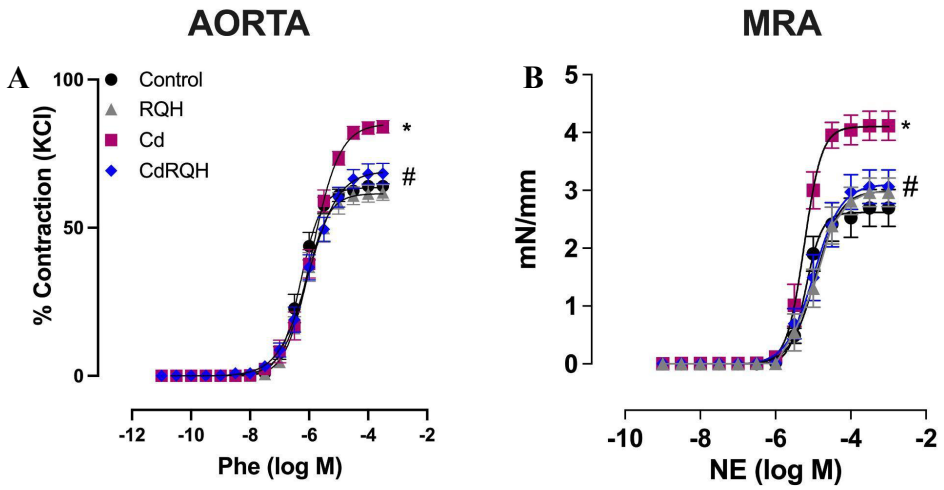

Figura 9 - Efeitos da exposição ao $CdCl_2$ e do co-tratamento com RQH na resposta vasoconstritora das artérias aorta e MRA de ratos. (A) Curva concentração-resposta para fenilefrina (Phe) em anéis de artéria aorta e (B) curva concentração-resposta à noradrenalina (NE) em anéis de artérias mesentéricas (MRA). Os grupos estão representados por Controle (Control - círculos cheios pretos ●), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH - ▲), $CdCl_2$ (Cd - quadrado rosa ■) e (CdRQH - losango azul. ◆). Os dados estão representados em média ± EPM (N=10) e expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl para aorta e em valor absoluto de contração em mN por mm em MRA. * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

A partir da constatação do efeito do Cd sobre a contração vascular e do papel protetor do RQH nesse processo, investigamos as possíveis vias envolvidas na proteção vascular proporcionada por este novo hidrolisado. Assim, em anéis de aorta investigamos a modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.

A remoção mecânica do endotélio não alterou de forma significativa a resposta contrátil ao KCl nos grupos experimentais (ΔKCl E- Ct: 1.9 ± 0.0; RQH: 1.9 ± 0.0; Cd: 1.9 ± 0.0; CdRQH:1.9 ± 0.1 g vs E+ $P>0.05$). Observamos que nestes anéis houve aumento significativo da resposta máxima à Phe em artérias de ratos dos grupos controle (Control), tratados com RQH, e expostos ao Cd e co-tratados com RQH (CdRQH), em comparação com seus anéis controle (Figura 10, Tabela 3). Apenas no grupo CdRQH houve também o aumento da sensibilidade da resposta da curva, ou seja, nos animais co-tratados (Tabela 3). Já ao avaliar os animais expostos somente ao Cd a retirada do endotélio não promoveu alteração da sensibilidade e aumentou a resposta máxima a Phe nas artérias dos animais do grupo Cd (Tabela 3) porém em menor magnitude comparado ao grupo controle (Control) e ao co-tratado (CdRQH), como demonstra claramente o gráfico da área abaixo da curva (Figura 10). Estes resultados sugerem que a exposição ao Cd reduz a modulação endotelial na resposta vascular a Phe em aorta e o co-

tratamento com RQH foi capaz de conferir proteção ao endotélio vascular de ratos expostos ao metal.

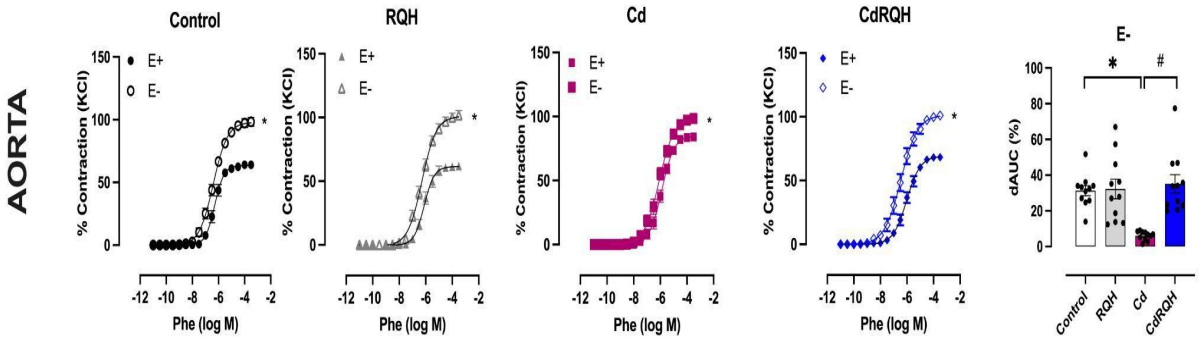

Figura 10 - Efeitos do co-tratamento com RQH nos danos vasculares endoteliais provocados pela exposição ao $CdCl_2$ em aorta. Curva concentração-resposta para Phe na presença (E+, símbolos cheios) e ausência de endotélio (E-, símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais. Os dados estão representados em média ± EPM (N=10) e expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Como já demonstrado em ratos espontaneamente hipertensos (Moreno *et al.*, 2022) e confirmado com nossos achados na caracterização de suas sequências peptídicas bioativas (Tabela 2), o RQH possui potencial antioxidante como suplemento alimentar. Sabendo que uma das principais vias de dano vascular pela exposição ao Cd envolve a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), investigamos o papel do NO na resposta vasoconstritora à Phe/NE em segmentos de aorta e MRA, respectivamente, e possível papel protetor do RQH. Para tanto, realizamos a incubação dos segmentos arteriais com L-NAME, um inibidor não-seletivo da síntese de NO. Observamos que houve um aumento da resposta contrátil a Phe/NE em aorta/MRA respectivamente de animais dos grupos Control, RQH e CdRQH (Figura 11, Tabela 3). Além do aumento da resposta máxima observado, apenas no grupo co-tratado com RQH (CdRQH) houve também um aumento na sensibilidade da curva, em artérias de resistência (MRA). No entanto, houve em ambos os leitos vasculares significativa redução da participação do NO na resposta contrátil a Phe/NE dos animais expostos somente ao Cd (Grupo Cd), indicando um prejuízo da via do óxido nítrico (NO). Nota-se que o co-tratamento com RQH preservou a manutenção da biodisponibilidade de NO em ambas as artérias, não havendo prejuízo deste importante produto vasorrelaxante derivado do endotélio (Figura 11).

Corroborando com este achado, por meio da técnica de imunofluorescência, observamos a expressão de eNOS (Óxido Nítrico Sintase Endotelial), a principal enzima sintase de óxido nítrico endotelial responsável pela produção de NO nas células endoteliais. Na artéria aorta dos animais expostos ao Cd (Grupo Cd), observou-se uma redução significativa na fluorescência, indicando menor biodisponibilidade de NO. Já nas artérias dos animais tratados concomitantemente com RQH (Grupo CdRQH), a fluorescência para eNOS foi mantida, sugerindo que esses animais não apresentaram prejuízo na biodisponibilidade de NO neste vaso (Figura 14).

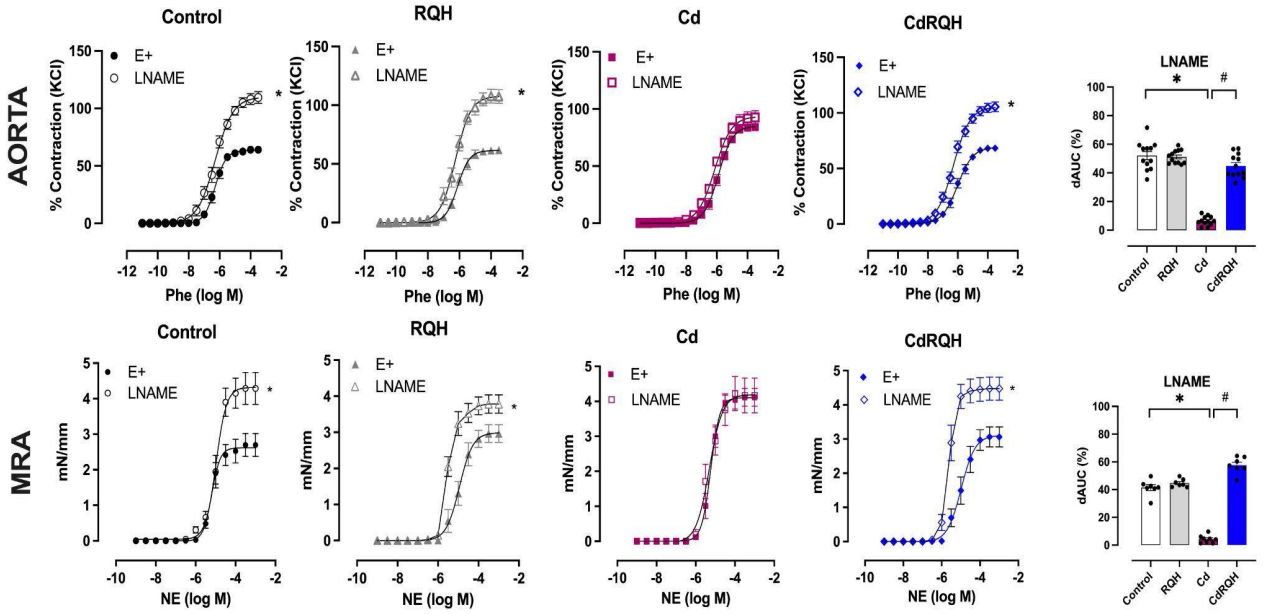

Figura 11 - Efeitos do co-tratamento com RQH sobre a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) induzida pela exposição ao $CdCl_2$ em aorta e MRA. Curva concentração-resposta para Phe em aorta (painel superior) e para NE em MRA (painel inferior) em anéis intactos (E+, símbolos cheios) e incubados com L-NAME (100µM) (LNAME, símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais. Os dados estão representados em média ± EPM (N=10) e expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl para aorta e em valor absoluto de contração em mN por mm em MRA. * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Um dos principais fatores que reduzem a biodisponibilidade de NO no leito vascular é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Considerando que os danos provocados pela exposição ao Cd estão diretamente relacionados ao aumento do estresse oxidativo vascular, investigamos a participação das ROS na resposta contrátil à Phe/NE ao incubar os segmentos vasculares com o antioxidante TIRON (1 mmol/L), um sequestrador de

ROS. Observamos que, na aorta, este *scavenger* de ROS reduziu a resposta contrátil à Phe em todos os grupos estudados (Figura 12, painel superior), no entanto, essa redução foi significativamente maior nos anéis de animais expostos apenas ao Cd (Grupo Cd), como demonstrado claramente no gráfico da área abaixo da curva - dAUC (Figura 12, painel superior). Esses resultados indicam uma maior participação das ROS no aumento da contração à Phe induzida pelo metal. Por outro lado, o co-tratamento com RQH conferiu proteção vascular ao impedir o aumento da participação dessas espécies na resposta contrátil do vaso (Figura 12, painel superior).

Nas artérias mesentéricas de resistência (MRA), o TIRON reduziu significativamente a resposta máxima do vaso à NE apenas no grupo Cd (Tabela 3, Figura 12 - painel inferior), enquanto nos demais grupos não houve alteração significativa em relação ao anel controle, indicando que essa mesma via oxidativa é estimulada pelo metal neste leito vascular. No entanto, o co-tratamento com RQH impediu o aumento de ROS induzido pelo metal em MRA, reforçando seu potencial poder antioxidante (Figura 12, painel inferior).

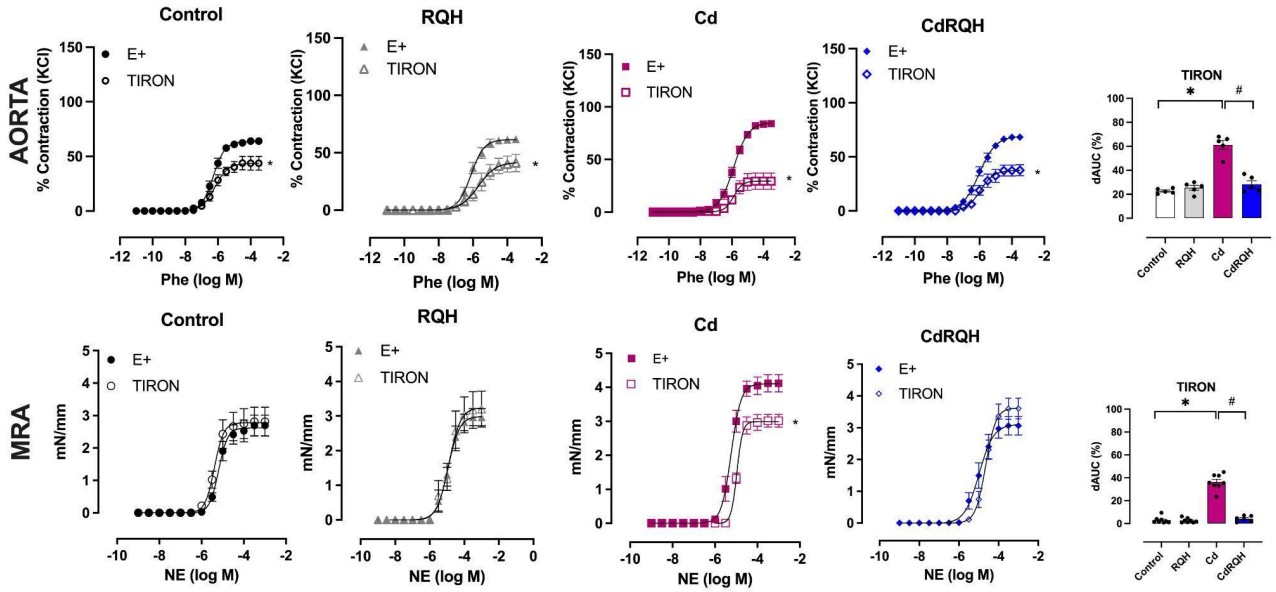

Figura 12 - Efeitos do co-tratamento com RQH no aumento da participação de ROS na resposta contrátil induzida por $CdCl_2$ em aorta e MRA. Curva concentração-resposta para Phe em aorta (painel superior) e para NE em MRA (painel inferior) em anéis intactos (E+, símbolos cheios) e incubados com TIRON (1 mmol/L) (LNAME, símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais. Os dados estão representados em média ± EPM (N=10) e expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl para aorta e em valor absoluto de contração em mN por mm em MRA. * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Uma das principais ROS é o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que desempenha um papel central no estresse oxidativo vascular e pode ser chave para compreender mecanismos de danos induzidos pela exposição ao Cd, mas também elucidar de que forma/ vias o RQH confere proteção ao sistema vascular. Assim, para investigar sua participação na resposta contrátil de aorta e MRA, incubamos as artérias com SOD - superóxido dismutase. Esta enzima antioxidante converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, reduzindo a disponibilidade de $O_2^{\bullet -}$ e permitindo avaliar especificamente o impacto dessa espécie reativa na reatividade vascular e no comprometimento endotelial. Corroborando com os achados anteriores, a incubação com SOD não alterou a resposta contrátil a Phe em aorta (Tabela 3, Figura 13 - painel superior) e a NE em MRA (Tabela 3, Figura 13 - painel inferior) nos anéis dos grupos Controle, RQH e CdRQH, este último apenas em MRA. Contudo, observamos uma redução significativa da resposta contrátil em ambos os leitos vasculares nos anéis dos animais expostos apenas ao Cd, e parcialmente no grupo co-tratado (CdRQH) em aorta, indicando a aumentada participação de $O_2^{\bullet -}$ nos efeitos vasculares induzidos por esse metal. O co-tratamento com RQH, por outro lado, impediu completamente a participação de $O_2^{\bullet -}$na resposta contrátil em MRA e parcialmente em aorta (Tabela 3, Figura 13), evidenciando seu poder antioxidante.

