

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO
CLORETO DE ALUMÍNIO (AlCl₃) SOBRE A
PRESSÃO ARTERIAL, REATIVIDADE
VASCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Patrícia Medeiros Schmidt

URUGUAIANA

2015

PATRÍCIA MEDEIROS SCHMIDT

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CLORETO DE ALUMÍNIO (AlCl₃) SOBRE
A PRESSÃO ARTERIAL, REATIVIDADE VASCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Giulia A. Wiggers Peçanha

Co-orientador: Franck Maciel Peçanha

URUGUAIANA

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

S353e Schmidt, Patrícia Medeiros
Efeitos da exposição aguda ao cloreto de alumínio ($AlCl_3$) sobre a pressão arterial, reatividade vascular e estresse oxidativo em ratos. / Patrícia Medeiros Schmidt.
78 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa, Mestrado em Bioquímica, 2015.
"Orientação: Giulia Alessandra Wiggers".

1. Alumínio. 2. Reatividade vascular. 3. Estresse oxidativo. I. Título.

PATRÍCIA MEDEIROS SCHMIDT

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CLORETO DE ALUMÍNIO (AlCl₃) SOBRE
A PRESSÃO ARTERIAL, REATIVIDADE VASCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 31 de julho de 2015.

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Giulia Alessandra Wiggers Peçanha
Orientadora
(Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA)

Prof^ª. Dr^ª. Simone Noremberg Kunz
(Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA)

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo
(Universidade Federal do Espírito Santo – UFES)

*" Pesquisa para constatar, constatando, intervenho, intervindo
educó e me educó. Pesquisa para conhecer o que ainda não
conheço e comunicar ou anunciar a novidade."*

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, como não poderia deixar de fazer, agradeço por Deus existir em minha vida como uma luz que guia meu caminho, me oferecendo o que preciso nas oportunidades certas.

Agradeço aos meus amorosos pais, meus exemplos, que mesmo distantes fisicamente - e como é longe Uruguaiana! - se fazem sempre presentes em minha vida. Por todos os seus ensinamentos, pelo amor incondicional, pelo suporte emocional. Ao meu pai, por acreditar em mim e em minha capacidade mais do que qualquer pessoa, mais do que eu mesma. À minha mãe, por todas as palavras doces, de incentivo, sua proteção, preocupação, ao seu interesse, sua escuta.

À minha família, principalmente aos meus irmãos, tios, dinda, primos, e à Tereza, sou muito grata por ter o apoio de vocês em minha vida.

Ao Marcos, não sinto só necessidade imensa de agradecer como também de retribuir todos os dias tudo o que fazes por mim, sem pestanejar, incansável. Meu companheiro, meu porto seguro, obrigada por compreender tanto. Te amo!

Agradeço imensamente o apoio e compreensão da família Anselmo, que me acolheu com tanto amor e que sinto verdadeiramente que faço parte. Amo vocês, tenho muitas saudades, e em breve passaremos muitos feriados juntos!

Às minhas queridas vizinhas e amigas Salete, Nany e sua família, agradeço por toda a atenção que me dedicam, pela preocupação e por todo o carinho. Vocês são minha família aqui em Uruguaiana, obrigada por tudo.

Às minhas amigas-irmãs de Caçapava, Carol M., Carol S., Dani, Deise e Lulu: sou eternamente grata por ter amigas como vocês, amizade que não perece ao tempo e à distância. Obrigada pela cumplicidade, lealdade, por todo apoio e infinita compreensão, principalmente de minhas ausências.

Queridas Lilian, Jaq, Ju, Danize, Cla, Joice, Marce, Lisi, Michele e Anelise, amigas que a Unipampa Uruguaiana se encarregou em me presentear e reforçar laços... vocês são essenciais na minha caminhada! Obrigada por participarem e fazerem os momentos da minha vida bem mais alegres.

Agradeço infinitamente à minha orientadora prof.^a Giulia, por ter confiado e dado a mim a oportunidade única de crescer junto à família GPFisCar. Obrigada por ter me proporcionado momentos de grande aprendizado e por todas as palavras;

todas as ocasiões foram de grande importância para mim, e motivo de enorme crescimento pessoal e profissional. De igual importância, sou eternamente grata por ter tido a co-orientação do prof. Franck; foram muitas as conversas, as trocas de ideias e ensinamentos onde aprendi muito, e certamente levarei de vocês muitos exemplos para a vida.

Obrigada à prof.^a Maria Jesús Alonso da Universidad Rey Juan Carlos (España) pela ajuda científica na confecção do artigo.

Aos meus companheiros de orientação do GPFisCar, Paola, Laura, Carol, Alyne, Taiz, Jana, Marília, Guilherme, Malu e Danize: sem vocês esse trabalho não teria sido possível. Vocês foram e são essenciais nessa caminhada de descobertas e muito aprendizado. Obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelas parcerias, pelas risadas, e pelo que ainda não percebi e que certamente foi e será útil dentro e fora do laboratório. Aos colegas Liane, Maquelen, Leandro e Rose, obrigada pela convivência e pelo compartilhamento de conhecimento. À prof. Cleci, sou muito grata a todos os ensinamentos transmitidos neste período.

De igual forma, agradeço aos professores Francielli Cibin, Robson Puntel, Vanderlei Folmer, Cristiane Denardin, Daiana Avila, Irina Lübeck, Elton Denardin e seus orientandos pelo auxílio e disponibilização de equipamentos para análises. Aos amigos e colegas de pesquisa do laboratório 403, muito obrigada pela parceria de sempre.

Um agradecimento especial aos componentes da banca; à prof.^a Simone NoreMBERG Kunz, agradeço por aceitar o convite e por toda sua colaboração desde os tempos de Unipampa Uruguaiana e vizinhança, nos auxiliando a desbravar o mundo do alumínio. Obrigada pela sua amizade, por todo o apoio e disponibilidade. Ao prof. Dalton Valentim Vassallo, agradeço a honra de ter aceitado o convite para participar de minha banca de defesa, além da colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de deixar registrado meu agradecimento ao Curso de Fisioterapia da Unipampa e suas coordenadoras pelo apoio durante estes dois anos.

Por fim, gostaria de agradecer à Unipampa e ao PPGBioq e coordenadores Robson Puntel e Elton Denardin, pela oportunidade de realizar um sonho. Obrigada também a todos os professores do programa pelos ensinamentos transmitidos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CLORETO DE ALUMÍNIO (AlCl₃) SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL, REATIVIDADE VASCULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS

Autora: Patrícia Medeiros Schmidt

Orientadora: Giulia Alessandra Wiggers Peçanha

Co-orientador: Franck Maciel Peçanha

Local e Data da defesa: Uruguaiana, 31 de julho de 2015.

O alumínio (Al) é o metal mais comum da crosta terrestre, e sua elevada biodisponibilidade o torna um importante contaminante ambiental. O Al pode se acumular em vários órgãos e tem sido associado a diversas doenças, principalmente neurodegenerativas. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre seus efeitos no sistema cardiovascular. Assim, este estudo investigou os efeitos da exposição aguda ao cloreto de alumínio (AlCl₃) sobre a pressão arterial, o estresse oxidativo e a reatividade vascular de ratos. Para tal, ratos *Wistar* foram divididos nos grupos: *Untreated*: veículo (água ultrapura, *ip*) e *AlCl₃*: dose única de AlCl₃ (100 mg/kg *ip*). A pressão arterial sistólica e diastólica foi avaliada em ratos anestesiados por meio de canulação da artéria carótida imediatamente antes a administração do AlCl₃ e após 1h. A reatividade de aorta foi realizada em banho de órgãos e curvas concentração-resposta para acetilcolina, nitroprussiato de sódio e fenilefrina foram obtidas na presença e ausência de endotélio, L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase), apocinina (inibidor da NADPH oxidase), TEA (bloqueador dos canais de potássio) e SOD (*scavenger* de ânion superóxido). A produção de óxido nítrico (NO) foi mensurada em artérias; espécies reativas de oxigênio (EROs), malondialdeído (MDA) e níveis de tióis não-proteicos foram avaliados no plasma, assim como as atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase e glutathione-S-transferase (GST). A concentração sérica de alumínio após uma única injeção intraperitoneal de AlCl₃ atingiu 147,7 ± 25,0 µg/L; esta exposição não alterou a pressão arterial, contudo induziu aos seguintes efeitos: 1) diminuição da resposta vasoconstritora à fenilefrina; 2) aumento da modulação endotelial negativa e biodisponibilidade de NO, bem como a produção de EROs vascular pela NADPH oxidase, principalmente ânions superóxido; 3) aumento dos níveis de MDA e tióis; 4)

maior atividade da catalase e GST 5) diminuição da atividade da SOD. Portanto, a exposição aguda ao $AlCl_3$ promove alterações vasculares, e este efeito parece estar associado ao aumento da biodisponibilidade de NO e sua ação sobre os canais de K^+ , provavelmente atuando como um mecanismo compensatório sobre o estresse oxidativo. Estes resultados sugerem que o Al pode ser considerado como um agente tóxico vascular.

Palavras-chaves: Alumínio; reatividade vascular; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Program in Biochemistry
Federal University of Pampa

EFFECTS OF ACUTE EXPOSURE TO ALUMINUM CHLORIDE (AlCl₃) ON BLOOD PRESSURE, VASCULAR REACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS IN RATS

Author: Patrícia Medeiros Schmidt

Advisor: Giulia Alessandra Wiggers Peçanha

Co-advisor: Franck Maciel Peçanha

Date and Place of Defense: Uruguaiana, July 31, 2015

Aluminum (Al) is the most common metal and its high bioavailability points this as an important environmental contaminant. Aluminum can be accumulated in several organs and has been associated with several diseases, mainly neurological disorders. At cardiovascular system, there are not enough evidences of Al-induced dysfunction. We investigated the effects of acute exposure to aluminum chloride (AlCl₃) on blood pressure, oxidative stress and vascular reactivity. Male Wistar rats were divided into groups: *Untreated*: vehicle (ultrapure water, *ip*) and *AlCl₃*: single dose of AlCl₃ (100 mg/kg *ip*). Systolic and diastolic blood pressure were assessed in anesthetized rats by cannulation of carotid artery immediately before and after one hour of aluminum administration. Aortic rings reactivity was investigated in isolated organ bath and concentration-response curves to acetylcholine, sodium nitroprusside and phenylephrine were performed in the presence and absence of endothelium, the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, the NADPH oxidase inhibitor apocynin, the K⁺ channels blocker TEA and the superoxide anion scavenger SOD. Nitric oxide (NO) released was studied in arteries; reactive oxygen species, malondialdehyde and non-protein thiol levels were measured in plasma, as well as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase activities. Serum aluminum concentration after a single intraperitoneal injection of AlCl₃ reaches 147.7 ± 25.0 µg/L. This treatment did not change blood pressure, although inducing the following effects: 1) decreased vasoconstrictor response to phenylephrine; 2) increased negative endothelial modulation and nitric oxide released as well as vascular reactive oxygen species production from NADPH oxidase, mainly superoxide anions; 3) increased malondialdehyde and thiol levels; 4) enhanced catalase and glutathione-S-transferase activities and 5) decreased SOD activity. Therefore, AlCl₃-acute exposure promotes vascular changes. This effect seems to be

associated with increased nitric oxide bioavailability, possibly acting on K⁺ channels, seems to occur probably as a compensatory mechanism on oxidative stress. These results suggest that this metal might be considered as a cardiovascular toxic agent.

Keywords: Aluminum; vascular reactivity; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PARTE I

Figura 1. Produção de alumínio 18

Figura 2. Atividade pró-oxidante do alumínio 24

PARTE II

Figure 1. Effect of $AlCl_3$ on vasoconstrictor response to phenylephrine, vascular relaxation endothelium-dependent and independent 57

Figure 2. Effect of $AlCl_3$ on endothelial response 57

Figure 3. Effect of $AlCl_3$ on NO participation 58

Figure 4. Effect of $AlCl_3$ on K^+ channels 58

Figure 5. Effect of $AlCl_3$ on ROS effects 59

Figure 6. Effect of $AlCl_3$ in superoxide anion participation 59

Figure 7. Effect of $AlCl_3$ on oxidant biomarkers 60

Figure 8. Effect of $AlCl_3$ on antioxidant biomarkers 61

LISTA DE TABELAS

PARTE II

Table 1. Effects of aluminum on maximum response (R_{max}) and sensitivity (pD2) 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR

Alumínio – Al

Análise de variância – ANOVA

Canais de potássio – canais de K⁺

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Cloreto de alumínio – AlCl₃

Cloreto de Tetraetilamônio – TEA

Comitê Científico Internacional de Especialistas em Aditivos Alimentares – JECFA

(do inglês: Expert Committee on Food Additives)

Complexos alumínio-superóxido – AlO₂^{·2+}; Al(OH)(O₂[·])⁺; Al(OH)₂(O₂[·])

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA

Doença de Alzheimer – DA

Erro padrão da média – EPM

Espécies reativas de oxigênio – EROs

Fenilefrina – PHE (do inglês: *phenylephrine*)

Food and Drug Administration – FDA

Glutaciona peroxidase – GPx

Glutaciona-S-transferase – GST

Hemodiálise – HD

Intraperitoneal – *ip*

Íon cálcio – Ca⁺

Íon férrico – Fe³⁺

Íon ferroso – Fe²⁺

L-nitroarginina metil ester – L-NAME

Malondialdeído – MDA

Manganês superóxido dismutase – MnSOD

Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase – NADPH oxidase

Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida – NADH

Nutrição parenteral – NP

Óxido nítrico – NO (do inglês: *nitric oxide*)

Óxido nítrico sintase endotelial – eNOS (do inglês: *endothelial nitric oxide synthase*)

Óxido nítrico sintase endotelial fosforilada – p-eNOS (do inglês: *phosphorylated endothelial nitric oxide synthase*)

Óxido nítrico sintase induzível – iNOS (do inglês: *inducible nitric oxide synthase*)