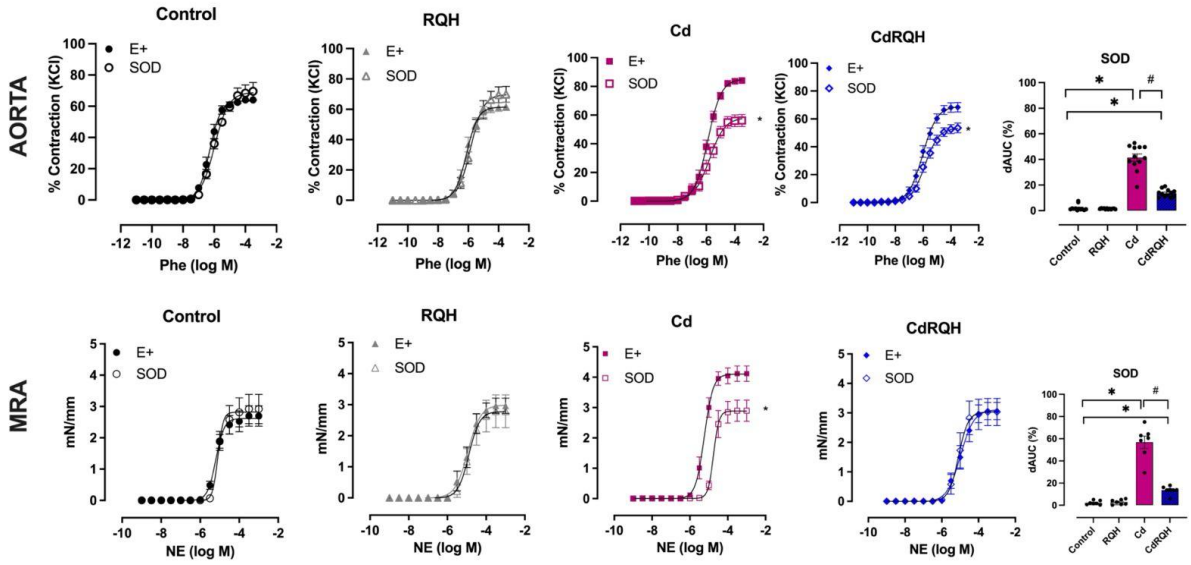

Figura 13 - Efeitos do co-tratamento com RQH no aumento da participação de ânion superóxido na resposta contrátil induzida pela exposição ao $CdCl_2$ em aorta e MRA. Curva concentração-resposta para Phe em aorta (painel superior) e para NE em MRA (painel inferior) em anéis intactos (E+, símbolos cheios) e incubados com superóxido dismutase (150 U/mL) (SOD, símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais. Os dados estão representados em média ± EPM (N=10) e expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl para aorta e em valor absoluto de contração em mN por mm em MRA. * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

O complexo enzimático da NADPH oxidase é um dos principais produtores de ROS no endotélio vascular, tem diferentes isoformas, e cada uma delas é formada por subunidades distintas. Em condições fisiológicas típicas do organismo é ativada para as atividades metabólicas fisiológicas celulares, no entanto sob exposição ao $CdCl_2$, ocorre a super ativação deste complexo, como já demonstramos anteriormente neste modelo de alta exposição (Pinheiro Jr. *et al.*, 2020). Assim, avaliamos por meio da técnica de imunofluorescência a presença de NOX-1 (isoforma importante para o endotélio vascular do complexo enzimático da NADPH oxidase) em aorta e MRA. Observamos que o co-tratamento com RQH impediu o aumento da fluorescência de NOX-1 induzido pela exposição ao metal em ambas as artérias (Figura 14).

Notadamente, uma das principais subunidades que forma a NOX-1 é a p47-phox (fator citosólico de neutrófilos 1) esta age como um regulador essencial da NOX-1, promovendo sua translocação para a membrana e interagindo com outras subunidades da NADPH oxidase para formar o complexo ativo. A exacerbação da ativação deste complexo, potencializa a produção de

ROS no endotélio vascular, e para aprofundar em aorta a investigação desta importante via, marcamos através da técnica de imunofluorescência a expressão de p47-phox. De encontro com os achados anteriores, constatamos que há maior expressão desta subunidade em artérias de animais expostos somente ao Cd e o co-tratamento com o RQH reduziu significativamente a emissão de fluorescência desta subunidade reforçando seu papel antioxidante envolvendo esta importante via vascular (Figura 14).

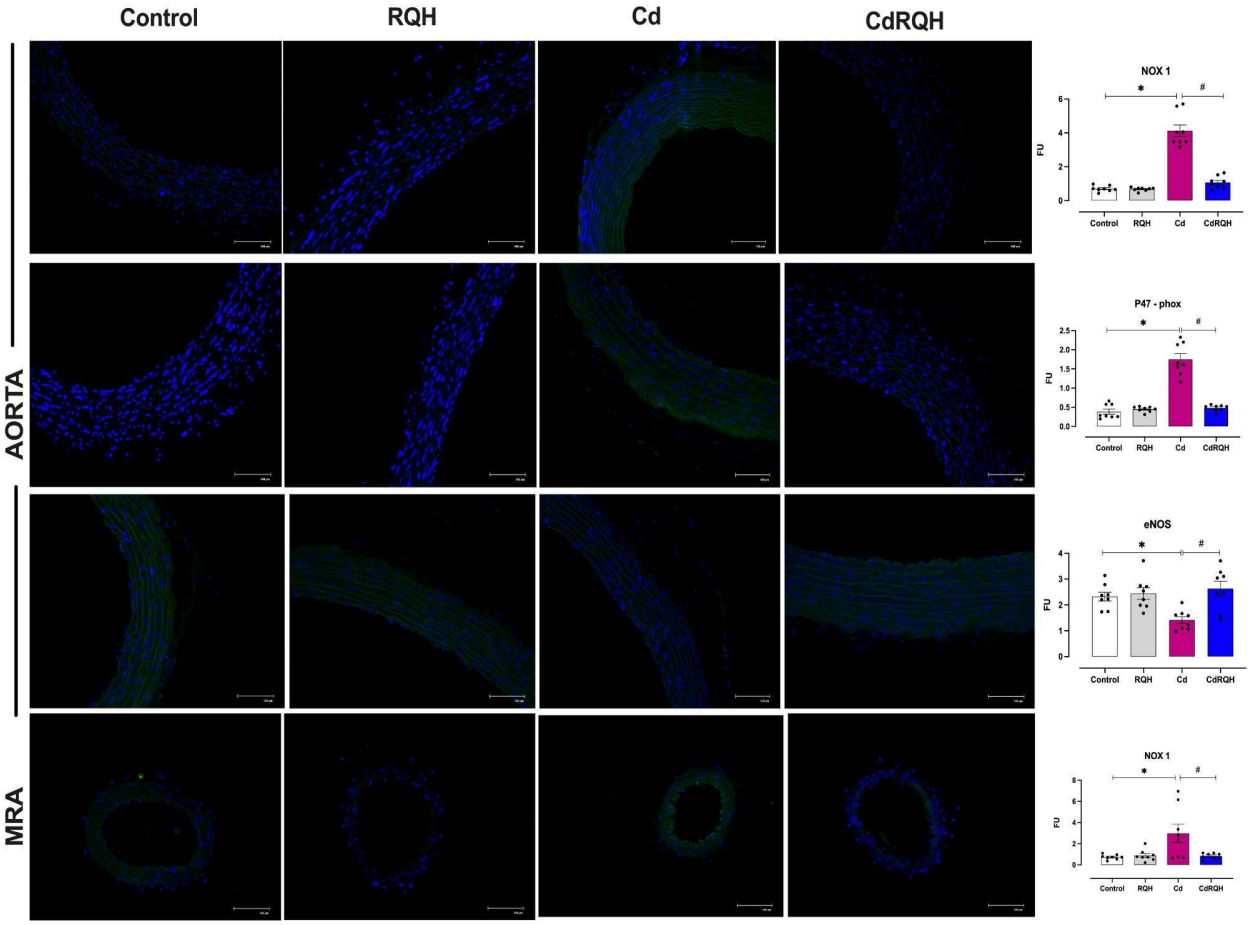

Figura 14 - Efeitos do co-tratamento com RQH na expressão de marcadores de estresse oxidativo induzido por $CdCl_2$ em aorta e MRA. Imagens representativas (ampliação de 40x e brilho em 50%) da expressão de NOX-1 em aorta e MRA (secções de 14µM), P47-phox e eNOS em aorta. As imagens correspondem a mescla (MERGE) da marcação dos núcleos pela DAPI em azul e NOX-1, eNOS e P47-phox em verde. * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd.

Considerando o desequilíbrio redox induzido pela exposição ao $CdCl_2$ e o aumento do estresse oxidativo observado até o momento, avaliamos por meio de análises bioquímicas alguns parâmetros de importância de estresse oxidativo nos tecidos vasculares e em plasma. Os níveis de ROS, observados pela emissão de fluorescência pela sonda DCFH-DA, apresentou

significativo aumento no grupo Cd e de forma bastante efetiva o co-tratamento com RQH impediu o aumento dessas espécies reativas prejudiciais em aorta e MRA (Figura 15).

A peroxidação lipídica, analisada pela presença de seu subproduto MDA, outro marcador importante de estresse oxidativo, foi significativamente aumentada em ambas as artérias e em plasma dos animais expostos somente ao Cd (Grupo Cd). Todavia, aqueles co-tratados com RQH (Grupo CdRQH) mantiveram os níveis de MDA similares ao do grupo controle, conferindo um potencial antioxidante ao RQH (Figura 15).

Ao avaliar a capacidade antioxidante total, verificada pelo Potencial Antioxidante Redutor do Ferro, observamos aumento significativo nos animais expostos ao Cd (Grupo Cd), possivelmente por uma resposta compensatória como já observado anteriormente neste modelo (Pinheiro Jr. *et al.,* 2020). No entanto, os animais que receberam o RQH concomitante à exposição ao Cd não aumentaram sua capacidade antioxidante total em aorta e MRA, possivelmente em resposta ao menor estresse oxidativo nestes vasos protegidos pelo efeito do RQH. Já em plasma não houve diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 15).

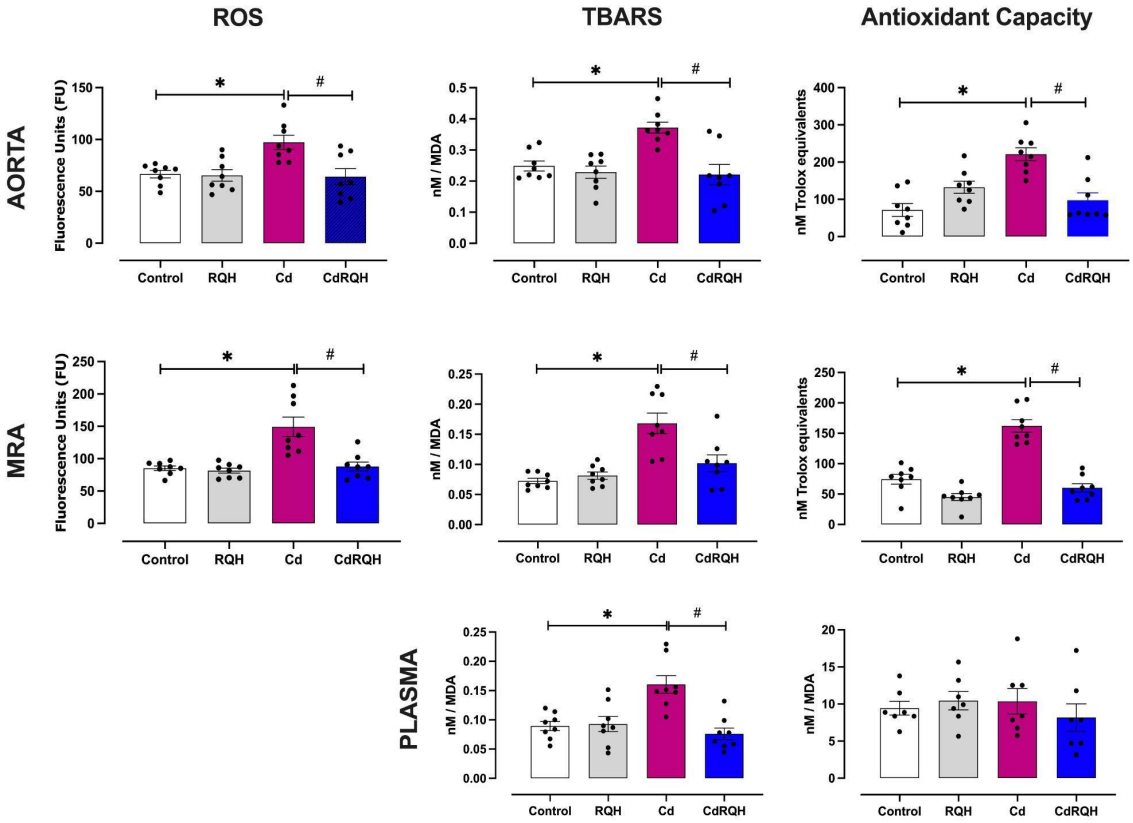

Figura 15 - Efeitos do co-tratamento com RQH em parâmetros de estresse oxidativo em aorta MRA e plasma. Espécies reativas de oxigênio (ROS), níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e capacidade antioxidante total (FRAP) em aorta (painel superior), MRA (painel do meio) e plasma (painel inferior) dos grupos experimentais. Os dados estão representados em média ± EPM (N=10). * $p<0.05$ vs grupo Control e # vs grupo Cd (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Conhecendo a proteção vascular conferida pelo RQH ao dano induzido pelo Cd com os dados acima atribuída por sua ação antioxidante, e sabendo da relação do estresse oxidativo na indução da COX-2 vascular e a ativação de vias de sinalização inflamatórias induzido por Cd, observamos se esta via poderia também estar protegida dos efeitos do metal por este alimento funcional, demonstrando um efeito inédito anti-inflamatório a este hidrolisado.

Observamos na Figura 16 que a incubação de anéis de aorta e MRA com o inibidor seletivo de COX-2, NS398, não provocou diferenças na resposta contrátil a Phe e NE em aorta e MRA, respectivamente, nos grupos Control, RQH e CdRQH, em comparação com seus anéis controles (Figura 16, Tabela 3). Contudo, ao analisar os animais expostos somente ao Cd (Grupo Cd), há redução significativa da resposta contrátil de ambos os vasos, indicando um aumento da participação de COX-2 e seus derivados na vasoconstrição de aorta e MRA. De fato, o co-tratamento com RQH (CdRQH) impediu o aumento da participação de COX-2 na resposta contrátil em ambos os vasos, demonstrando pela primeira vez propriedades anti-inflamatórias vasculares deste hidrolisado (Figura 16).

Observamos também pela imunofluorescência a COX-2 que diretamente no leito vascular há aumento significativo da fluorescência no grupo exposto somente ao Cd (Grupo Cd) e o co-tratamento com RQH impediu o aumento e ativação desta cascata inflamatória em aorta e MRA, mantendo a emissão de fluorescência a níveis de grupo controle corroborando os dados funcionais observados (Figura 17).