Peróxido de hidrogênio – H₂O₂

Pressão arterial sistólica - PAS

Resolução da Diretoria Colegiada - RDC

Sistema nervoso central – SNC

Superóxido dismutase – SOD

SUMÁRIO

PARTE I

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Alumínio	17
1.1.1 Caracterização, propriedades e aplicações	17
1.1.2 Exposição humana	19
1.1.3 Efeitos tóxicos nos sistemas	23
1.2 Efeitos tóxicos de metais sobre o sistema cardiovascular	25
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30

PARTE II

ACUTE EXPOSURE TO ALUMINUM CHLORIDE DECREASES VASCULAR REACTIVITY	31
ABSTRACT	32
INTRODUCTION	33
MATERIAL AND METHODS	34
Animals and reagents	34
Blood pressure and aluminum concentration	35
Reactivity experiments	36
NO release	37
Pro-oxidant assay	38
Antioxidant assay	38

Statistical analysis	40
RESULTS	41
Effect of acute AlCl₃-exposure on vascular reactivity	41
Effect of acute AlCl₃-exposure on oxidative stress biomarkers	42
DISCUSSION	42
REFERENCES	47
TABLE	53
FIGURE LEGENDS	54
FIGURES	57
PARTE III	
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO A - Aprovação do projeto pelo CEUA	78

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alumínio

1.1.1 Caracterização, propriedades e aplicações

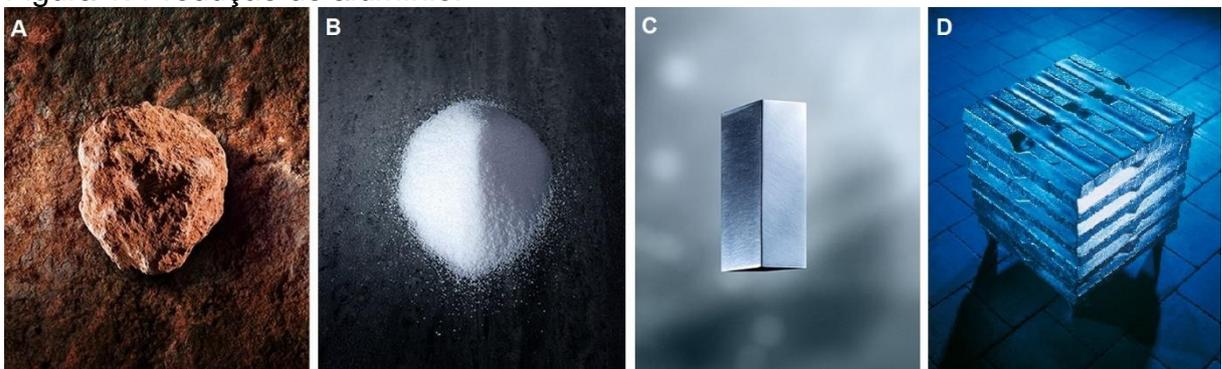
A descoberta do alumínio (Al) data de 1808, quando o britânico Humphry David o nomeou de *aluminium*. Anos mais tarde, em 1821, a bauxita (fig. 1A), minério mais comum à base de alumínio com 52% de óxido de alumínio, foi descoberta pelo francês P. Berthier. A partir de 1850 os estudos evoluíram rapidamente a fim de produzir o alumínio em larga escala. Por fim, em 1886, Paul Louis Toussaint Héroult e Charles Martin Hall, desenvolveram um processo eletrolítico que é utilizado até os dias de hoje na produção do metal empregando o óxido de alumínio, chamado de alumina (fig. 1B), como matéria prima (FARNDON, 2001; TOTTEN; MACKENZIE, 2003; ABAL, 2007).

Na forma elementar, o alumínio é um metal que possui cor branca prateada característica, peso atômico 26,98 e número atômico 13 e pertence, na tabela periódica, ao grupo IIA. É o metal mais comum e o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, porém não é encontrado isolado no estado natural, mas na forma de vários silicatos, como a bauxita (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

A alta valência do alumínio iônico ($+3$) e seu pequeno raio atômico conferem a este metal elevada reatividade, condutividade para calor e eletricidade, maleabilidade, leveza, baixo ponto de fusão, resistência à corrosão e grande reciclabilidade (ALDRIDGE; DOWNS, 2011). Por suas características físico-químicas e pelo seu baixo custo o Al é utilizado em grande escala no mundo por vários setores industriais, com potencial de aplicabilidade praticamente ilimitado. Atualmente é o metal não-ferroso mais largamente utilizado, a extração e purificação de Al a partir de sítios geológicos excede a de qualquer outro metal, com exceção do ferro (USGS, 2014). Devido à versatilidade do metal, a produção anual mundial de Al primário (fig. 1C) a partir do alumina expandiu-se rapidamente desde a Segunda Guerra Mundial, totalizando 52 milhões de toneladas em 2013 (OECD, 2015).

A demanda de Al em países em desenvolvimento como o Brasil tem aumentando rapidamente devido a novas aplicações do Al e suas ligas em infraestrutura, transporte, transmissão elétrica e geração de energia, inclusive em indústrias do petróleo e petroquímicas (POGUE, 2014). O Brasil é o 4º maior produtor mundial de bauxita e detentor da 3ª reserva mineral; é o 3º maior produtor mundial de alumina, e o 8º de alumínio primário, com 1.436 mil toneladas produzidas em 2012 (BRASIL, 2012; CNI, 2012).

Figura 1: Produção de alumínio.



Fonte: *The International Aluminium Institute, 2012.*

(A) Amostra de bauxita, principal minério rico em alumínio. (B) Alumina (óxido de alumínio), matéria prima refinada a partir da bauxita para a produção de (C) alumínio primário. (D) Alumínio reciclado pronto para nova aplicação.

O baixo custo, acentuado pela reciclagem, faz do Al um metal altamente desejável para a indústria. Um grande incentivo para sua reciclagem parece ser o de que a produção de Al reciclado utiliza apenas 5% da energia necessária para produzi-lo novamente (fig. 1D), já que a fusão da sucata exige apenas uma fração da energia necessária para refinar o metal a partir da alumina. Sua extensa reutilização é um aspecto importante de seu uso contínuo, sendo que mais de um terço do alumínio produzido no mundo atualmente advém de fragmentos reciclados (IAI, 2009).

Embora o Al possa ser substituído por outros metais em grande parte de suas aplicações, geralmente as substituições reduzem a qualidade, eficiência, leveza e capacidade de reciclagem. O magnésio, titânio, aço e cobre, por exemplo, podem ser empregados como substitutos ao alumínio em transporte terrestre e engenharia estrutural, em construções e em aplicações elétricas respectivamente. Vidro, papel, plástico e aço também costumam ser alternativas comuns para

embalagens de alumínio (OECD, 2015), porém não possuem a propriedade de reciclagem infinita do alumínio, o que reduz seu custo de produção.

1.1.2 Exposição humana

Apesar de sua extensa presença no mundo, representando cerca de 8% da superfície da terra (SPARLING; LOWE, 1996), o Al é um metal não-essencial aos seres vivos (KAWAHARA, 2011). Além disso, devido aos possíveis efeitos tóxicos tem sido motivo de preocupação e levou a um crescente interesse mundial sobre este metal. A elevada disponibilidade de Al o aponta como um importante contaminante do ambiente, uma vez que a exposição ao Al é inevitável nos dias de hoje.