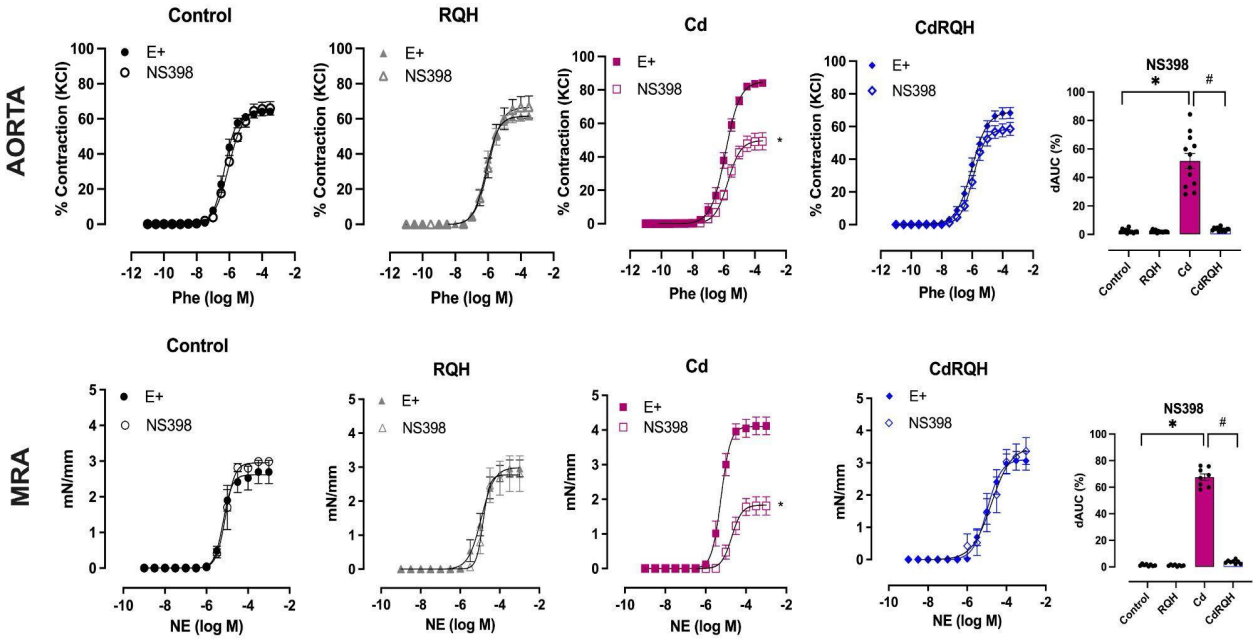

Figura 16 - Efeitos do co-tratamento com RQH no aumento da participação de COX-2 na resposta contrátil induzida pela exposição ao $CdCl_2$ em aorta e MRA. Curva concentração-resposta para Phe em aorta (painel superior) e para NE em MRA (painel inferior) em anéis intactos (E+, símbolos cheios) e incubados com NS398 (1 µM - símbolos vazios) nos grupos Controle (Control), tratados com hidrolisado de quinoa vermelha (RQH), expostos ao $CdCl_2$ (Cd) e ambos tratamento (CdRQH). O gráfico de barras representa as diferenças da área abaixo da curva (dAUC) dos grupos experimentais. Os dados estão representados em média ± EPM (N=10) e expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl para aorta e em valor absoluto de contração em mN por mm em MRA. * $p<0.05$ vs grupo Control e # vs grupo Cd (*ANOVA 2v*, seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Uma vez identificado que o estresse oxidativo e a via inflamatória são os principais mecanismos do dano induzido pelo Cd, e a indução de COX-2 se dá via ativação de fatores de transcrição inflamatórios que estimulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-alfa. E, sabendo que o TNF-alfa pode atuar promovendo o aumento de ROS ao estimular enzimas oxidativas, como a NADPH oxidase, intensificando o estresse oxidativo, e retroalimentação um ciclo inflamatório/ oxidativo; investigamos a expressão da marcação de TNF-alfa por imunofluorescência em aorta. Observamos um aumento da fluorescência para TNF-alfa no Grupo Cd e o de forma bastante efetiva o co-tratamento com RQH impediu a exacerbação deste fator no leito vascular de aorta, conferindo também um potencial poder anti-inflamatório ao RQH (Figura 17).

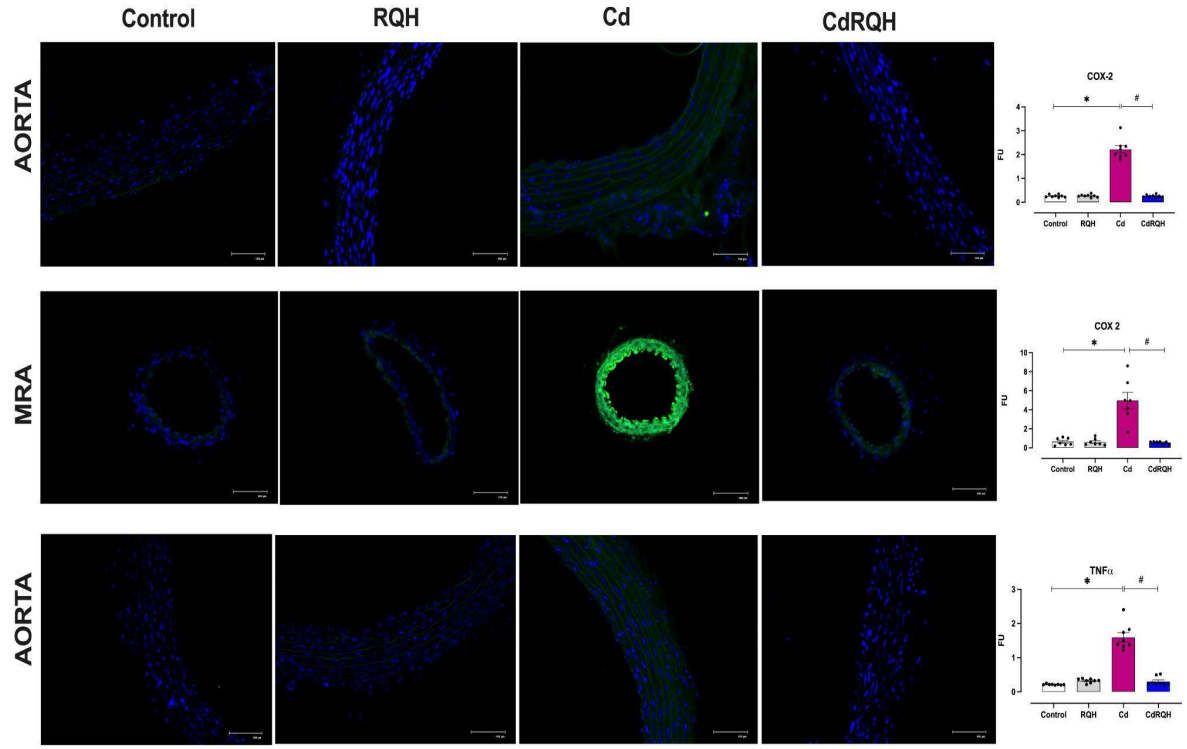

Figura 17 - Efeitos do co-tratamento com RQH na expressão de marcadores de processo inflamatório em aorta e MRA. Imagens representativas (ampliação de 40x e brilho em 50%) da expressão de COX-2 e em aorta e MRA (secções de 14μM) e TNF-α em aorta. As imagens correspondem a mescla (MERGE) da marcação dos núcleos pela DAPI em azul e COX-2 e TNF-α em verde. * $p<0.05$ vs grupo Control e $^{\#}$ vs grupo Cd.

Tabela 3 - Efeito do RQH na sensibilidade (pD2) e na resposta máxima (Rmax) a Phe a NE em anéis aórticos e artérias de resistência mesentérica (MRA) de ratos expostos ao $CdCl_2$ por 14 dias.

Aorta								
	pD_2				E_{max} (%)			
	Control	**RQH**	**Cd**	**CdRQH**	**Control**	**RQH**	**Cd**	**CdRQH**
E+	6.2 ± 0.1	6.0 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.1	64.0 ± 1.5	61.8 ± 2.7	84.0 ± 2.2$^{\#}$	68.3 ± 3.4$^{\&}$
E-	6.4 ± 0.1	6.2 ± 0 .0	6.0 ± 0.1	6.4 ± 0.1*	97.9 ± 3.6*	104.5 ± 5.1*	100.1 ± 4*	100.3 ± 2.7*
LNAME	6.3 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.3 ± 0.1	109.7 ± 5.4*	107.1 ± 5.8*	94.7 ± 6.2	105.5 ± 4.4*
SOD	6.0 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.9 ± 0.1	63.8 ± 5.1	62.9 ± 4.5	56.9 ± 4.2*	53.4 ± 3.5*
TIRON	6.2 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.1	43.6 ± 6.0*	41.8 ± 7.8*	29.8 ± 7.7*	37.8 ± 5.0*
NS398	6.0 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1	66.2 ± 4.2	67.3 ± 6.4	50.0 ± 5.3*	59.0 ± 3.9
ACh	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.1	6.5 ± 0.1	6.3 ± 0.1	88.2 ± 1.8	86.5 ± 2.3	82.3 ± 2.5	88.1 ± 2.0
SNP	6.4 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.5 ± 0.1	99.8 ± 2.5	100.2 ± 2.4	101.4 ± 1.6	98.9 ± 1.4
MRA								
E+	5.2 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.2 ± 0.1	4.9 ± 0.1	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.2	4.1 ± 0.3$^{\#}$	3.1 ± 0.3$^{\&}$
LNAME	4.9 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.7 ± 0.1*	4.3 ± 0.5*	3.7 ± 0.3*	4.4 ± 0.6	4.2 ± 0.4*
SOD	5.1 ± 0.0	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.1	2.8 ± 0.5	2.7 ± 0.5	2.9 ± 0.4*	2.9 ± 0.4
TIRON	5.4 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.03	4.7 ± 0.1	2.7 ± 0.5	3.2 ± 0.5	2.9 ± 0.2*	3.6 ± 0.3
NS398	5.1 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.9 ± 0.2	2.9 ± 0.04	2.8 ± 0.5	1.8 ± 0.3*	3.2 ± 0.4
ACh	6.8 ± 0.4	6.6 ± 0.4	6.5 ± 0.3	6.2 ± 0.5	86.8 ±1.7	87.3 ± 2.0	89.0 ± 2.0	91.1 ± 2.6
SNP	7.0 ± 0.7	7.1 ± 0.4	7.2 ± 0.7	7.4 ± 1.5	90.3 ± 2.5	96.9 ± 5.1	90.6 ± 7.8	97.1 ± 3.9

Parâmetros de sensibilidade (pD2) e resposta máxima (Rmax) das curvas de concentração-resposta a Phe ou NE em aortas ou MRA de ratos controle, tratados com $CdCl_2$, hidrolisado de quinoa vermelha (RQH) e ambos os tratamentos (CdRQH). (E+) e segmentos com remoção do endotélio (E-) e na presença de incubação de L-NAME (100 µM), SOD (150 U/mL), TIRON (1 mmol/L), NS398 (1 µM) ou curvas de ACh/SNP. Os resultados são expressos como média ± EPM. Rmax: resposta máxima (expressa como uma porcentagem da resposta máxima induzida por 75 mM de KCl ou mN/mm em MRA e pD2 expresso como -log da metade do Rmax. n = 8, $^{*}p < 0,05$ vs Controle correspondente em cada grupo, $^{\#}$ vs grupo Controle, $^{\&}$ vs grupo Cd.

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou o potencial protetor de um hidrolisado de quinoa vermelha (RQH) obtido a partir da hidrólise por alcalase nos danos vasculares e pressóricos induzidos pela exposição por 14 dias a altas concentrações de $CdCl_2$. De forma inédita, os resultados obtidos indicam que este RQH possui peptídeos com potencial antioxidante, anti-inflamatório e quelante; e que o co-tratamento com RQH: 1) impediu o desenvolvimento de hipertensão induzida pela exposição ao Cd; 2) reduziu os níveis sanguíneos de Cd, sugerindo um possível efeito quelante; 3) preveniu os danos vasculares induzidos pela alta exposição ao Cd advindos do aumento do estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO pelo aumento da produção de $O_2^{\cdot -}$ derivada da NADPH oxidase promovidos pelo metal; 4) modulou a via inflamatória, impedindo o aumento da COX-2 nas respostas vasculares e preveniu a elevação da expressão de TNF-α, um mediador chave de inflamação e estresse oxidativo, oferecendo uma abordagem multifacetada contra os danos vasculares induzidos pelo Cd.

A identificação de dezenas de sequências peptídicas deste RQH foram cuidadosamente selecionadas entre aqueles que apresentavam potencial antioxidante com base em sua estrutura. Conhecendo-se a estrutura dos peptídeos, é possível prever sua capacidade antioxidante (Bo *et al.*, 2021). A partir da composição deste RQH com alcalase por 2h, e dos peptídeos potencialmente identificados, observamos que o peptídeo VDHPVFL encontrado contém histidina (His, H) como um dos aminoácidos em sua estrutura o que pode conferir capacidade antioxidante. Isto deve-se ao grupo funcional imidazol presente na histidina, que é um anel aromático que pode ser doador de elétrons (Elias *et al.,* 2008). Estudos demonstraram que a presença de grupos funcionais hidrofóbicos e anéis aromáticos tem um efeito sinérgico na atividade antioxidante do peptídeo (Zou *et al.,* 2016).

Já a presença de tirosina (Tyr, Y) encontrada neste estudo nas sequências (KLYGPE, PIYEGY, VPIYEGY, YIRRGEAKL, YPIIADPK, YTEQPL) podem conferir poder antioxidante por possuir um grupo fenólico (-OH) na cadeia lateral e atuar como um doador de prótons. Assim, tem potencial para neutralizar radicais livres por meio da doação de hidrogênios, estabilizando-se como um radical fenóxido, que é mais estável e menos reativo (Torkova *et al.,* 2015). Também se sabe que o grupo fenólico da tirosina e o grupo indol do triptofano (Trp, W) são doadores de prótons, contribuindo para o aumento da capacidade antioxidante do peptídeo (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005). Essa característica faz com que a tirosina contribua significativamente para a capacidade antioxidante dos peptídeos, além de ser importante em sistemas antioxidantes,

devido à sua capacidade de formar interações sinérgicas com outros aminoácidos, como histidina e triptofano (Torkova *et al.,* 2015).

Embora secundário, a presença de treonina (Trh) nas sequências TETVRFF e YTEQPL confere potencial antioxidante por possuir um grupo hidroxila (-OH) em sua cadeia lateral, e assim uma moderada capacidade de doar hidrogênios para neutralizar radicais livres. No entanto, o potencial antioxidante da treonina é menor comparado a aminoácidos como tirosina e histidina encontrados em outras sequências descritas neste estudo (Barchi et al., 2023).

Sabe-se que o enxofre da metionina e o grupo tiol da cisteína podem doar elétrons, também contribuindo para o aumento da capacidade antioxidante (Matsui *et al.*, 2018). A cisteína (C) contém um grupo tiol (-SH) em sua cadeia lateral, tendo um papel importante como doador de elétrons, o que o torna um poderoso agente antioxidante. Ainda, é um dos componentes da glutationa, um importante antioxidante (Wu et al., 2004). A presença de cisteína em peptídeos pode contribuir para a captação de radicais livres, especialmente em condições de estresse oxidativo. No entanto, nas sequências elencadas neste hidrolisado não observamos a presença de cisteína. Vale destacar que muitos estudos demonstram que as proteínas da quinoa são ricas em cisteínas, metioninas e lisinas (Lis - K) (Elsohaimy *et al., 2*015), esta última encontrada nas sequências YPIIADPK, FDVGVK e YIRRGEAKL deste estudo, com verificada ação antioxidante e anti-inflamatória na literatura (Huang *et al.,* 2021).

Já a leucina (Leu, L) e a prolina (Pro, P), por exemplo, são conhecidas por aumentar a capacidade antioxidante de peptídeos cujo aminoácido predominante é a histidina (Jiang *et al.*, 2018). No peptídeo VDHPVFL extraído do RQH, há ocorrência de L e P, que pode conferir um papel antioxidante indireto, pela leucina auxiliar na captura de radicais livres nas membranas lipídicas e a prolina pela estabilidade estrutural dos peptídeos, coincidindo também com a presença de histidina (Karami *et al.,* 2019). Os peptídeos que contêm aminoácidos hidrofóbicos alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), metionina (Met, M), prolina (Pro, P), fenilalanina (Phe, F) e triptofano (Trp, W) aumentam a solubilidade do peptídeo em matrizes lipídicas, contribuindo positivamente para a captação de radicais livres e reduzindo a peroxidação lipídica (Laguerre *et al*., 2013). E praticamente todos foram descritos em algum dos aminoácidos citados.

Em conjunto, estas características descritas, conciliam com os peptídeos selecionados e com a principal característica inicialmente atribuída a este hidrolisado, seu poder antioxidante, muito embora os resultados discutidos a seguir contribuam para outras propriedades adicionais deste composto. Vale ressaltar que existem outras sequências peptídicas a serem exploradas, e o objetivo deste trabalho foi administrar um hidrolisado completo, que, além de conter essas

sequências peptídicas, pode, por meio do processo digestório, gerar outras centenas de sequências potencialmente ativas, além de carrear outros compostos da quinoa, como fibras, minerais, vitaminas e glicosídeos Assim, não é objetivo final atribuir a uma sequência única de aminoácidos o valor e efeito deste hidrolisado, mas sim identificar os componentes que possam estar contribuindo para seu efeito global.

A proposição de um hidrolisado advindo de um alimento como alternativa terapêutica pode atuar minimizando os danos induzidos pela exposição ao Cd no sistema cardiovascular, está em conformidade com os princípios de sustentabilidade, segurança alimentar e inovação terapêutica, e levando-se em consideração que a exposição ambiental, ocupacional ou até mesmo acidental é ainda uma realidade.