Além da exposição através da água tratada e de utensílios domésticos para o preparo de alimentos, o alumínio é encontrado também em embalagens e aditivos alimentares, medicamentos antiácidos, vacinas, antitranspirantes, dialisado renal e nutrição parenteral (OLIVEIRA *et al.*, 2010; DARBRE *et al.*, 2011; EL-SAYED *et al.*, 2011; SHAW *et al.*, 2013).

A absorção do alumínio pode se dar pelas vias oral, inalatória, transdérmica e parentérica. Cada uma das superfícies externas do corpo, especialmente pele e mucosa nasal, além de pulmões e trato gastrointestinal, já foram consideradas barreiras que impediam a absorção e acúmulo sistêmico de Al; porém, hoje sabe-se que são as principais vias de absorção do metal e uma fonte que contribui diretamente para o peso corporal total de Al. Do mesmo modo, estas rotas também são alvos para a atividade biológica e, conseqüentemente, a toxicidade deste metal (EXLEY, 2013).

O sulfato de alumínio é utilizado mundialmente nas companhias de tratamento de água para abastecimento como agente floculante, precipitando materiais particulados inorgânicos e microrganismos para filtração (WHO, 2003). Diariamente, a média de ingestão de Al a partir da água pode variar de 80 até 224 µg (ATSDR, 2008). Segundo a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, as concentrações de alumínio em água própria para consumo humano não devem extrapolar o valor máximo permitido de 200 µg/L. No entanto, níveis acima do permitido ainda são encontrados tanto em água tratada (FREITAS *et al.*, 2001) quanto em água de rios. Pereira *et al.* (2007), encontraram 356,04 µg/L de Al nas

águas do rio Murucupi no estado do Pará, concentração acima da estabelecida pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que é de até 100 µg/L. Estes valores elevados podem estar sendo provocados pela poluição antropogênica causada por lixões, fossas e despejos oriundos da produção de alumínio, que pode levar a uma contaminação do lençol freático, com consequente contaminação de cultivos e animais.

Nos seres humanos, alimentos e bebidas contendo alumínio compreendem a maior exposição diária, porém a composição e a acidez da dieta modulam a disponibilidade do metal (BECARIA *et al.*, 2002). O adulto pode absorver aproximadamente 0,5% de uma ingestão de 5 a 10 mg/dia presentes em uma dieta a partir de alimentos naturais, porém este valor parece ser maior e está sendo revisto (TOMLJENOVIC, 2011). Este Al que atinge o sistema circulatório pode se ligar às proteínas e ser eliminada por via renal. No entanto, principalmente em indivíduos com disfunção renal, ou rins ainda imaturos, como o de neonatos, o Al pode se acumular no organismo (YUAN *et al.*, 2012). De igual forma, quando ingerido em doses excessivas, pode ocorrer acúmulo do metal, especialmente no tecido ósseo, fígado, rins, coração, sangue e encéfalo (MAROUANI *et al.*, 2007; BANKS *et al.*, 2006; GEYIKOGLU, *et al.*, 2012; MAILLOUX, 2011).

Na indústria alimentícia, onde compostos de Al são frequentemente utilizados, desde 2007 o Comitê Científico Internacional de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu limite semanal de compostos de alumínio a partir de alimentos de 1 mg/kg, incluindo aditivos alimentares. No entanto, o consumo diário de alimentos contendo aditivos de Al pode chegar a 100 mg/dia (SAIYED; YOKEL, 2005). Além do Al ingerido através da água, alimentos naturais e industrializados, ocorre também a ingestão de até 2 mg/dia do metal a partir de utensílios de cozinha e embalagens alimentícias (ATSDR, 2008). Ainda, indivíduos que utilizam regularmente antiácidos, analgésicos e outros fármacos que contêm alumínio, podem ingerir até 5 g/dia além do habitual (WHO, 2011).

Outra fonte de exposição ao Al comum e que pode ter repercussões negativas aos seres humanos é o uso de antitranspirantes que possuem sais de alumínio em sua composição. Sua aplicação diária na região axilar fornece um elevado tempo de vida e nível de exposição específico na região mamária em torno de 70 mg/dia (FLAREND, 2001). Apesar de órgãos regulamentadores estabelecerem níveis máximos o metal, como o Food and Drug Administration (FDA)

que limita presença máxima de 25% de cloridrato de alumínio nos antitranspirantes (FDA, 2003), elevados níveis de Al no fluido cístico mamário têm sido relacionados ao câncer de mama (DARBRE *et al.*, 2011).

Recentemente, o aumento de adjuvantes de Al presentes em vacinas tem sido relacionado com a prevalência de transtornos do espectro autista em alguns países, porém não há um consenso sobre a relação causal entre ambos (SHAW; TOMLJENOVIC, 2013). O que se sabe é que há sim uma grande exposição ao Al no início da vida, e a imunização é um dos fatores contribuintes. Os neonatos já nascem com um peso corporal sistêmico de alumínio que logo no início da vida eleva-se pela ingestão dietética de leite materno e fórmulas infantis, que podem conter em média 40 µg/L e 225 µg/L de Al, respectivamente. Vacinas e imunizações para tratamento contra alérgenos contendo adjuvantes de alumínio também podem contribuir para este aumento da carga corporal de Al (KEITH *et al.*, 2002). Baseando-se no calendário de vacinação dos Estados Unidos, uma criança de dois meses é exposta à 172,5 µg/kg Al, a maior quantidade quando comparada a outras faixas etárias, como um adulto que recebe apenas 7,1 µg/kg Al (TOMLJENOVIC; SHAW, 2011). Flarend (2001) refere que um indivíduo pode receber até 4,56 mg de Al em um dia a partir de imunizações. Porém, ainda não se sabe se a imunização contínua promove acúmulo progressivo do metal em crianças. Bohrer *et al.* (2014) através da medida de concentração de Al em amostras de cabelo não encontraram correlação significativa entre vacinação e idade em crianças brasileiras imunizadas.

A exposição ao Al através da dieta no início da vida pode ocorrer de outra forma, principalmente em neonatos pré-termo. A nutrição parenteral (NP), utilizada em indivíduos que estão incapacitados de receber alimentação via oral ou enteral, é um processo em que todos os nutrientes necessários são administrados por via intravenosa. Estudos recentes têm demonstrado contaminação de soluções parenterais por alumínio acima de 25 µg/L, limite considerado seguro pelo FDA. De acordo com este órgão, pacientes com insuficiência renal que recebem níveis parenterais de alumínio acima de 4 µg/kg/dia acumulam o metal em níveis associados a toxicidade óssea e do sistema nervoso central (BOHRER *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VEIGA *et al.*, 2013).