A concentração de Cd no sangue de populações expostas acidentalmente a altas doses do metal, como em desastres ambientais e em trabalhadores expostos ocupacionalmente de forma crítica, não é consenso e há grande variabilidade de concentrações sanguíneas relatadas (ONU, 1992). Em trabalhadores de fábricas de baterias níquel-Cd, os níveis sanguíneos chegam a 1,05 - 2,75 µg/100ml configurando alta exposição ao metal (Lauwerys *et al.*, 1976), já na exposição de forma ambiental e principalmente ocupacional os níveis encontrados são de 10 - 50 µg/L (ONU, 1992). No entanto, concentrações sanguíneas de Cd na população gravemente exposta podem variar entre 200 - 500 µg/L (Friberg *et al.,* 1983), embora a ONU destaque que estes valores são irreais para a população frisando que muitos estudos podem não ter controle de qualidade para garantir a confiança nos dados (ONU, 1992).

Neste estudo, observamos uma concentração de Cd elevada no sangue dos animais expostos ao metal (245,03 ± 11,02 µg/L), o que pode ser considerado uma exposição extrema (ONU, 1992). Ressaltamos que o Cd administrado por via intraperitoneal garante uma maior absorção do metal (~91-93%), e equivale a uma exposição de aproximadamente 4 meses em humanos (Balaraman *et al*., 1989). Em ratos doses acima de 0,75 mg/Kg de $CdCl_2$ já são consideradas altas doses de exposição (Nordberg *et al.*, 1982), e quando resultam em concentrações entre 100 - 300 µg/L de Cd no sangue são consideradas exposições extremas, como já ocorrido em situações de acidentes ocupacionais (ONU, 1992; Hassler *et al.*, 1983). Importante destacar que os níveis considerados seguros de exposição ao metal são de ~0,3 µg/L no sangue (ATSDR, 2008).

Em estudos prévios do nosso grupo, utilizando este mesmo modelo, foi encontrada concentrações de Cd no sangue de 410 - 490 µg/L, superior a encontrada neste trabalho (Pinheiro Jr. *et al.,* 2020; Moraes *et al.,* 2022; Piagette *et al.,* 2023). Embora ambos níveis de Cd sanguíneo sejam elevados, pode-se atribuir a diferença de valores observada a alguns fatores como origem

dos animais experimentais distintas, o que pode modificar a reprodutibilidade experimental, época do ano e ambientes distintos, alguns estudos relatam que em distintas temperaturas os animais reagem fisiologicamente e metabolicamente de forma diferente, como alterações importantes na microbiota intestinal e também a alimentação/ origem da ração diferentes, que pode alterar a oferta de nutrientes para os animais (Sepulveda *et al.,* 2020).

Destacamos que o foco deste trabalho são os potenciais efeitos benéficos do RQH, e de forma promissora observamos a redução de 20% na quantidade de Cd circulante no sangue dos animais expostos ao metal, revelando um potencial quelante do hidrolisado. Embora esta concentração circulante ainda seja elevada, considerando-se os níveis seguros citados acima, esta redução propiciou efeitos positivos e uma proteção extra, possivelmente relacionados a menor possibilidade de ligações do Cd com moléculas essenciais ao organismo, além de seus efeitos diretos.

Sabe-se que a quinoa é rica em inúmeros compostos essenciais, como a cisteína, um aminoácido sulfurado, que tem na sua composição grupo amino, carboxila e tiol (-SH) (Kozioł *et al.*, 1992; Burrieza *et al.*, 2019). O grupo tiol em específico, é formado por um átomo de enxofre ligado a um hidrogênio, esse grupamento tem alta capacidade de ligação a metais pesados, pois eles têm afinidade por grupamentos sulfurados, formando complexos solúveis que são facilmente excretados pelo organismo (Klaassen *et al.,* 1999). Embora as sequências peptídicas elencadas descritas neste hidrolisado de quinoa vermelha não tenham os grupamentos tiol (-SH) que seriam encontrados na Cisteína (C), observamos em diversas sequências peptídicas grupamentos hidroxila (-OH), presentes nas sequências que contêm Tirosina (Y) ou Treonina (T), ou Carboxila (-COOH), presente nas sequências com Ácido Aspártico (D) ou Ácido Glutâmico (E) o que confere potencial quelante para este hidrolisado. Das sequências peptídicas observadas a YIRRGEAKL aponta com potencial quelante, pela presença de histidina (Hys) pois esta pode interagir com cátions metálicos devido à sua estrutura de anel imidazol (Elias *et al.,* 2008). A presença de ácido glutâmico (Glu, E) nas sequencias PIYEGY, TETVRFF, VPIYEGY, YIRRGEAKL e YTEQPL encontradas neste hidrolisado também podem ter conferido potencial quelante devido ao grupo carboxila do ácido glutâmico (Udechukwu *et al.,* 2016)

Outro composto presente na quinoa é a quercetina, um flavonóide com alto poder antioxidante e anti-inflamatório e na literatura também está relacionada com possível potencial quelante, por conter em sua composição o grupo hidroxila (-OH), este que pode interagir com metais pesados formando ligações e facilitando a excreção, que embora não avaliada neste hidrolisado pode pertencer ao seu conteúdo (Leopoldini *et al*., 2006; Li *et al.*, 2020).

Não há na literatura estudos que relacionem a quinoa vermelha como potencial quelante de Cd no organismo. No entanto, há relatos de outros compostos vegetais com componentes semelhantes, como as cisteínas, polifenóis e flavonóides que obtiveram efeito de reduzir a deposição de Cd em diferentes órgãos (Winiarska *et al.*, 2018). Estudo de exposição ao Cd em ratos pela ração (7 mg/Kg de ração) e tratados com infusões de chás verde, vermelho e branco reduziram consideravelmente o acúmulo de Cd no tecido cardíaco, pulmonar, renal, cerebral e hepático dos animais expostos, além de melhorar a expressão de marcadores antioxidantes (SOD, Catalase e GPx), os autores atribuíram este efeito aos flavonóides presentes no chá, um possível sítio de ligação do Cd (Winiarska *et al.*, 2015).

Nossos achados demonstraram que a exposição ao Cd reduziu significativamente o peso corporal dos animais independente do co-tratamento com RQH. Esses achados estão em conformidade com estudos anteriores neste mesmo modelo experimental de exposição ao metal (Pinheiro Jr. *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2022; Piagette *et al.*, 2023). As razões pelas quais a exposição ao Cd gera uma perda de peso corporal, podem estar associadas ao aumento do estresse oxidativo, prejudicando a produção de ATP (energia para as atividades celulares), aumento de processo inflamatório no trato gastrointestinal (TGI), além da competição do Cd com minerais essenciais ao organismo, e que pode gerar redução da absorção de nutrientes como proteínas e carboidratos levando a perda de peso. Outro fator que pode estar associado é o dano renal e hepático provocado pela exposição ao metal já relatado em estudos anteriores (Attia *et al.,* 2021; Nguyen *et al.,* 2022; Moraes *et al.,* 2022).

Apesar do tratamento com RQH não impedir a perda de peso provocada pela exposição ao metal no final do período de intervenção, foi capaz de retardar este dano ponderal na primeira semana de tratamento. Este efeito pode ser atribuído ao fato do RQH ter melhorado a ingesta de água e ração dos animais expostos ao Cd durante o tratamento. Em animais SHR tratados com este RQH também foi observado aumento da ingesta líquida dos animais, e este achado foi relacionado ao fato do RQH ter obtido melhor desempenho em testes organolépticos, em especial de palatabilidade e sensorial, onde o RQH apresentou notas doces, se tornando mais agradável para consumo (Moreno *et al.*, 2022).

Essas características do RQH podem ter estimulado o apetite e sede dos animais, que normalmente apresentam apatia, letargia e comportamento depressivo relacionado ao aumento do estresse oxidativo e redução de liberação de neurotransmissores provocados pelo metal (Tian *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2023). Vale ressaltar que as propriedades do RQH, derivado da quinoa, apresentam uma carga alta de proteínas, carboidratos, fibras e lipídios o que pode fornecer para

o animal algum subsídio nutricional extra para as atividades fisiológicas e metabólicas do organismo (Dakhili *et al.,* 2019; Angeli *et al.*, 2020; Moreno *et al.*, 2022).

Outro fator que pode contribuir para este achado são as propriedades reguladoras da flora intestinal pela quinoa, também na sua forma hidrolisada, gerando equilíbrio da disbiose intestinal, reduzindo a quantidade de bactérias patogênicas e aumentando a quantidade de probióticos, já demonstrado em modelo de indução de câncer colorretal (CRC) e em camundongos obesos (Wang *et al.*, 2022; Fan *et al.*, 2023). Isto porque já há evidências que os efeitos do Cd geram desequilíbrio nas bactérias da flora intestinal, aumento da expressão de TMAO (N-óxido de trimetilamina), um importante marcador de doenças metabólicas (Li *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022), também promove alterações no metabolismo lipídico e aumento de marcadores inflamatórios (IL-1β, IL-6 e TNF-α) em rim e fígado (Liu *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2021). Embora não tenha sido objeto de investigação no momento, estes achados são importantes, pois a disbiose da microbiota intestinal pode estar vinculada a inúmeros aspectos que influenciam negativamente no metabolismo, e inclusive a vasculatura (Witkowski *et al.,* 2020; Wang *et al.,* 2018).

A exposição a diferentes doses e tempo de exposição ao Cd, em humanos e também em modelos animais, levam a danos cardiovasculares incluindo a indução de hipertensão arterial, como demonstrado no presente estudo. Correlação positiva do aumento dos níveis de Cd no sangue com elevados níveis de PA, configurando hipertensão arterial foi observado em humanos (Tellez-Plaza *et al.*, 2013; Aramjoo *et al.*, 2022; Chen *et al.,* 2023) e animais (Satarug *et al.*, 2006; Arima *et al.*, 2011; Almenara *et al.*, 2013; Angeli *et al.*, 2013; Pinheiro Jr. *et al.*, 2020) chegando a níveis de hipertensão grau I, como neste estudo (Ministério da Saúde, Brasil).

Sabe-se que o aumento da PA depende do volume do débito cardíaco e do aumento da resistência vascular periférica. No entanto, em condições patológicas que induzem a HAS, como a exposição a alguns metais pesados, incluindo o Cd (Chen *et al.*, 2023), esse aumento pode estar relacionado também a uma maior ativação simpática, remodelamento vascular, alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumento do estresse oxidativo, liberação de radicais livres e aumento da sinalização de citocinas inflamatórias (Almenara *et al.*, 2013; Angeli *et al.*, 2013; Pinheiro Jr *et al*., 2020; Zhang *et al.*, 2023).

As terapias farmacológicas para controle da PA são iniciadas quando já está estabelecido o quadro de HAS com danos importantes no organismo (Wermelt *et al.*, 2017). Porém, na hipertensão induzida por exposição seja crônica ou aguda por metais pesados, como o Cd, embora se realize controle pressórico e tratamentos convencionais, deve-se levar em consideração a exposição diária a que se está suscetível devido à contaminação, seja de maneira ocupacional, ambiental ou acidental, sofrendo com a deposição desse metal, de longa meia-vida,

no organismo e com todos os efeitos deletérios provocados, já citadas anteriormente (Genchi *et al.*, 2020).

Dessa forma, alternativas funcionais de origem natural, com menor impacto ambiental possível, que atuem de forma sinérgica como antioxidante e anti-inflamatório, prevenindo o surgimento da HAS e minimizando os danos causados pela exposição ao metal, representam uma abordagem promissora a ser explorada em estratégias terapêuticas para proteção cardiovascular. Demonstramos neste estudo que o co-tratamento com o RQH, um hidrolisado derivado da quinoa, impediu o surgimento da hipertensão induzida pela intoxicação por Cd, além de proteger a vasculatura dos efeitos do metal.

As propriedades cardioprotetoras e anti-hipertensivas da quinoa, foram previamente relatadas *in vitro*, onde sequências peptídicas apresentaram potencial inibidor da ECA (Guo *et al.*, 2020). No entanto, alguns estudos *in vivo* em ratos SHR também demonstraram efeito cardioprotetor e anti-hipertensivo, porém, relacionam este efeito ao poder antioxidante da proteína isolada da quinoa (Zheng *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2021; Ruiqi *et al.*, 2024).

Este potencial anti-hipertensivo também foi observado para a quinoa vermelha hidrolisada, a mesma utilizada no presente estudo por López-Moreno *et al*. (2023) em ratos SHR com a dose de 1g/Kg/dia em água de beber por oito semanas, importante destacar que o tratamento iniciou no momento que a hipertensão já estava estabelecida nos animais, e eles observaram uma redução da pressão arterial em ~9.8 ± 4.5 mmHg. Também em animais SHR, porém utilizando o conteúdo proteico da quinoa da variação Mengli-I (200 e 400 mg/Kg) por curto (2-4h) e longo período de tratamento (cinco semanas) os níveis de PA dos animais reduziram significativamente (Guo *et al.*, 2021). Neste mesmo estudo, foram identificadas sequências peptídicas (YRNAIMAPHYN, TRGDIIAIPPGAVH, FHPFPR e NIFRPF) com poder inibitório da ECA, alguns principalmente por serem di e/ou tripeptídeos, possuem a característica de serem facilmente absorvidos no intestino, potencializando seu efeito anti-hipertensivo (Guo *et al.*, 2020; 2021).

No presente RQH, algumas sequências peptídicas identificadas podem ser promissoras para relacionar ao efeito anti-hipertensivo encontrado nos animais co-tratados pela presença de His, Leu, Val e Pro. Estes aminoácidos presentes nas sequencias TETVRFF, VDHPVFL, VPIYEGY, YIRRGEAKL, KLYGPE podem possuir potencial efeito vasodilatador e influenciar a produção de óxido nítrico (NO) para liberação no músculo liso vascular (Shobako *et al.,* 2021), no entanto, para determinar qual das sequências peptídicas específicas possui potencial efeito anti-hipertensivo, seria necessário realizar investigações experimentais sobre suas propriedades de forma isolada o que não é o objetivo do estudo em questão.

Ressalta-se que a hipertensão essencial, de origem genética, difere do modelo utilizado neste estudo, no qual o aumento da pressão arterial foi induzido pela exposição ao metal, configurando hipertensão secundária. Os mecanismos fisiológicos envolvidos no dano vascular variam entre esses dois contextos. No caso da exposição ao cádmio (Cd), é diretamente relacionada ao efeito tóxico do metal sobre o organismo e seus sistemas regulatórios, com impactos significativos nos vasos sanguíneos e nos órgãos-alvo, especialmente relacionados ao aumento do estresse oxidativo, ao processo inflamatório, à disfunção endotelial e ao remodelamento vascular (Angeli *et al.*, 2013; Pinheiro Jr *et al.*, 2020; Genchi *et al.,* 2020; Martins *et al.,* 2021). Nesse sentido, o RQH demonstrou um efeito notável, reduzindo os níveis de pressão arterial no modelo de hipertensão essencial e, de maneira surpreendente, prevenindo completamente o aumento da pressão no modelo deste estudo, evidenciando sua ação multifacetada.

Considerando que as alterações pressóricas promovidas pelo Cd e prevenidas pelo RQH, discutidas até o momento, podem estar diretamente relacionadas a modificações vasculares que desempenham um papel central na regulação da pressão arterial. E, sabendo dos efeitos vasculares promovidos pelo Cd já demonstrados previamente neste modelo experimental, como a vasoconstrição em artérias de condutância e resistência (Pinheiro Jr. *et al.,* 2020) assim como em modelo de baixa exposição (Almenara *et al.,* 2013). Observamos que de fato, a exposição por 14 dias ao $CdCl_2$ em altas doses, aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em aorta e a noradrenalina em MRA, corroborando os estudos anteriores este aumento da resposta contrátil tem sido descrito em segmentos de aorta ou MRA após exposição aguda ou crônica ao Cd em diferentes doses e tempos de exposição (Almenara *et al.*, 2013; Angeli *et al.,* 2013; Pinheiro Jr. *et al,* 2020).

A disfunção endotelial, característica em doenças cardiovasculares, afeta tanto vasos de resistência quanto de condutância, embora os mecanismos e as consequências possam variar devido às diferenças funcionais e estruturais desses tipos de vasos (Aires, 2018). Pode ser observada pela redução do relaxamento vascular e aumento do tônus vasoconstritor, o que promove a modulação no controle do fluxo sanguíneo local (Deanfield *et al.,* 2007).