Pacientes com insuficiência renal crônica requerem o uso da diálise renal por longo período de tempo, e ao longo dos anos, estes pacientes tendem a apresentar elevada concentração sanguínea de alumínio (hiperaluminemia) e a

acumular este elemento nos tecidos (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A intoxicação por alumínio em pacientes hemodialíticos ocorre quando a concentração sérica do metal é superior a 60 µg/L (K/DOQI, 2003), enquanto que para indivíduos sadios esta concentração deve ficar abaixo de 10 µg/L (ATSDR, 2008). A fim de evitar as consequências desta intoxicação, como a encefalopatia dialítica, órgãos mundiais regulamentam esta terapia, e em nosso país a RDC N° 11 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece normas para o funcionamento de clínicas de hemodiálise (HD), preconizando mensuração semestral de Al na água utilizada, com valor máximo permitido de 10 µg/L. Este mesmo valor é recomendado pela American National Standards Institute (2011) e adotada no mundo; no entanto, atualmente ainda são encontrados níveis acima do recomendado em países em desenvolvimento (BRAIMOH *et al.*, 2012; AL-NASERI, *et al.*, 2013). A contaminação humana também pode ocorrer em casos de avaria mecânica no equipamento de HD, como relatado por Barata *et al.* (1996) onde pacientes em HD encontravam-se com níveis séricos de Al extremamente elevados (506 ± 253 µg/L), e por Ryan *et al.* (2008) quando o nível sérico basal de Al dos pacientes passou de 16 µg/L para 237 µg/L.

O alumínio presente na NP assim como no dialisato renal, por sua via de administração, contorna proteções naturais como pele, trato respiratório, e trato gastrointestinal, podendo mais facilmente depositar-se nos tecidos. Cerca de 40% do alumínio presente na infusão intravenosa é retida em adultos, e até 75% em recém-nascidos (KLEIN, 1995). Além disso, uma vez absorvido, ele permanece no organismo por um longo período de tempo. Priest *et al.* (1995) relataram que a meia-vida do metal é de até sete anos, e em ratos, Rawy *et al.* (2013) encontraram meia-vida de 30,7 dias no fígado, 28,5 nos rins, 85,7 no cérebro, 16,5 no intestino e 19 dias no soro.

Considerando que o alumínio forma compostos hidroxil altamente insolúveis em pH neutro, uma quantidade do alumínio ingerido pode ser excretada nas fezes, possivelmente após sete dias (PRIEST *et al.*, 1995). Uma vez que o metal é absorvido, pode ser parcialmente excretado na urina ou na bile, dependendo da via de administração e da dose do metal. Para níveis dietéticos normais de exposição de alumínio, o sistema biliar parece ser a principal via de excreção até cerca de 26,98 mg de alumínio, quando este sistema é saturado e a excreção renal assume este importante papel. Aproximadamente 90% da excreção de alumínio pelos rins

ocorre em torno de 48 horas após a exposição (BECARIA *et al.*, 2002). Recentemente, um estudo sugeriu que o suor pode ser a maior via de excreção do alumínio sistêmico do organismo, o que coloca em questão a prática de impedir a transpiração utilizando antitranspirantes, em sua grande maioria à base de alumínio (MINSHALL *et al.*, 2014).

1.1.3 Efeitos tóxicos nos sistemas

Devido a sua extensa utilização, são crescentes os níveis de exposição dos seres humanos ao alumínio em suas variadas formas sujeitando a população aos seus efeitos danosos. O Al é potencialmente tóxico ao organismo promovendo ações pró-oxidantes, inflamatórias, imunogênicas e mutagênicas, podendo se acumular e causar alterações fisiopatológicas em diversos órgãos e sistemas (RUIPÉREZ *et al.*, 2012; OESTERLING *et al.*, 2008; DARBRE *et al.*, 2011; SHAW *et al.*, 2013).

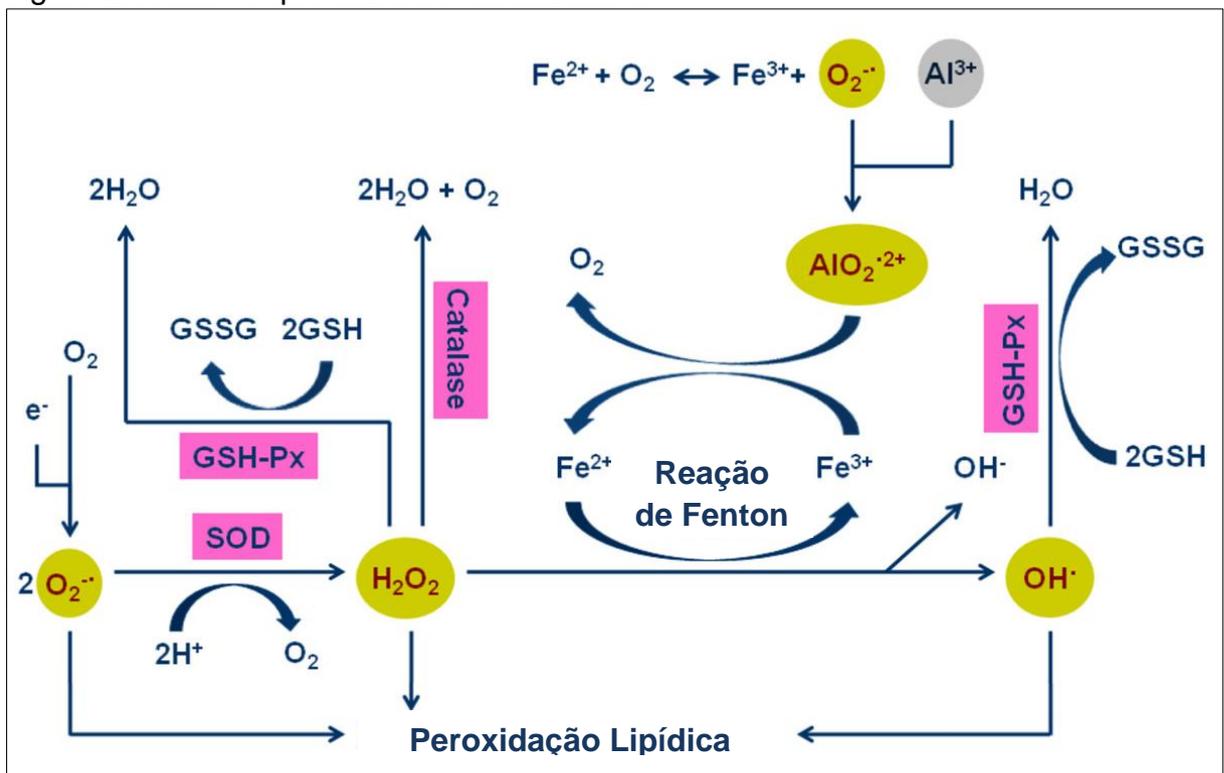
São características de um ambiente oxidativo a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, redução de fluidez de membrana, diminuição acentuada da atividade mitocondrial e alterações de estado redox, disfunções estas todas ligadas à toxicidade do Al (MAILLOUX *et al.*, 2011). Deste modo, o Al demonstra sua influência pró-oxidante criando um ambiente oxidativo intracelular, situação favorável às principais complicações biológicas e doenças.