Neste estudo, o relaxamento induzido por ACh foi preservado em ambos os leitos vasculares, de maneira divergente de estudos anteriores utilizando este modelo que observaram disfunção no relaxamento apenas em artéria de resistência (Pinheiro Jr *et al.*, 2020; Moraes *et al.,* 2022; Piagette *et al.,* 2023). No entanto, a disfunção endotelial observada pelo aumento da contração vascular foi mantida, configurando a disfunção endotelial induzida pelo metal.

Cabe ressaltar que o aumento desta resposta contrátil, a Phe e NE, induzido pelo Cd não foi devido a um aumento na capacidade contrátil geral dos vasos uma vez que as respostas ao cloreto de potássio não foram afetadas pela exposição ao Cd nos vasos estudados.

No entanto, este hidrolisado vegetal, o RQH, preveniu totalmente este aumento da resposta contrátil em ambos os leitos vasculares, o que pode ser uma das chaves para entender seu poder anti-hipertensivo. O aumento da resposta vasoconstritora à Phe observado após a exposição ao Cd já foi atribuído à redução da modulação endotelial (Angeli *et al.*, 2013; Pinheiro Jr. *et al., 2*020; Moraes *et al.,* 2022; Piagette *et al.,* 2023), considerando que o endotélio regula o tônus vascular por meio da liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras. E de fato, após retirada mecânica do endotélio em aorta, observamos uma menor resposta vasoconstritora à Phe de ratos expostos ao Cd, o que já havia sido demonstrado como via de ação deste metal (Almenara *et al.,* 2013; Pinheiro Jr. *et al.,* 2020), porém o RQH promoveu uma maior modulação endotelial nesse vaso, preservando o endotélio dos efeitos do Cd.

Sabendo que o óxido nítrico (NO) é um dos principais vasodilatadores derivados do endotélio e desempenha um papel crucial na modulação das respostas contráteis vasculares (Nemmiche *et al.,* 2016; Tarafdar *et al.,* 2018; Pinheiro Jr. *et al.,* 2020), investigamos sua contribuição utilizando o L-NAME, um inibidor inespecífico da NOS que permite avaliar a influência direta do NO na regulação do tônus vascular em aorta e MRA. Observamos que o co-tratamento com RQH preveniu a redução da participação do NO na resposta contrátil a Phe/NE nos animais tratados com Cd, mantendo a biodisponibilidade de NO no endotélio, assim como, em aorta, aumenta a expressão de eNOS, enzima responsável pela produção de óxido nítrico (NO) no endotélio vascular (Rabêlo *et al.,* 2010; Cuypers *et al.,* 2010). Pela razão do RQH apresentar alta atividade antioxidante *in vitro* (Moreno *et al.*, 2022), atribuímos esse resultado a redução da expressão de ROS vascular em MRA e aorta.

Uma vez demonstrada uma melhora significativa da participação do NO na resposta contrátil vascular promovida pelo RQH nas artérias expostas ao Cd, as vias pelas quais este efeito protetor foi alcançado foram investigadas. Inicialmente, partimos do conhecimento prévio das vias pelas quais ocorre os efeitos do metal, como a participação do ânion superóxido na resposta vascular induzida pelo metal, descritas por Pinheiro Jr. *et al.*, (2020), em mesmo modelo de exposição ao Cd do presente estudo, além dos efeitos antioxidantes previamente conhecidos deste RQH *in vitro* e *in vivo* em animais SHR (Moreno *et al.*, 2022; López-Moreno et al., 2023). Assim, reforçamos os achados anteriores de que, de fato, o Cd induz ao aumento de O_2^-, contribuindo para a amplificação da resposta contrátil em ambos os leitos vasculares, como observado nas

curvas dos anéis incubados com SOD e Tiron, além da expressão de NOX-1, p47phox e análises bioquímicas de parâmetros de estresse oxidativo (ROS e peroxidação lipídico). O co-tratamento com RQH, devido ao seu efeito antioxidante, atenuou o estresse oxidativo induzido pelo Cd, impedindo não apenas o estabelecimento do dano vascular, mas também a expressão de proteínas geradoras de estresse oxidativo vascular, incluindo à produção de ROS e à peroxidação lipídica vascular.

É sabido que o aumento do estresse oxidativo e exacerbação da expressão de ROS, oriundos majoritariamente da super-ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase no endotélio vascular, especialmente da isoforma NOX-1 e NOX-2, está relacionado com a redução da biodisponibilidade de NO endotelial (Lassègueb *et al.,* 2010; Rabêlo *et al.,* 2010). De fato, o poder antioxidante deste hidrolisado, ao manter a biodisponibilidade de NO nas respostas vasculares dos animais expostos ao Cd, reduzindo a participação e expressão de ROS em ambos os leitos vasculares estudados, parece ser mediada principalmente pela redução da ativação exacerbada da NADPH oxidase (NOX-1), demonstrada por imunofluorescência. Também agiu impedindo o aumento de peroxidação lipídica nos vasos e em plasma e evitando o aumento da capacidade antioxidante, aumentada no grupo Cd de uma forma compensatória.

O papel antioxidante do RQH também foi evidenciado em ratos SHR, com redução dos níveis de peroxidação lipídica em rins, coração e plasma, além de aumentar o poder antioxidante no tecido renal e aumentar os níveis de glutationa no tecido hepático (López-Moreno *et al*., 2023). O efeito antioxidante da quinoa já foi demonstrado com um polissacarídeo de baixo peso molecular, quinoa hidrolisada e extrato de quinoa em macrófagos humanos, modelo de larvas de Zebrafish e células prostáticas tumorais respectivamente (Hu *et al.,* 2021; Vilcacundo *et al.*, 2017; Gawlink *et al.*, 2013).

Geralmente as propriedades observadas derivadas de quinoa hidrolisada com pepsina são atribuídas a suas sequências peptídicas com prováveis efeitos antioxidantes, como observado in vitro por Shi *et al.* (2019) que identificou a sequência YIEQGNGISGLMIPG, e adicionalmente atribuiu ação antitrombótica e potencial inibitório da ECA. Neste estudo identificamos nove sequências peptídicas com potencial antioxidante e como explicado anteriormente este potencial está relacionado pelos peptídeos conterem, especialmente, histidina, tirosina, leucina e prolina (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005; Matsui *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2018; Laguerre *et al.*, 2013). Essas características conferem as sequências peptídicas encontradas neste estudo potencial efeito antioxidante, que de fato observamos ao tratar os animais expostos

ao Cd com o RQH, e como havia sido previamente observado em modelo SHR (López-Moreno *et al.,* 2023).

Na literatura foi realizada a identificação de outras sequências peptídicas derivadas da albumina hidrolisada do farelo de quinoa com alcalase e tripsina (ASPKPSSA e QFLLAGR), onde foram capazes de atuar como "sequestradoras" de -OH, uma espécie reativa altamente tóxica e também a sequência peptídica (RGQVIYVL) demonstrou alto poder de inibição da ECA (Zheng *et al.*, 2019).

Outros estudos envolvendo compostos vegetais demonstraram poder antioxidante no sistema cardiovascular frente à exposição ao Cd. Em exposição crônica ao Cd (100 ppm de $CdCl_2$ na água de beber, por 60 dias), animais tratados com caseína derivada da soja, obtiveram melhora significativa nos níveis de peroxidação lipídica em aorta, no entanto, não observaram diferenças na expressão proteica de algumas enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) nos animais co-tratados (Pérez-Díaz *et al.,* 2013). Destacamos que no modelo de exposição a altas doses de Cd utilizado neste estudo o insulto deletério ao sistema cardiovascular foi de maior intensidade, e mesmo assim o RQH demonstrou alto poder antioxidante.

Outro estudo interessante, porém de exposição a baixas doses de Cd (10 mg/L na água de beber) tratou os animais com curcumina (2 ml/Kg via gavagem) por dezesseis semanas, houve redução em 48% da pressão arterial dos animais, supressão da expressão de O_2^- em artéria carótida e de gp91-phox, subunidade da NADPH oxidase, já em aorta dos animais, o tratamento restaurou parcialmente os níveis de eNOS e preveniu parcialmente o aumento peroxidação lipídica e de proteína carbonilada (marcador de estresse oxidativo) em plasma (Tubsakul *et al.*, 2021). Foram observadas respostas semelhantes aos nossos achados em relação ao estresse oxidativo, no entanto, nossos resultados mostraram maior efetividade nos danos vasculares, ao impedir o aumento da PA completamente, mantendo a níveis de controle, e impedir o aumento da expressão e participação de ROS e citocinas inflamatórias nas respostas vasculares, levando em consideração também que o modelo de exposição ao Cd do nosso estudo é de alta dose.

O Cd além do alto poder oxidativo ao sistema cardiovascular, também promove exacerbação de cascatas inflamatórias, como aumento da COX-2, e de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α, como observado neste estudo e corroborando estudos anteriores Angeli *et al.*, 2013; Pinheiro Jr. *et al.*, 2020; Arbi *et al.*, 2021; Piagette *et al.*, 2023). No entanto, de forma inovadora demonstramos o poder anti-inflamatório do RQH, que até então apenas havia sido reportado como anti-hipertensivo e antioxidante, e de acordo com os achados deste estudo reduziu a participação de COX-2 na vasoconstrição de aorta e MRA, além de reduzir a expressão

de COX-2 em ambos os leitos vasculares e TNF-α em aorta, que foram aumentados pela exposição ao Cd.

Embora se tenha evidências do potencial anti-inflamatório da quinoa em apresentações como em grãos, farelo, sementes, em extrato, polissacarídeos, peptídeos isolados e iogurte de quinoa (Mahdavi *et al.*, 2022), pouco se sabe deste potencial quando ocorre a hidrólise. Estudo in vitro com proteína isolada da quinoa hidrolisada com tripsina, reduziu a expressão de marcadores inflamatórios como NFKB, IL-6 e IL-8 em células humanas de câncer de colón (Fan *et al.*, 2022), porém não há ainda estudos in *vivo* que relacionem a quinoa hidrolisada com propriedades anti-inflamatórias.

Sabe-se que as respostas inflamatórias vasculares podem ser mediadas pelo aumento do estresse oxidativo, aumento de ROS circulantes livres, dessa forma, ao utilizar um antioxidante pode-se ter uma resposta anti-inflamatória associada. Alguns estudos já relacionaram o aumento de ROS vascular, como H_2O_2, com a ativação da expressão de COX-2, tromboxanos e prostanóides contráteis (Hernanz *et al., 2*013). Um estudo utilizando células musculares lisas humanas, demonstrou que ao silenciar o gene de NOX-1 celular houve a inibição do aumento da expressão de tromboxano-2, derivado da via da COX-2 (Muzaffar *et al.*, 2011). Sugerindo que há um ciclo de retroalimentação entre estresse oxidativo e a exacerbação de citocinas e prostanóides inflamatórios vasculares.

Sabe-se que os danos provocados pela exposição ao Cd estão interligados no organismo, sejam eles oxidativos, inflamatórios ou apoptóticos, não há um consenso na literatura sobre qual dano inicializa o outro, nem há muitos estudos demonstrando no sistema cardiovascular, em especial, detalhes de ativação e desenvolvimento de vias inflamatórias e apoptóticas (Jung *et al.,* 2008; Pinheiro Jr. *et al.*, 2020; Piagette *et al.*, 2023). Em contrapartida, há estudos sobre o viés oxidativo dos danos do metal no leito vascular (Almenara *et al.,* 2013; Pinheiro *et al.,* 2020; Almenara *et al.,* 2023; Sepulchro *et al.*, 2023). No que concerne ao uso da quinoa, em particular na sua forma hidrolisada, há escassez de estudos demonstrando o seu potencial anti-inflamatório que demonstramos pela redução expressão da participação da COX na resposta vascular de animais tratados com RQH.

Uma das possíveis razões pela quais a quinoa possa desempenhar papel anti-inflamatório é por possuir polifenóis, flavonóides, como a quercetina, e saponinas, conhecidos glicosídeos com poder anti-inflamatório, ácidos fenólicos e aminoácidos importantes para o organismo. O uso da saponina isolada *in vitro* derivada da quinoa e o uso de lusina um peptídeo com propriedades anticancerígenas, em macrófagos de ratos, reduziu a expressão de citocinas inflamatórias, como o TNF-α e IL-6, sugerindo efeito anti-inflamatório (Yao *et al.*, 2014; Ren *et*

al., 2017). Em outros modelos animais, de resistência a insulina, dieta hiperlipídica e de colite ulcerativa, o uso quinoa pura, em forma de iogurte ou em farelo, demonstrou melhora na expressão de TNF-α e IL-1β, IL-6, marcadores de processo inflamatório em plasma, fígado e cólon respectivamente (Erfidan *et al.*, 2022; Liu *et al.,* 2022; Obaroakpo *et al.,* 2020).

Das sequências peptídicas elencadas no RQH, algumas tem potencial anti-inflamatório, relacionado ou não ao seu potencial antioxidante, são as que possuem histidina (H), prolina (P), tirosina (Y), triptofano (W), aspartato (D) e ácido glutâmico (E), são candidatas, como a PIYEGY, YPIIADPK, YIRRGEAKL e TETVRFF (Cicero *et al.,* 2016; Dadar *et al.,* 2018). Reforça-se que os efeitos deste hidrolisado possivelmente são sinérgicos e da maneira como é administrado não pode ser atribuído somente a um componente.

Sabe-se que a partir do aumento de estresse oxidativo provocado pela exposição ao Cd, ROS livre celular, pode ocorrer a ativação de proteínas quinases como JNK e p38 MAPK, estas que estão relacionadas na literatura com ativação da via de apoptose intrínseca (Cao *et al.,* 2021). Também há relação com o aumento da expressão de TNF-α e a ativação de marcadores apoptóticos (Van *et al.*, 1998). Estudo anterior do nosso grupo, utilizando o mesmo modelo de exposição do presente trabalho, demonstrou que a exposição ao Cd gerou o aumento da expressão de Caspase-3 no leito vascular (Piagette *et al.,* 2023).

Um estudo demonstrou que o uso de quinoa pura em animais resistentes à insulina, reduziu a ativação de marcadores apoptóticos como BCL-2, BAX-2 e Caspase-3, e relacionaram a ativação da via apoptótica com o aumento do processo inflamatório observado nos animais (Erfidan *et al.*, 2022). E, outros vegetais diferentes da quinoa como um hidrolisado da proteína das sementes da peônia com alcalase na exposição de embriões de Zebrafish por Cd (2 g/L durante 144 horas), reduziu significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IFN-γ e de marcadores de apoptose como Caspase-3, Caspase-9 e C-Jun aumentados nas amostras expostas somente ao Cd (Li *et al.*, 2022). No presente estudo observamos que o RQH, além do poder antioxidante, reduziu a expressão da citocina pró-inflamatória TNF-α, que pode ser chave para a ativação de via apoptótica intrínseca nas células, conferindo proteção ao vaso.

Destacamos que os achados deste estudo trouxeram de forma inovadora um novo caminho terapêutico para os danos do Cd ao sistema cardiovascular. Vale ressaltar que a quinoa é um pseudocereal, de origem vegetal, de fácil cultivo, fácil acesso, baixo custo, rica em nutrientes, com baixíssimo impacto ambiental, sem glúten e que de maneira hidrolisada tem uma potencialização de seus efeitos (Angeli *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2020; López-Moreno *et al.*, 2023). O RQH apresentou ser uma excelente alternativa para mitigar os danos do Cd ao sistema

cardiovascular, apresentando poder anti-hipertensivo, antioxidante e de forma surpreendente anti-inflamatória, podendo ter estes efeitos benéficos em outros modelos de exposição ao Cd e também de exposição a outros metais pesados.