Exley (2004) sugere que a atividade pró-oxidante do alumínio, exercida em concentrações de exposição encontradas no organismo humano, seja por meio da formação de radicais semi-reduzidos alumínio-superóxido, $\text{AlO}_2^{\cdot 2+}$, $\text{Al}(\text{OH})(\text{O}_2^{\cdot})^+$ e $\text{Al}(\text{OH})_2(\text{O}_2^{\cdot})$. Estes complexos poderiam, além de acelerar oxidações biológicas como a oxidação de NADH, promover a reação de Fenton através da redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , o que impulsionaria oxidações biológicas conduzidas pelo ferro, como a peroxidação lipídica (RUIPÉREZ *et al.*, 2012), como pode ser visto na figura 2.

Estas atividades podem ser mais pronunciadas em estados de doença em que o alumínio tem sido implicado. De fato, níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente dano oxidativo foram encontrados no fígado, rins (GEYIKOGLU, 2012) e cérebro (YUAN, 2012) de ratos expostos ao Al. Estudos recentes demonstram que a exposição ao metal pode estar associada à várias doenças, como a anemia, quando o Al compete com o ferro em diferentes fases da

eritropoiese, incluindo a ligação à transferrina (BECARIA *et al.*, 2002; MAROUANI *et al.*, 2007). Na osteomalácia, o Al pode inibir a remodelação óssea e reduzir a atividade e diferenciação dos osteoblastos, além de inibir a síntese e secreção de hormônios envolvidos no processo de mineralização óssea (LI *et al.*, 2011). Comportando-se como um desregulador endócrino, o Al pode também interferir na expressão do gene sinalizador de regulação do estrógeno, um importante fator na incidência de câncer de mama (HOUSE *et al.*, 2013).

Figura 2: Atividade pró-oxidante do alumínio.



Fonte: Adaptado de YUAN *et al.*, 2012.

Representação esquemática da relação entre o alumínio (cinza), espécies reativas de oxigênio (amarelo), enzimas anti-oxidantes (rosa) e peroxidação lipídica.

A exposição ocupacional a partículas de Al pode desencadear sintomas respiratórios, segundo apontam estudos epidemiológicos com trabalhadores de refinarias do metal. Tais estudos relatam função pulmonar diminuída e fibrose pulmonar intersticial nesta população, levando a doenças ocupacionais como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer de pulmão (BJÖR *et al.*, 2008; FRITSCHI *et al.*, 2008). Em exposição aguda à 8 mg/m^3 de pó de Al em modelo animal, Rocha *et al.* (2010) encontraram após 24 h espessamento dos septos

interalveolares, colapso alveolar e afluxo de células polimorfonucleares, associada a alterações da mecânica pulmonar, sugerindo inflamação respiratória aguda induzida.

Considerado o elemento neurotóxico mais abundante ao qual estamos expostos naturalmente, vários estudos têm relacionado o Al ao aumento do estresse oxidativo e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA) (BHATTACHARJEE *et al.*, 2014). A presença de Al no núcleo de neurônios piramidais de tecido hipocampal e a formação de emaranhados neurofibrilares em regiões citoplasmáticas ricas em Al foram evidenciadas e relacionadas à neurotoxicidade em pacientes com DA (WALTON, 2006). Em animais com DA induzida que foram expostos a tratamento crônico com $AlCl_3$, níveis elevados de malondialdeído (MDA), atividade reduzida das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (GPx) em hipocampo e córtex foram encontrados (CHEN *et al.*, 2013). Pesquisas *in vivo* já evidenciaram danos causados pelo Al no sistema nervoso central (SNC) com aumento da permeabilidade da barreira sangue-cérebro por alterações estruturais no endotélio capilar cerebral (YANG *et al.*, 2008). Na doença degenerativa de Alzheimer, os agregados β -amilóide podem ter sua formação induzida pelo Al através de mecanismo que envolve produção de radicais livres e estresse oxidativo (PRATICÒ *et al.*, 2002) aumentando a permeabilidade dos agregados através da barreira sangue-cérebro, o que facilita o acesso às células cerebrais (BANKS *et al.*, 2006) e interrompe o catabolismo das placas por inibir sua degradação proteolítica (SAKAMOTO *et al.*, 2006). Em estudo de Drago *et al.* (2008) estes conjugados Al- β -amilóide alteraram a homeostase dos íons Ca^{+} , com consequente inibição da respiração mitocondrial em camundongos modelo da DA.

Ainda que a maioria dos estudos relacione os danos causados pelo Al ao SNC, há evidências que apontam o sistema cardiovascular como um potencial alvo deste metal.

1.2 Efeitos tóxicos de metais sobre o sistema cardiovascular

Nos últimos trinta anos, houve um aumento do conhecimento da função vascular, principalmente pelo reconhecimento do papel do endotélio na manutenção do tônus e estrutura dos vasos, através da produção de múltiplos fatores relaxantes e constritores (SILVA *et al.*, 2000). Quando há perda de função endotelial, esta

homeostasia vascular é afetada, deixando os vasos mais suscetíveis à vasoconstrição, assim como modificações aterotrombóticas.

O termo disfunção endotelial é amplamente utilizado para descrever qualquer atividade anormal do endotélio (FLAMMER; LÜSCHER, 2010), porém é mais comumente caracterizado por uma alteração funcional reversível da célula endotelial. Tal disfunção pode ser resultado tanto de deficiência na produção de óxido nítrico (NO), importante fator de relaxamento produzido pelo endotélio, como de sua menor disponibilidade pela ação de EROs (VANHOUTTE et al., 2009).

Nas últimas décadas, os efeitos de metais utilizados nas atividades humanas têm evidenciado sua toxicidade sobre o sistema cardiovascular. Estudos com exposições a mercúrio e chumbo demonstram que estes metais podem induzir hipertensão em humanos e animais, alterando a função endotelial e aumentando o risco cardiovascular (PROZIALECK *et al.*, 2008; FIORIM *et al.*, 2011; RIZZETTI *et al.*, 2013). Também já foi verificado que mercúrio, chumbo e gadolínio, mesmo em pequenas concentrações, podem afetar a reatividade vascular, tendo suas ações mediadas pelo endotélio, resultando principalmente em aumento do estresse oxidativo (VASSALLO *et al.*, 2011).

Estudos prévios demonstraram em animais que o estresse oxidativo causado pela exposição crônica ao mercúrio reduz a biodisponibilidade do NO e altera a expressão da enzima NO sintase, levando a aumento da vasoconstrição e redução da resposta vasodilatadora endotelial (WIGGERS *et al.*, 2008; FURIERI *et al.*, 2011). A disfunção vascular causada por este metal no sistema cardiovascular pode ser atribuída a ativação de várias fontes de EROs, com a NADPH oxidase desempenhando importante papel (RIZZETTI *et al.*, 2013).

De maneira semelhante, a exposição crônica ao cádmio promove aumento da pressão arterial sistólica (PAS), além de estimular a expressão da NOX2, induzindo produção de ânion superóxido pela enzima NADPH oxidase e então reduzindo a biodisponibilidade do NO (ALMENARA *et al.*, 2013). A PAS também aumentou em ratos expostos a chumbo por sete dias. Porém, neste caso, houve uma diminuição da reatividade vascular ocasionada pelo aumento da biodisponibilidade de NO, confirmado pelo aumento das expressões proteicas das enzimas NO sintase endotelial fosforilada (p-eNOS) e NO sintase induzível (iNOS). Tal efeito provavelmente se deve a mecanismo regulatório contra a PAS elevada, o

que parece ocorrer em estágios iniciais de exposição ao chumbo (FIORIM *et al.*, 2011).