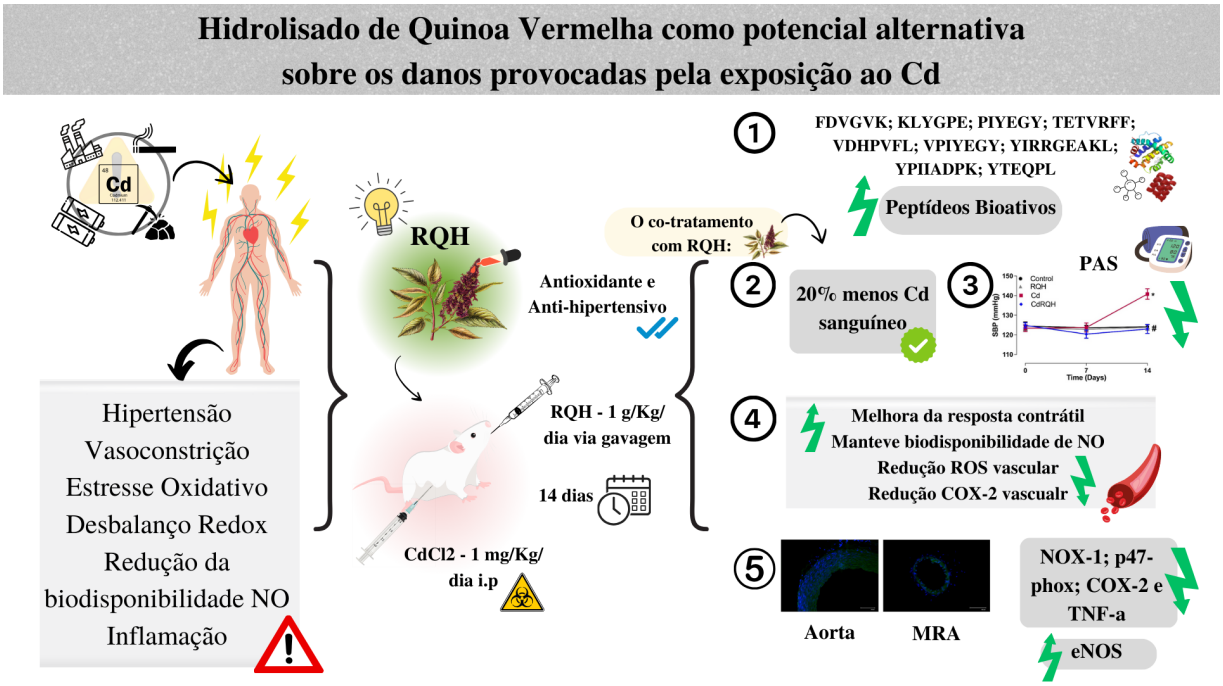

Figura 18 - Resumo gráfico do presente estudo (fonte: própria autora).

7 CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos nesta dissertação demonstram que o RQH, utilizado como suplemento dietético, exerce um efeito protetor significativo contra os danos cardiovasculares induzidos pela exposição a altas concentrações de Cd. Além de seus conhecidos efeitos anti-hipertensivos e antioxidantes, este estudo revelou de forma inédita a capacidade do RQH de atuar como um agente anti-inflamatório nos vasos de resistência e condutância, além da capacidade quelante. Esses achados reforçam o potencial do RQH como uma alternativa terapêutica funcional para mitigar os efeitos prejudiciais da exposição ao Cd, com implicações relevantes para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares advindas da exposição a este metal.

Sinteticamente, ao final do tratamento, o RQH reduziu os níveis de PAS aumentados pela exposição ao Cd, reduziu a concentração de Cd no sangue dos animais, impediu o aumento da resposta contrátil vascular provocada pela exposição ao Cd, manteve os níveis de NO endotelial biodisponíveis, impediu a exacerbação de ROS oriundos do complexo enzimático da NADPH oxidase, impediu o aumento de peroxidação lipídica em plasma e nos vasos, além de manter a níveis de controle a expressão da capacidade antioxidante, exacerbada pela exposição ao Cd e atuou de forma anti-inflamatória reduzindo a participação de COX-2 na resposta vascular, além de reduzir a expressão de TNF-α, uma citocina pró-inflamatória chave na ativação de inúmeras respostas danosas do organismo. Os achados apresentados demonstraram que o RQH, derivado de um vegetal, a quinoa, pode ser uma alternativa terapêutica aos danos provocados ao organismo pela exposição a metais pesados, como o Cd.

Ressaltamos que são necessários mais estudos para elucidar o comportamento do RQH frente a outros modelos de exposição (diferentes doses de Cd e outros metais pesados), além de investigar seus efeitos em fêmeas, ainda pouco explorado na literatura, tanto os danos que o Cd provoca no sistema cardiovascular, quanto os possíveis efeitos do RQH frente aos possíveis danos.

8 REFERÊNCIAS

5° Relatório Anual do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e Costeira Adjacente – PMBA/ES – CL 165. Disponível em: https://drive.google.com/drive/folders/1B_MUdCfqfXH-K5xssSnb01NDr2tFMh5F. Acesso em: 11 nov. 2024.

ÁFRICA SANCHIZ, M. et al. The experimental proteome of *Leishmania infantum* promastigote and its usefulness for improving gene annotations. *Genes*, v. 11, n. 9, p. 1036–1036, 2 set. 2020.

AIRES, Margarida de Mello. Fisiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 1 recurso online. ISBN 9788527734028.

AJAYI, F. F. et al. Novel plant-protein (quinoa) derived bioactive peptides with potential anti-hypercholesterolemic activities: identification, characterization and molecular docking of bioactive peptides. *Foods*, v. 12, n. 6, p. 1327, 20 mar. 2023.

AKIRA TSUGITA et al. C-terminal sequencing of protein. European Journal of Biochemistry, v. 206, n. 3, p. 691–696, 1 jun. 1992.

ALBERTO, C.; ALEIXO, R. Major recent failures in Brazilian mine waste containment facilities, current cases of maximum emergency level and imminent risk of rupture, and a brief sustainability analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 13 set. 2024.

ALMENARA, C. P. et al. Cessation restores blood pressure levels and endothelial function affected by cadmium exposure on rats. *Biological Trace Element Research*, v. 201, n. 4, p. 1955–1964, abr. 2023.

ALMENARA, C. et al. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. v. 8, n. 7, p. e68418–e68418, 12 jul. 2013.

ALONSO, R. et al. Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Biological Sciences*, v. 11, n. 5, p. 546–558, 2015.

ALPSOY, S. et al. Protective effects of onion extract on cadmium-induced oxidative stress, histological damage, and apoptosis in rat heart. *Biological Trace Element Research*, v. 159, n. 1-3, p. 297–303, 17 abr. 2014.

ALUKO, R. E.; MONU, E. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, v. 68, n. 4, p. 1254–1258, maio 2003.

ANGELI et al. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. v. 65, p. 838–848, 1 dez. 2013.

ANGELI, V. et al. Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): an overview of the potentials of the "golden grain" and socio-economic and environmental aspects of its cultivation and marketization. *Foods*, v. 9, n. 2, 19 fev. 2020.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 243, de 26 de julho de 2018. *Diário Oficial da União*, nº 144, 27 jul. 2018.

ARAMJOO, H. et al. The association between environmental cadmium exposure, blood pressure, and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, n. 24, p. 35682–35706, 7 mar. 2022.

ARBI, S. et al. Adverse cardiovascular effects of exposure to cadmium and mercury alone and in combination on the cardiac tissue and aorta of Sprague-Dawley rats. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, v. 56, n. 6, p. 609–624, 2021.

ARCARO, É. et al. Use of the term whole grain on the label of processed and ultra-processed foods based on cereals and pseudocereals in Brazil. *Frontiers in Nutrition*, v. 9, 15 ago. 2022.

ARIMA, H.; BARZI, F.; CHALMERS, J. Mortality patterns in hypertension. *Journal of Hypertension*, v. 29, p. S3–S7, dez. 2011.

ARRUEBARRENA, M. A. et al. Mechanisms of Cadmium Neurotoxicity. International *Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 23, p. 16558, 21 nov. 2023.

ARTEGA-SILVA, M. Neuroendocrine effects of cadmium exposure on male reproductive functions. *Frontiers in Bioscience*, v. 26, n. 2, p. 286–326, 2021.

ASGARY, S.; RASTQAR, A.; KESHVARI, M. Functional food and cardiovascular disease prevention and treatment: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 37, n. 5, p. 429–455, 1 jul. 2018.

ATTIA, S. M. et al. Cadmium: An emerging role in adipose tissue dysfunction. *Exposure and Health*, v. 14, n. 1, p. 171–183, 10 set. 2021.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cadmium. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2012. p. 1–12.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, v. 16, n. 1, p. 42–47, fev. 2004.

BALARAMAN, R. et al. Cadmium-induced hypertension in rats. *Pharmacology*, v. 38, n. 4, p. 226–234, 1989.

BARCHI, J. J.; STRAIN, C. N. The effect of a methyl group on structure and function: Serine vs. threonine glycosylation and phosphorylation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 10, 10 fev. 2023.

BASTOS, M. D. Pesquisa de polimorfismo HLA e não HLA em pessoas com diabetes mellitus tipo 1 e com doença celíaca. *UFRGS.br*, 2016.

BATISTA, B. L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Analytica Chimica Acta*, v. 646, n. 1–2, p. 23–29, jul. 2009.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium in human population. *Experientia*, v. 40, n. 2, p. 143–152, fev. 1984.

BERNHOFT, R. A. Cadmium toxicity and treatment. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1–7, 2013.

BHARDWAJ, J. K. et al. Revisiting cadmium-induced toxicity in the male reproductive system: An update. *Archives of Toxicology*, v. 98, n. 11, p. 3619–3639, nov. 2024.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, v. 18, n. 1, p. 1–29, jan. 1992.

BISHAK, Y. K. et al. Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 16, n. 1, p. 9–21, 4 fev. 2015.

BO, W. et al. Application of quantitative structure-activity relationship to food-derived peptides: Methods, situations, challenges and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, v. 114, p. 176–188, ago. 2021.

BOUIDA, L. et al. A review on cadmium and lead contamination: Sources, fate, mechanism, health effects and remediation methods. *Water*, v. 14, n. 21, p. 3432, 28 out. 2022.

BOUVARD, V. et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, v. 16, n. 16, p. 1599–1600, dez. 2015.

BUÑAG, R. D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal of Applied Physiology*, v. 34, n. 2, p. 279–282, fev. 1973.

BURRIEZA, H. P. et al. Shotgun proteomic analysis of quinoa seeds reveals novel lysine-rich seed storage globulins. *Food Chemistry*, v. 293, p. 299–306, 2019.

BUSSO, D. et al. A Quinoa Protein Hydrolysate Fractionated by Electrodialysis with Ultrafiltration Membranes Improves Maternal and Fetal Outcomes in a Mouse Model of Gestational Diabetes Mellitus. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 67, n. 21, 4 set. 2023.

CAO, X. et al. Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway. *Chemosphere*, v. 263, p. 128346–128346, 1 jan. 2021.

CARROLL, R. The Relationship of Cadmium in the Air to Cardiovascular Disease Death Rates. v. 198, n. 3, p. 267–267, 17 out. 1966.

CARVALHO, F. M. et al. Intoxicação por chumbo e cádmio em trabalhadores de oficinas para reforma de baterias em Salvador, Brasil. Revista de Saúde Pública, v. 19, n. 5, p. 411–420, out. 1985.

CHEN, H. et al. Associations of blood lead, cadmium, and mercury with resistant hypertension among adults in NHANES, 1999–2018. *Environmental Health and Preventive Medicine*, v. 28, n. 0, p. 66–66, 1 jan. 2023.

CHEN, S. et al. Association of blood cadmium with all-cause and cause-specific mortality in patients with hypertension. *Frontiers in Public Health*, v. 11, 4 jul. 2023.

CHIROMA, T. et al. Comparative assessment of heavy metal levels in soil, vegetables and urban grey wastewater used for irrigation in Yola and Kano. *International Refereed Journal of Engineering and Science (IRJES)*, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2014.

CHOU, S.-H. et al. Cadmium exposure induces histological damage and cytotoxicity in the cardiovascular system of mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 175, p. 113740–113740, 1 maio 2023.

CHU, Z. et al. Lability, bioaccessibility, and ecological and health risks of anthropogenic toxic heavy metals in the arid calcareous soil around a nonferrous metal smelting area. *Chemosphere*, v. 307, p. 136200–136200, 1 nov. 2022.

CICERO, A. F. G.; FOGACCI, F.; COLLETTI, A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of Pharmacology,* v. 174, n. 11, p. 1378–1394, 29 set. 2016.

CIOSEK, Ż.; KOT, K.; ROTTER, I. Iron, Zinc, Copper, Cadmium, Mercury, and Bone Tissue. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 20, n. 3, p. 2197, 26 jan. 2023.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. *Diário Oficial da União*, 2009.

CULLEN, J. T.; MALDONADO, M. T. Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. In: *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*. p. 31–62, 3 nov. 2012.

CUYPERS, A. et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals*, v. 23, n. 5, p. 927–940, 2 abr. 2010.

DADAR, M. et al. Antiinflammatory peptides: current knowledge and promising prospects. *Inflammation Research*, v. 68, n. 2, p. 125–145, 17 dez. 2018.

DAKHILI, S. et al. Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, v. 299, p. 125161, 30 nov. 2019.

DAYRES VITORIA; FARIAS, J.; GRASSO, M. Bactérias e metais pesados são encontrados na água do RS após enchentes. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/nacional/bacterias-e-metais-pesados-sao-encontrados-na-agua-do-rs-apos-enchentes/>. Acesso em: 11 nov. 2024.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*, v. 115, n. 10, p. 1285–1295, 13 mar. 2007.

DEERING, K. E. et al. Low-level cadmium exposure and cardiovascular outcomes in elderly Australian women: A cohort study. *International journal of hygiene and environmental health* (Print), v. 221, n. 2, p. 347–354, 1 mar. 2018.

DRUMMOND, G. R. et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 10, n. 6, p. 453–471, jun. 2011.

EBADI, M. et al. THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ZINC AND METALLOTHIONEIN. *Neurochemistry International*, v. 29, n. 2, p. 159–166, 1 ago. 1996.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 48, n. 5, p. 430–441, 8 maio 2008.

ELSOHAIMY, S. A.; REFAAY, T. M.; ZAYTOUN, M. A. M. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 60, n. 2, p. 297–305, dez. 2015.

ENGSTRÖM, A. et al. Associations between dietary cadmium exposure and bone mineral density and risk of osteoporosis and fractures among women. *Bone*, v. 50, n. 6, p. 1372–1378, jun. 2012.

ERFIDAN et al. The effect of quinoa (Chenopodium quinoa) on apoptotic, autophagic, antioxidant and inflammation markers in glucocorticoid-induced insulin resistance in rats. Molecular Biology Reports, v. 49, n. 7, p. 6509–6516, 26 maio 2022.

Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization technical report series, v. 776, p. 1–64, 1989.

FAN, X. et al. Anti-Colon Cancer Activity of Novel Peptides Isolated from In Vitro Digestion of Quinoa Protein in Caco-2 Cells. *Foods*, v. 11, n. 2, p. 194, 12 jan. 2022.

FAN, X. et al. Supplementation of quinoa peptides alleviates colorectal cancer and restores gut microbiota in AOM/DSS-treated mice. *Food Chemistry*, v. 408, p. 135196, maio 2023.

FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, jun. 2010.

FAULKNER, E.; SCHWARTZ, R. High Performance Pigments. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003, p. 13–26.

FERNANDES, T. et al. Chronic Cadmium Exposure Accelerates the Development of Atherosclerosis and Induces Vascular Dysfunction in the Aorta of ApoE−/− Mice. *Biological Trace Element Research*, v. 187, n. 1, p. 163–171, 29 abr. 2018.

FREITAS, C. M. et al. Da Samarco em Mariana à Vale em Brumadinho: desastres em barragens de mineração e saúde coletiva. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 35, p. e00052519, 20 maio 2019.

FRIBERG, L.; KJELLSTRÖM, T.; NORDBERG, G. F. Cadmium. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*. New York: Elsevier, Vol. 2: 130–18, 1986.

FRIBERG, L.; VAHTER, M. Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring: Results of a UNEP/WHO global study. *Environmental Research*, v. 30, n. 1, p. 95–128, fev. 1983.

FUJISHIRO, H. et al. Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics*, v. 4, n. 7, p. 700, 2012.

GAËLLE ANGENARD et al. Cadmium Increases Human Fetal Germ Cell Apoptosis. v. 118, n. 3, p. 331–337, 1 mar. 2010.

GAO, Y. et al. A longitudinal study on urinary cadmium and renal tubular protein excretion of nickel–cadmium battery workers after cessation of cadmium exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, v. 89, n. 7, p. 1137–1145, 4 jul. 2016.

GANGULY, K. et al. Cadmium in tobacco smokers: a neglected link to lung disease? *European Respiratory Review*, v. 27, n. 147, p. 170122, 28 mar. 2018.

GAWLIK-DZIKI, U. et al. Antioxidant and anticancer activities of Chenopodium quinoa leaves extracts – In vitro study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 57, p. 154–160, 1 jul. 2013.

GENCHI, G. et al. The effects of cadmium toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 11, p. 3782, 26 maio 2020.

GEORGE, M.; GOYER, R. A.; LILIANE DELAQUERRIERE-RICHARDSON. Cadmium-metallothionein-induced nephropathy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 38, n. 2, p. 399–408, 1 nov. 1976.

GIL, H. et al. Effect of glutathione on the cadmium chelation of EDTA in a patient with cadmium intoxication. *Human & Experimental Toxicology*, v. 30, n. 1, p. 79–83, 1 jan. 2011.

GO, Y.-M. et al. Low-Dose Cadmium Causes Metabolic and Genetic Dysregulation Associated With Fatty Liver Disease in Mice. v. 147, n. 2, p. 524–534, 16 jul. 2015.

GORAN BJELAKOVIĆ; GLUUD, C. Surviving Antioxidant Supplements. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, n. 10, p. 742–743, 15 maio 2007.

GOYAL, T. et al. Evaluation of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in occupationally exposed cadmium workers. *Work*, p. 1–7, 22 out. 2020.

GRAVEL, S. et al. Occupational health and safety, metal exposures and multi-exposures health risk in Canadian electronic waste recycling facilities. *Waste Management*, v. 165, p. 140–149, 1 jun. 2023.

GU, J. et al. Cadmium perturbed lipid profile and induced liver dysfunction in mice through phosphatidylcholine remodeling and promoting arachidonic acid synthesis and metabolism. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 247, p. 114254, jan. 2022.

GUO, H. et al. Administration with Quinoa Protein Reduces the Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats and Modifies the Fecal Microbiota. *Nutrients*, v. 13, n. 7, p. 2446, 17 jul. 2021.

GUO, H. et al. Antihypertensive effect of quinoa protein under simulated gastrointestinal digestion and peptide characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, n. 15, p. 5569–5576, 1 jul. 2020.

HAJFATHALIAN, M. et al. Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 58, n. 18, p. 3097–3129, 11 out. 2017.

HASSLER, E.; LIND, B.; M PISCATOR. Cadmium in blood and urine related to present and past exposure. A study of workers in an alkaline battery factory. *Occupational and Environmental Medicine*, v. 40, n. 4, p. 420–425, 1 nov. 1983.

HE, Z. et al. Cadmium induces liver dysfunction and ferroptosis through the endoplasmic stress-ferritinophagy axis. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 245, p. 114123–114123, 1 out. 2022.

HENRY, C. J. Functional foods. European Journal of Clinical Nutrition, v. 64, n. 7, p. 657–659, jul. 2010.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. et al. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 3, p. 588–593, 14 jan. 2005.

HERNANZ, R. et al. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. Clinical Science, v. 126, n. 2, p. 111–121, 13 set. 2013.

HIATT, V.; HUFF, J. E. The environmental impact of cadmium: An overview. *International Journal of Environmental Studies*, v. 7, n. 4, p. 277–285, jan. 1975.

HOSSEIN-KHANNAZER, N. et al. The effects of cadmium exposure in the induction of inflammation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 42, n. 1, p. 1–8, 3 dez. 2019.

HU, Y. et al. Chemical characterization, antioxidant, immune-regulating and anticancer activities of a novel bioactive polysaccharide from Chenopodium quinoa seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 99, p. 622–629, 1 jun. 2017.

HUANG, D. et al. Dietary Lysine Levels Improved Antioxidant Capacity and Immunity via the TOR and p38 MAPK Signaling Pathways in Grass Carp, Ctenopharyngodon idellus Fry. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 25 fev. 2021.

HUANG, R. et al. Protective effect of quercetin on cadmium-induced renal apoptosis through cyt-c/caspase-9/caspase-3 signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, 16 ago. 2022.

INABA, T. et al. Estimation of cumulative cadmium intake causing itai-itai disease. *Toxicology Letters*, v. 159, n. 2, p. 192–201, nov. 2005.

JIANG, P. et al. Enzymatically Partially Hydrolyzed α-Lactalbumin Peptides for Self-Assembled Micelle Formation and Their Application for Coencapsulation of Multiple Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 49, p. 12921–12930, 25 out. 2018.

JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F. et al. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 316, n. 1, p. 42–52, 1 jan. 2006.

JOHRI, N.; JACQUILLET, G.; UNWIN, R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *BioMetals*, v. 23, n. 5, p. 783–792, 31 mar. 2010.

JUMARIE, C. Cadmium transport through type II alveolar cell monolayers: contribution of transcellular and paracellular pathways in the rat ATII and the human A549 cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v. 1564, n. 2, p. 487–499, ago. 2002.

JUNG, Y. et al. Cadmium induces apoptotic cell death through p38 MAPK in brain microvessel endothelial cells. European Journal of Pharmacology, v. 578, n. 1, p. 11–18, 1 jan. 2008.

KAH, M.; LEVY, L.; BROWN, C. Potential for effects of land contamination on human health. 1. The case of cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part B, v. 15, n. 5, p. 348–363, jul. 2012.

KARAMI, Z.; AKBARI-ADERGANI, B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 535–547, 1 jan. 2019.

KELLEY, C. Cadmium therapeutic agents. Current pharmaceutical design, v. 5, n. 4, p. 229–40, abr. 1999.

KIM, J. et al. Smoking and passive smoking increases mortality through mediation effect of cadmium exposure in the United States. Scientific Reports, v. 13, n. 1, 8 mar. 2023.

KIM, N. D. Studies in the concentrations and chemistry of cadmium in the environment. *ir.canterbury.ac.nz*, 1990.

KINUTHIA, G. K. et al. Levels of heavy metals in wastewater and soil samples from open drainage channels in Nairobi, Kenya: community health implication. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 8434, 2020.

KJELLSTRÖM, T. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. IARC scientific publications, n. 118, p. 301–10, 1992.

KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. METALLOTHIONEIN: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 39, n. 1, p. 267–294, abr. 1999.

KNOFLACH, M. et al. Non-Toxic Cadmium Concentrations Induce Vascular Inflammation and Promote Atherosclerosis. *Circulation Journal*, v. 75, n. 10, p. 2491–2495, 2011.

KOZIOŁ, M. J. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 5, n. 1, p. 35–68, mar. 1992.

LAGUERRE, M. et al. How to boost antioxidants by lipophilization? *Biochimie*, v. 95, n. 1, p. 20–26, jan. 2013.

LASSÈGUEB.; GRIENDLING, K. K. NADPH Oxidases: Functions and Pathologies in the Vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 30, n. 4, p. 653–661, abr. 2010.

LAUWERYS, R. R.; BUCHET, J. P.; ROELS, H. The relationship between cadmium exposure or body burden and the concentration of cadmium in blood and urine in man. I*nternational Archives of Occupational and Environmental Health*, v. 36, n. 4, p. 275–285, 1976.

LEOPOLDINI, M. et al. Iron Chelation by the Powerful Antioxidant Flavonoid Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 17, p. 6343–6351, ago. 2006.

LI, D. et al. Quercetin Alleviates Ferroptosis of Pancreatic β Cells in Type 2 Diabetes. *Nutrients*, v. 12, n. 10, p. 2954, 27 set. 2020.

LI, X. et al. Trimethylamine-N-Oxide Pathway: A Potential Target for the Treatment of MAFLD. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 8, p. 733507, 2021.

LI, Y. et al. Protective effects of tree peony seed protein hydrolysate on Cd-induced oxidative damage, inflammation and apoptosis in zebrafish embryos. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 126, p. 292–302, 30 maio 2022.

LIAN, S. et al. Cadmium induces matrix metalloproteinase-9 expression via ROS-dependent EGFR, NF-κB, and AP-1 pathways in human endothelial cells. *Toxicology*, v. 338, p. 104–116, 1 dez. 2015.

LIN, H.-C.; HAO, W.-M.; CHU, P.-H. Cadmium and cardiovascular disease: An overview of pathophysiology, epidemiology, therapy, and predictive value. *Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)*, v. 40, n. 8, p. 611–617, ago. 2021.

LIU, J. et al. Quinoa bran soluble dietary fiber ameliorates dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis in BALB/c mice by maintaining intestinal barrier function and modulating gut microbiota. *International journal of biological macromolecules*, v. 216, p. 75–85, jan. 2022.

LIU, M. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of phenolic compounds from white, red, and black Chenopodium quinoa seed. *Cereal Chemistry*, v. 97, n. 3, p. 703–713, 24 abr. 2020.

LIU, Y. et al. Exposing to Cadmium Stress Cause Profound Toxic Effect on Microbiota of the Mice Intestinal Tract. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e85323, 3 fev. 2014.

LOETCHUTINAT, C et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 72, n. 2-3, p. 323–331, 1 fev. 2005.

LÓPEZ-MORENO, M. et al. Red Quinoa Hydrolysates with Antioxidant Properties Improve Cardiovascular Health in Spontaneously Hypertensive Rats. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, v. 12, n. 6, p. 1291, 16 jun. 2023.

LYNCH, H.; JOHNSTON, C.; WHARTON, C. Plant-Based Diets: Considerations for Environmental Impact, Protein Quality, and Exercise Performance. *Nutrients*, v. 10, n. 12, p. 1841, 1 dez. 2018.

MA, S. et al. Increased serum levels of cadmium are associated with an elevated risk of cardiovascular disease in adults. Environmental science and pollution research international, v. 29, n. 2, p. 1836–1844, jan. 2022.

MA, Y. et al. Cadmium exposure exacerbates kidney damage by inhibiting autophagy in diabetic rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 267, p. 115674, Autumn 2023.

MA, Y. et al. Cadmium toxicity: A role in bone cell function and teeth development. *Science of The Total Environment*, v. 769, p. 144646, maio 2021.

MA, Y. et al. The Effect of Oxidative Stress-Induced Autophagy by Cadmium Exposure in Kidney, Liver, and Bone Damage, and Neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 21, p. 13491, 1 jan. 2022.

MAANI, T. et al. Environmental impacts of recycling crystalline silicon (c-SI) and cadmium telluride (CDTE) solar panels. *Science of The Total Environment*, v. 735, p. 138827, set. 2020.

MAHDAVI, A. M. et al. Effects of Quinoa (Chenopodium quinoa) on inflammatory mediators: a systematic review of preclinical studies. *Inflammopharmacology*, v. 31, n. 1, p. 241–251, 4 nov. 2022.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 137, p. 111178, mar. 2020.

MARTINS, A. C. et al. Endothelial Dysfunction Induced by Cadmium and Mercury and its Relationship to Hypertension. *Current hypertension reviews*, v. 17, n. 1, p. 14–26, 1 abr. 2021.

MASCAGNI, P. et al. Olfactory Function in Workers Exposed to Moderate Airborne Cadmium Levels. *NeuroToxicology*, v. 24, n. 4-5, p. 717–724, ago. 2003.

MATOVIĆ, V. et al. Cadmium Toxicity Revisited: Focus on Oxidative Stress Induction and Interactions with Zinc and Magnesium. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v. 62, n. 1, p. 65–76, 1 mar. 2011.

MATSUI, R. et al. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. *Food Chemistry*, v. 245, p. 750–755, abr. 2018.

MATSUO, A. Y. O.; WOOD, C. M.; VAL, A. L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology*, v. 74, n. 4, p. 351–364, set. 2005.

MÉRIDA-ORTEGA, Á. et al. Tobacco smoke exposure and urinary cadmium in women from northern Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 18, n. 23, p. 12581, 29 nov. 2021.

MESSNER, B.; BERNHARD, D. Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. *BioMetals*, v. 23, n. 5, p. 811–822, 7 mar. 2010.

MĘŻYŃSKA, M. et al. Extract from Aronia melanocarpa L. Berries Prevents Cadmium-Induced Oxidative Stress in the Liver: A Study in A Rat Model of Low-Level and Moderate Lifetime Human Exposure to this Toxic Metal. *Nutrients*, v. 11, n. 1, p. 21, 21 dez. 2018.

MILLEN, A. E.; DODD, K. W.; SUBAR, A. F. Use of vitamin, mineral, nonvitamin, and nonmineral supplements in the United States: the 1987, 1992, and 2000 National Health Interview Survey results. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 104, n. 6, p. 942–950, jun. 2004.

MIR, N. A.; RIAR, C. S.; SINGH, S. Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 75, p. 170–180, maio 2018.

MIRKAMALI, M. et al. Involvement of caspase-3 in apoptosis of human lymphocytes exposed to cadmium chloride. *Human & Experimental Toxicology*, v. 41, p. 096032712211217, jan. 2022.

MITRA, E. et al. Protective effect of aqueous Curry leaf (Murraya koenigii) extract against cadmium-induced oxidative stress in rat heart. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 5, p. 1340–1353, maio 2012.

MOHAMMADI-BARDBORI, A.; RANNUG, A. Arsenic, cadmium, mercury and nickel stimulate cell growth via NADPH oxidase activation. *Chemico-Biological Interactions*, v. 224, p. 183–188, dez. 2014.

MORAES et al. Multi-functional egg white hydrolysate prevent hypertension and vascular dysfunction induced by cadmium in rats. *Journal of functional foods*, v. 94, p. 105131–105131, 1 jul. 2022.

MORALES, A. I. et al. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 210, n. 1-2, p. 128–135, jan. 2006.

MORALES, D.; MIGUEL, M.; GARCÉS-RIMÓN, M. Pseudocereals: a novel source of biologically active peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 61, n. 9, p. 1537–1544, 14 maio 2020.

MORENO, ML. Obtención de hidrolizados de quinua con actividad antioxidante y su efecto sobre el estrés oxidativo asociado a la hipertensión arterial. 2022. Tese (Doutorado) - Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación - Facultad de Ciencias, Departamento de Química Física Aplicada - Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2022.

MUDGAL, V. et al. Effect of Toxic Metals on Human Health. *The Open Nutraceuticals Journal*, v. 3, p. 94–99, 2010.

MUDGIL et al. Multifunctional bioactive peptides derived from quinoa protein hydrolysates: Inhibition of α-glucosidase, dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin I converting enzymes. *Journal of Cereal Science*, v. 96, p. 103130–103130, 1 nov. 2020.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*, v. 41, n. 1, p. 19–26, jul. 1977.

MUZAFFAR, S. et al. NADPH oxidase 1 mediates upregulation of thromboxane A2 synthase in human vascular smooth muscle cells: Inhibition with iloprost. *European Journal of Pharmacology*, v. 658, n. 2-3, p. 187–192, maio 2011.

NAÇÕES UNIDAS, Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais, Divisão de População (2024). World Population Prospects 2024, Edição Online.

NANDAN, A. et al. Nutritional and functional perspectives of pseudocereals. *Food chemistry*, v. 448, p. 139072–139072, 1 ago. 2024.

NASIADEK, M. et al. Subchronic Exposure to Cadmium Causes Persistent Changes in the Reproductive System in Female Wistar Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 1–17, 18 dez. 2019.

NAVARRO DEL HIERRO, J. et al. The hydrolysis of saponin-rich extracts from fenugreek and quinoa improves their pancreatic lipase inhibitory activity and hypocholesterolemic effect. *Food Chemistry*, v. 338, p. 128113, fev. 2021.

NEGIN SHAFAEI et al. Protective Effects of Anethum graveolens Seed's Oil Nanoemulsion Against Cadmium-Induced Oxidative Stress in Mice. *Biological Trace Element Research*, v. 198, n. 2, p. 583–591, 9 mar. 2020.

NEMMICHE, S. Oxidative Signaling Response to Cadmium Exposure. *Toxicological Sciences*, p. kfw222, 1 nov. 2016.

NGUYEN, J. et al. Diabetogenic and Obesogenic Effects of Cadmium in Db/Db Mice and Rats at a Clinically Relevant Level of Exposure. *Toxics*, v. 10, n. 3, p. 107, 23 fev. 2022.

NIELSEN, K. C.; OWMAN, C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Research*, v. 27, n. 1, p. 33–42, 19 mar. 1971.

NIRO, S. et al. Gluten-Free Alternative Grains: Nutritional Evaluation and Bioactive Compounds. *Foods*, v. 8, n. 6, p. 208, 12 jun. 2019.

NOGAWA, K.; KIDO, T. Biological monitoring of cadmium exposure in itai-itai disease epidemiology. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, v. 65, n. S1, p. S43–S46, 1993.

NONGONIERMA, A. B. et al. Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. Journal of Cereal Science, v. 65, p. 112–118, set. 2015.

NORDBERG, G. F. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 238, n. 3, p. 192–200, 1 ago. 2009.