As principais ações de metais, demonstrado em estudos em animais e humanos, são o aumento da produção de radicais livres e desequilíbrio do estado redox, dentre outros. Estudos evidenciam que os metais tóxicos, mesmo em baixas doses, podem ser um fator de risco ambiental para doenças cardiovasculares (PROZIALECK *et al.*, 2008; VASSALLO *et al.*, 2011). O estresse oxidativo, envolvido na disfunção endotelial causada por metais pode contribuir para inflamação, dano vascular e desenvolvimento de aterosclerose. A exposição contínua a estes metais, seguida da sua absorção pode ser perigosa para a função cardiovascular, pois alterações vasculares resultantes dessas ações podem ser um importante mecanismo subjacente ao aumento do risco cardiovascular.

No entanto, apesar de bem descrito na literatura o efeito pró-oxidante do Al, e tomado o fato de que o estresse oxidativo é um grande agente desencadeante de distúrbios cardiovasculares, evento bem notado em intoxicações por outros metais, pouco sabemos sobre o efeito do Al nos vasos.

Os níveis circulantes de alguns metais, como níquel, alumínio e cromo, já foram relacionados a placas ateroscleróticas na artéria carótida independentemente dos fatores de risco cardiovasculares em humanos (LIND, 2012). Em indivíduos com doença renal, Swaminathan *et al.* (2008) encontraram valores significativos de Al no coração, vasos sanguíneos e pele de pacientes que morreram de complicações cardíacas ou vasculares.

Embora os efeitos do Al nas artérias ainda não sejam claros, Granadillo *et al.* (1995) associam altos níveis plasmáticos do metal à hipertensão arterial em indivíduos sem doença renal, e estudos relatam existência de uma distribuição não uniforme de Al em artérias humanas, com diferentes concentrações do metal (MINAMI *et al.* 2001; BHATTACHARJEE *et al.*, 2013), além de que em pacientes com DA há um gradiente de aumento de concentração de Al a partir da aorta para a artéria cerebral posterior. Em estudo de Gomes *et al.* (1994), a exposição ao metal reduziu a pressão sistólica, o fluxo coronário, as frequências atriais e ventriculares, além de um atraso na condução atrioventricular de ratas adultas. Oesterling *et al.* (2008) demonstraram *in vitro* que nanopartículas de óxido de Al podem induzir uma resposta pró-inflamatória em células endoteliais, além de aumentar adesão de monócitos e, assim, apresentar risco a doença cardiovascular. Diferentemente,

estudo de Sun *et al.* (2011), não encontrou efeitos significantes na citotoxicidade, permeabilidade e resposta inflamatória de células endoteliais cardíacas expostas à estas nanopartículas. Porém, até a presente data são raros os estudos sobre o efeito vascular do Al como possível agente tóxico.

2 JUSTIFICATIVA

A versatilidade do Al e seu uso crescente em diversos tipos de aplicações provoca o aumento de sua disponibilidade química em toda a biosfera, implicando na saúde do homem. Já é bem conhecida sua função pró-oxidante e sua interação com EROs produzidas em sua exposição, promovendo desequilíbrio do estado redox em órgãos atingidos pelo metal, já que também age no sistema de defesas antioxidante.

Vários estudos apontam as EROs como importantes contribuintes na patogênese de inúmeras doenças cardiovasculares, como hipertensão e aterosclerose. Nas últimas décadas, estudos tem apontado determinados metais tais como mercúrio, cádmio e chumbo como agentes tóxicos capazes de provocar estresse oxidativo, danos vasculares e desencadear disfunção endotelial, podendo progredir para diversas doenças vasculares, o que é favorecido quando a exposição é continuada ao longo dos anos (WIGGERS *et al.*, 2008; ALMENARA *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.* 2015).

Através de estudos, atualmente sabe-se que o Al promove danos aos mais diversos sistemas, porém não se conhece os o impacto desta exposição na saúde humana. Sabendo que o metal promove o aumento do estresse oxidativo, e que este é prejudicial ao sistema cardiovascular, se tornam fundamentais pesquisas no que se refere à atuação do Al *in vivo* neste sistema, assim como mecanismos de ação decorrentes desta forma de intoxicação, o que já é bem descrito em exposições a outros metais.

Assim, este estudo tem como propósito investigar os efeitos promovidos pela exposição aguda ao cloreto de alumínio sobre a pressão arterial, o estresse oxidativo e a reatividade vascular de artérias aorta de ratos, na dose de 100 mg/kg, de acordo com as estimativas dos valores máximos de exposição diária humana ao Al e níveis de intoxicação por hiperaluminemia (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da exposição aguda ao cloreto de alumínio (AlCl_3) sobre a pressão arterial, a reatividade vascular de artéria aorta e o estresse oxidativo em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da exposição aguda à 100 mg/kg de AlCl_3 em ratos sobre:

- A concentração do metal no soro dos animais expostos;
- A pressão arterial sistólica e diastólica;
- A reatividade vascular da artéria aorta, modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina, respostas vasodilatadoras dependentes e independentes do endotélio, bem como as vias endoteliais envolvidas nessa resposta;
- A atividade oxidante e antioxidante plasmática.

PARTE II

Acute exposure to aluminum chloride decreases vascular reactivity

Patrícia Medeiros Schmidt¹, Alyne Goulart Escobar¹, João Guilherme Torres Dini¹,
Caroline Silveira Martinez¹, Danize Aparecida Rizzetti¹, Simone Noremberg Kunz¹,
Carine Viana², Dalton Valentim Vassallo³, Maria Jesús Alonso⁴, Franck Maciel
Peçanha¹, Giulia A. Wiggers^{1*}

¹Postgraduate Program in Biochemistry, Universidade Federal do Pampa, Uruguiana, Rio Grande do Sul, Brazil

²Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

³Department of Physiological Sciences, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brazil

⁴Department of Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain

*Corresponding author:

E-mail: giuliawp@gmail.com (GAW)

Abstract

Aluminum (Al) is the most common metal and its high bioavailability points this as an important environmental contaminant. Aluminum can be accumulated in several organs and has been associated with diseases, mainly neurological disorders. At cardiovascular system, there are not enough evidences of Al-induced dysfunction. We investigated the effects of acute exposure to aluminum chloride (AlCl_3) on blood pressure, oxidative stress and vascular reactivity. Male Wistar rats were divided into: *Untreated*: vehicle (ultrapure water, *ip*) and *AlCl₃*: single dose of AlCl_3 (100 mg/kg *ip*). Systolic and diastolic blood pressure was assessed in anesthetized rats through cannulation of carotid artery before and after one hour of aluminum injection. Aorta reactivity was analyzed in isolated organ bath and concentration-response curves to acetylcholine, sodium nitroprusside and phenylephrine were performed in presence and absence of endothelium, nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, NADPH oxidase inhibitor apocynin, potassium channels blocker TEA and superoxide anion scavenger SOD. Nitric oxide released was studied in arteries; reactive oxygen species, malondialdehyde and non-protein thiol levels were verified in plasma, as well as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase activities. Serum aluminum concentration after a single intraperitoneal injection of AlCl_3 reaches $147.7 \pm 25.0 \mu\text{g/L}$; this treatment did not change blood pressure, although inducing the following effects: 1) decreased vasoconstrictor response to phenylephrine, 2) increased negative endothelial modulation and nitric oxide released as well as vascular reactive oxygen species production from NADPH oxidase, mainly superoxide anions; 3) increased malondialdehyde and thiol levels; 4) enhanced catalase and glutathione-S-transferase activities and 5) decreased SOD activity. Therefore, AlCl_3 -acute exposure promotes vascular changes. This effect seems to be associated with increased nitric oxide bioavailability, probably acting on K^+ channels, seems to occur probably as a compensatory mechanism on oxidative stress. These results suggest that this metal might be considered as a cardiovascular toxic agent.