NORDBERG, G. F. Metabolism of Cadmium. Springer eBooks, p. 285–303, 1 jan. 1982.

NWOKOCHA, C. R. et al. Apocynin Ameliorates Cadmium-Induced Hypertension Through Elevation of Endothelium Nitric Oxide Synthase. *Cardiovascular Toxicology*, v. 13, n. 4, p. 357–363, 24 maio 2013.

OBAROAKPO, J. U. et al. α-Glucosidase and ACE dual inhibitory protein hydrolysates and peptide fractions of sprouted quinoa yoghurt beverages inoculated with Lactobacillus casei. *Food Chemistry*, v. 299, p. 124985, nov. 2019.

OBAROAKPO J. U. et al. The hyperglycemic regulatory effect of sprouted quinoa yoghurt in high-fat-diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice via glucose and lipid homeostasis. *Food & Function*, v. 11, n. 9, p. 8354–8368, 1 jan. 2020.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

OLSZOWSKI, T. et al. Pro-inflammatory properties of cadmium. *Acta biochimica Polonica*, v. 59, n. 4, p. 475–82, 2012.

ONWUKA, F. C. et al. Protective Effects of Ginger Toward Cadmium-Induced Testes and Kidney Lipid Peroxidation and Hematological Impairment in Albino Rats. *Journal of Medicinal Food*, v. 14, n. 7-8, p. 817–821, 1 jul. 2011.

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

PARK, J. D.; LIU, Y.; KLAASSEN, C. D. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals 11 Supported by NIH grant ES-01142. *Toxicology*, v. 163, n. 2-3, p. 93–100, 1 jun. 2001.

PARK, S. L. et al. Cadmium stimulates the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and JNK activation in cerebrovascular endothelial cells. *Journal of pharmacological sciences*, v. 110, n. 3, p. 405–9, jul. 2009.

PEANA, M. et al. Biological effects of human exposure to environmental cadmium. *Biomolecules*, v. 13, n. 1, p. 36, 24 dez. 2022.

PÉREZ-DÍAZ, F. et al. Protective effect of soybeans as protein source in the diet against cadmium-aorta redox and morphological alteration. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 272, n. 3, p. 806–815, 1 nov. 2013.

PÉREZ DÍAZ, M. F. et al. A soybean-based diet modulates cadmium-induced vascular apoptosis. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, v. 52, p. 239–246, mar. 2019.

PERRY, H. M.; ERLANGER, M. W. Metal-induced hypertension following chronic feeding of low doses of cadmium and mercury. The Journal of laboratory and clinical medicine, v. 83, n. 4, p. 541–7, abr. 1974.

PHUAGKHAOPONG, S. et al. Cadmium-induced IL-6 and IL-8 expression and release from astrocytes are mediated by MAPK and NF-κB pathways. *NeuroToxicology*, v. 60, p. 82–91, may 2017.

PIAGETTE et al. Pretreatment with egg white hydrolysate protects resistance arteries from damage induced after treatment with accidental cadmium exposure values. *Journal of Functional Foods*, v. 104, p. 105529–105529, maio 2023.

PINHEIRO JR, E. et al. Egg White Hydrolysate Mitigates Cadmium-induced Neurological Disorders and Oxidative Damage. *Neurochemical Research*, v. 49, n. 6, p. 1603–1615, 14 fev. 2024.

PINHEIRO JR, E. G. et al. Cadmium exposure activates NADPH oxidase, renin-angiotensin system and cyclooxygenase 2 pathways in arteries, inducing hypertension and vascular damage. *Toxicology Letters*, v. 333, p. 80–89, 15 out. 2020.

PINHEIRO, JR. E. G. et al. Egg white hydrolysate prevents reproductive impairments induced by cadmium in rats. *Journal of Functional Foods*, v. 67, p. 103823, 14 fev. 2020.

PINHEIRO, P. et al. Mining dam failures in Brazil: Comparing legal post-disaster decisions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 18, n. 21, p. 11346–11346, 28 out. 2021.

PIÑUEL, L. et al. Production of White, Red and Black Quinoa (Chenopodium quinoa Willd Var. Real) Protein Isolates and Its Hydrolysates in Germinated and Non-Germinated Quinoa Samples and Antioxidant Activity Evaluation. *Plants*, v. 8, n. 8, p. 257, 30 jul. 2019.

PIRZADAH, T. B.; MALIK, B. Pseudocereals as super foods of 21st century: Recent technological interventions. *Journal of Agriculture and Food Research*, v. 2, p. 100052, dez. 2020.

PROZIALECK, W. C. et al. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, v. 102, n. 2, p. 207–218, 1 abr. 2008.

RABÊLO, L. A. et al. Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 94, n. 5, p. 684–693, maio 2010.

RAGAN, H. A.; MAST, T. J. Cadmium Inhalation and Male Reproductive Toxicity. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, p. 1–22, 1990.

RAHIMZADEH RAFATI; S KAZEMI; AA MOGHADAMNIA. Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian journal of internal medicine*, v. 8, n. 3, p. 135–145, 2017.

RANI, A. et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research*, v. 24, n. 4, p. 378–399, 11 out. 2013.

RAY, R., SHAH, AJAY M. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science*, v. 109, n. 3, p. 217–226, 1 set. 2005.

REN, G. et al. Detection of lunasin in quinoa (Chenopodium quinoaWilld.) and thein vitroevaluation of its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 97, n. 12, p. 4110–4116, 6 abr. 2017.

ROCKWELL, P. Redox regulates COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium. *Cellular Signalling*, v. 16, n. 3, p. 343–353, mar. 2004.

RUIQI, L.; HE, Z. Effects of quinoa on cardiovascular disease and diabetes: a review. *Frontiers in nutrition*, v. 11, p. 1470834, abr. 2024.

RZYMSKI, P. et al. Impact of heavy metals on the female reproductive system. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 22, n. 2, p. 259–264, 11 maio 2015.

RZYMSKI, P. et al. Metal status in human endometrium: Relation to cigarette smoking and histological lesions. *Environmental Research*, v. 132, p. 328–333, jul. 2014.

SALAMI, M. et al. The novel homologue of the human α-glucosidase inhibited by the non-germinated and germinated quinoa protein hydrolysates after in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of food biochemistry*, v. 46, n. 1, p. e14030, jan. 2022.

SANCHO, R. A. S.; PASTORE, G. M. Alimentos Funcionais: a Revolução Silenciosa na Alimentação. *Revista Processos Químicos*, v. 10, n. 19, p. 13–24, 4 jan. 2016.

SANGARTIT et al. Tetrahydrocurcumin Protects against Cadmium-Induced Hypertension, Raised Arterial Stiffness and Vascular Remodeling in Mice. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, p. e114908–e114908, 11 dez. 2014.

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

SATARUG, S. et al. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental Health Perspectives*, v. 118, n. 2, p. 182–190, fev. 2010.

SCHROEDER, H. A. Cadmium hypertension in rats. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, v. 207, n. 1, p. 62–66, 1 jul. 1964.

SEOK, S. M. et al. COX-2 is associated with cadmium-induced ICAM-1 expression in cerebrovascular endothelial cells. *Toxicology Letters*, v. 165, n. 3, p. 212–220, 9 maio 2006.

SEPULCHRO MULHER, L. C. C. et al. In vitro cadmium exposure induces structural damage and endothelial dysfunction in female rat aorta. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, v. 36, n. 6, p. 1405–1420, dez. 2023.
SEPULVEDA, J.; MOELLER, A. H. The Effects of Temperature on Animal Gut Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. 384, 10 mar. 2020.

SHADI ABU-HAYYEH et al. Cadmium Accumulation in Aortas of Smokers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 21, n. 5, p. 863–867, 1 maio 2001.

SHARMA, P. et al. Cadmium exposure activates Akt/ERK Signaling and pro-inflammatory COX-2 expression in human gallbladder epithelial cells via a ROS dependent mechanism. *Toxicology in Vitro*, v. 67, p. 104912, 6 jun. 2020.

SHI, Z. et al. Functional properties and adipogenesis inhibitory activity of protein hydrolysates from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*.). *Food Science & Nutrition*, v. 7, n. 6, p. 2103–2112, 17 maio 2019.

SHOBAKO, N. Hypotensive peptides derived from plant proteins. *Peptides*, v. 142, p. 170573, ago. 2021.

SINICROPI, M. S. et al. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Archives of Toxicology*, v. 84, n. 7, p. 501–520, 13 abr. 2010.

SOISUNGWAN SATARUG et al. Kidney Dysfunction and Hypertension: Role for Cadmium, P450 and Heme Oxygenases? T*ohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 3, p. 179–202, 1 mar. 2006.

SORET, S. et al. Climate change mitigation and health effects of varied dietary patterns in real-life settings throughout North America. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 100, n. suppl_1, p. 490S495S, 4 jun. 2014.

SWINDELL, W. R. Metallothionein and the biology of aging. *Ageing Research Reviews*, v. 10, n. 1, p. 132–145, jan. 2011.

TARAFDAR, A.; PULA, G. The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 12, p. 3824, 30 nov. 2018.

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

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

THIJSSEN, S. et al. Chronic exposure of mice to environmentally relevant, low doses of cadmium leads to early renal damage, not predicted by blood or urine cadmium levels. *Toxicology*, v. 229, n. 1-2, p. 145–156, jan. 2007.

TIAN, X. et al. Physical activity reduces the role of blood cadmium on depression: A cross-sectional analysis with NHANES data. *Environmental Pollution*, v. 304, p. 119211, 1 jul. 2022.

TORKOVA, A. et al. Structure-Functional Study of Tyrosine and Methionine Dipeptides: An Approach to Antioxidant Activity Prediction. v. 16, n. 10, p. 25353–25376, 23 out. 2015.

TUBSAKUL, A. et al. Curcumin Mitigates Hypertension, Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Rats with Chronic Exposure to Lead and Cadmium. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 253, n. 1, p. 69–76, 2021.

UDECHUKWU, M. C.; COLLINS, S. A.; UDENIGWE, C. C. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides. *Food & Function*, v. 7, n. 10, p. 4137–4144, 2016.

VALLÉE, A. et al. Associations between urinary cadmium levels, blood pressure, and hypertension: the ESTEBAN survey. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 10, p. 10748–10756, 16 jan. 2020.

VAN ANTWERP, D. J. et al. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-κB. *Trends in Cell Biology*, v. 8, n. 3, p. 107–111, mar. 1998.

VERGILIO, C. dos S. et al. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 3 abr. 2020.

VERZELLONI, P. et al. Cadmium exposure and cardiovascular disease risk: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Environmental Pollution*, v. 345, p. 123462, 29 jan. 2024.

VILCACUNDO, R. et al. Digestibility of Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) Protein Concentrate and Its Potential to Inhibit Lipid Peroxidation in the Zebrafish Larvae Model. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 72, n. 3, p. 294–300, 22 ago. 2017.

VILCACUNDO, R.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Release of dipeptidyl peptidase IV, α-amylase and α-glucosidase inhibitory peptides from quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, v. 35, p. 531–539, ago. 2017.

WANG, M. et al. Exploring the long-term impact of a cadmium pollution accident on microbial communities in river ecosystems. *Biogeochemistry*, 13 jul. 2024.

WANG, T.-Y. et al. Quinoa Reduces High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Potential Microbiota-Gut-Brain-Liver Interaction Mechanisms. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 3, 29 jun. 2022.

WANG, Z.; ZHAO, Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease. *Protein & Cell*, v. 9, n. 5, p. 416–431, maio 2018.

WATERS, R. S. et al. EDTA Chelation Effects on Urinary Losses of Cadmium, Calcium, Chromium, Cobalt, Copper, Lead, Magnesium, and Zinc. *Biological Trace Element Research*, v. 83, n. 3, p. 207–221, 2001.

WEN, S.; WANG, L. Cadmium neurotoxicity and therapeutic strategies. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, v. 38, n. 3, p. e23670, mar. 2024.

WERMELT, J. A.; SCHUNKERT, H. Management der arteriellen Hypertonie. Herz, v. 42, n. 5, p. 515–526, 29 maio 2017.

WHO - World Health Organization. Cadmium in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. *World Health Organization*. jun, p. 1-16, 2011.

WITKOWSKI, M.; WEEKS, T. L.; HAZEN, S. L. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, v. 127, n. 4, p. 553–570, 31 jul. 2020.

WINIARSKA-MIECZAN, A. Protective effect of tea against lead and cadmium-induced oxidative stress—a review. *BioMetals*, v. 31, n. 6, p. 909–926, 13 out. 2018.

WINIARSKA-MIECZAN, A. The potential protective effect of green, black, red and white tea infusions against adverse effect of cadmium and lead during chronic exposure – A rat model study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 73, n. 2, p. 521–529, nov. 2015.

WOLK, A. Potential health hazards of eating red meat. *Journal of Internal Medicine*, v. 281, n. 2, p. 106–122, 6 set. 2016.

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition,* v. 134, n. 3, p. 489–492, 1 mar. 2004.

WU, Y. et al. Phenotypic aging mediates the association between blood cadmium and depression: a population-based study. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 30, n. 15, p. 44304–44315, 1 mar. 2023.

YAHIA, E. M.; CARRILLO-LÓPEZA. Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. *Duxford: Woodhead Publ*, 2019.

YAN, L.-J.; ALLEN, D. C. Cadmium-Induced Kidney Injury: Oxidative Damage as a Unifying Mechanism. *Biomolecules*, v. 11, n. 11, p. 1575, 23 out. 2021.

YANG, H.; SHU, Y. Cadmium Transporters in the Kidney and Cadmium-Induced Nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 1, p. 1484–1494, 1 jan. 2015.

YANG, J. et al. Effects of cadmium on organ function, gut microbiota and its metabolomics profile in adolescent rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 222, p. 112501, out. 2021.

YAO, Y. et al. Anti-Inflammatory Activity of Saponins from Quinoa (Chenopodium quinoaWilld.) Seeds in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages Cells. *Journal of Food Science*, v. 79, n. 5, p. H1018–H1023, 8 abr. 2014.

YILDIZ, M. O. et al. Neuroprotective effects of carvacrol against cadmium-induced neurotoxicity in rats: role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Metabolic Brain Disease*, v. 37, n. 4, p. 1259–1269, 22 mar. 2022.

YUAN, Z. et al. Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution. *Science of The Total Environment*, v. 676, p. 87–96, ago. 2019.

ZHAI, Q.; NARBAD, A.; CHEN, W. Dietary Strategies for the Treatment of Cadmium and Lead Toxicity. *Nutrients*, v. 7, n. 1, p. 552–571, 14 jan. 2015.

ZHANG, J.; OU, C.; CHEN, M. Curcumin attenuates cadmium-induced atherosclerosis by regulating trimethylamine-N-oxide synthesis and macrophage polarization through remodeling the gut microbiota. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 244, p. 114057, out. 2022.

ZHANG, M. et al. Geographic distribution of cadmium and its interaction with the microbial community in the Longjiang River: risk evaluation after a shocking pollution accident. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 22 mar. 2017.

ZHANG, Z. et al. Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 10 jan. 2023.

ZHENG, Y. et al. Isolation of Novel ACE-Inhibitory and Antioxidant Peptides from Quinoa Bran Albumin Assisted with an In Silico Approach: Characterization, In Vivo Antihypertension, and Molecular Docking. *Molecules*, v. 24, n. 24, p. 4562, 12 dez. 2019.

ZOU, T.-B. et al. The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules*, v. 21, n. 1, p. 72, 12 jan. 2016.

9 ANEXO I - Carta de Aprovação do CEUA

CERTIDÃO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA:010/2023

Título: O Hidrolisado de Quinoa Vermelha protege o sistema cardiovascular dos danos induzidos pela exposição
ao Cádmio?

Data da aprovação: 19/05/2023

Período de vigência do projeto: 10/05/2025

Pesquisadores(a): Giulia Alessandra Wiggers Peçanha

Campus: Uruguaiana

Telefone: (55) 999147174

E-mail: giuliapecanha@unipampa.edu.br

Finalidade	**( ) Ensino (X) Pesquisa**
Espécie / Linhagem / Raça	Ratos Wistar
N° de animais	148 Machos e 148 Fêmeas= 296
Peso / Idade	250 a 300g/8 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério da Universidade Federal do Pampa

Assinado eletronicamente por **ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU NEIS**, **Coordenador(a)**, em 19/05/2023, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1129493** e o código CRC **69EC8D63**.

Referência: Processo n° 23100.009505/2023-10 SEI n° 1129493