Introduction

Aluminum (Al) is the third most abundant element in the Earth's crust and the most common metal, representing approximately 8% of the Earth's surface [1]. Al is not an essential metal to life [2], however the high availability of Al points to this metal as an important environmental contaminant and increases to potential toxic for human exposure [3-5]. The major sources of Al exposure include food additives, antacids, vaccines, hemodialysis solution and total parenteral nutrition [6,7]. Especially, the presence of Al in intravenous solutions, such as parenteral nutrition (PN) and hemodialysis (HD) fluids are responsible for elevated exposure to this metal. The Al concentration in PN can reach 135 $\mu\text{g/L}$ [6], while the maximum considered safe by the Food and Drug Administration (FDA) is 25 $\mu\text{g/L}$ [8]. Moreover, acutely aluminum-intoxicated HD occurs when serum Al concentration exceed 60 $\mu\text{g/L}$ in HD patients [9], and sometimes can reach 237 $\mu\text{g/L}$ [10].

Furthermore, Al compounds can be accumulated in several organs [5], and has been associated with several diseases such as osteopenia [11], microcytic anemia [12] and neurological disorders [7,13]. Regarding the cardiovascular system, there are not enough evidences of Al-induced cardiovascular dysfunction; however, it is known that Al can be strongly accumulated in cerebral arteries [14,15].

The underlying mechanisms of Al toxicity are not entirely clear; however, they are apparently related to their pro-oxidant effects. Al can induce oxidative stress by promoting an imbalance between enzymatic / non-enzymatic antioxidant defenses and reactive oxygen species (ROS) generation, thus facilitating peroxidative reactions in membranes [16]. In vessels, the most important sources of ROS are NADPH oxidase, xanthine oxidase, mitochondria and, under certain conditions, endothelial nitric oxide synthase (NOS) [17]. Nitric oxide (NO), a free radical

produced by NOS, plays a considerable function in vascular homeostasis at physiological levels. However, NO produced during oxidative stress circumstances may cause endothelial dysfunction [18], an important risk factor for the development of vascular disease. This condition may occur when the superoxide anion produced by uncoupled eNOS reacts with NO, to form peroxynitrite anion.

Although there are few studies devoted to the cardiovascular effects of Al poisoning [14,19-22], so far is not known about the vascular responses after Al exposure. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of acute exposure to aluminum chloride (AlCl_3) on blood pressure, oxidative stress and vascular reactivity of rats.

Materials and Methods

Animals and reagents

Three-month-old male Wistar rats (354g - 482g) were obtained from Central Animal Laboratory of the Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. During treatment, rats were maintained at a constant room temperature, humidity, and light/dark cycle, free access to water and feed *ad libitum*. All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology and approved by a local ethic committee (028/2013 CEUA - Federal University of Pampa, Brazil).

Rats were divided into two groups and received a single intraperitoneal (*ip*) injection as follows: Untreated (ultrapure water, *ip*, vehicle) and Aluminum (AlCl_3) - aluminum chloride solution pH 7 (100 mg/kg, *ip*).

All reagents were high purity and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and all of the solutions were prepared with purified water by a Milli-Q high purity water device (Millipore, Bedford, MA, USA). To avoid Al contamination from glass, only plastic materials were used. First, the laboratory equipment was immersed for at least 24 h in a 10% (v/v) HNO₃/ethanol solution and washed with ultrapure water shortly before use. To reduce contamination from the air, all of the steps in the preparation of the samples and reagents were conducted on a Class 100 clean bench.

After one hour of *ip* injection, rats were euthanized for further experimental protocols.

Blood pressure and aluminum concentration

Systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) was assessed in anesthetized rats (urethane 1.2 g/kg, *ip*) through cannulation of carotid artery using a polyethylene catheter (PE 50, Clay-Adams, NY, USA), filled with saline and heparin (50 U/mL). Blood pressure was obtained by a pressure transducer (TSD104A) connected to a preamplifier and to an acquisition system (MP150 Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA). After 30 min of stabilization period, ultrapure water (*ip*) or AlCl₃ (100 mg/kg, *ip*) were injected and SBP, DBP and heart rate (HR) were measured immediately before administration and after 60 min of injection.

After one hour of exposure, blood was collected through renal artery and used for aluminum determination and biochemical assays. Serum aluminum concentration was measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) according to Noremborg *et al.* [23] using an ANALYTIK Jena AG (Jena, Germany) model ZEE nit 600. To reduce contamination, the serum separation was

performed in a Class 100 clean bench, using only plastic material previously decontaminated. After this procedure, the samples were diluted with purified water 1:1 and the Al content was determined by GFAAS.

Reactivity experiments

The removed thoracic aorta were stored in a Krebs-Henseleit solution (pH 7.4) (in mM: 124 NaCl, 23 NaHCO₃, 4.6 KCl, 1.2 MgSO₄ 7H₂O, 2.5 CaCl₂·2 H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 11.1 glucose and 0.01 Na₂EDTA) at 37°C and bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. The surrounding connective tissue was carefully removed and the vessel was cut into 2 to 4 mm long rings, with special care taken to avoid damaging the endothelium. The rings of the proximal portion of the aortic arch were horizontally mounted under isometric conditions by inserting two stainless-steel wires (75 µm in diameter) into the lumen. The tissue isometric tension (g) was recorded by an isometric force transducer (TSD125BX8 Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA) connected to a recorder (MP150WSW-SYS Biopac Systems Inc.).

Aortic segments were allowed to equilibrate under an optimum final force of 1,5 g for a period of 45 min in an organ bath system (5 mL) containing oxygenated Krebs-Henseleit solution at 37°C, renewing the buffer every 15 min. After stabilization, the contractile function was evaluated by obtaining a KCl-induced contraction (75 mM) and the functional state of endothelium was evaluated by observation of relaxation to acetylcholine (ACh) on a ring precontracted with phenylephrine at 50% of the contraction induced by 75 mM KCl. However, to investigate the role of endothelium on the vasoconstrictor response to phenylephrine, some rings had the endothelium removed mechanically with a needle.

The Concentration-response curve to phenylephrine (10 μM - 0.5 mM) was performed after 60 min of a new stabilization period. The effects of $\text{N}\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, 100 μM), a nitric oxide synthase inhibitor, apocynin (0.3 mM), a NADPH oxidase inhibitor, tetraethylammonium (TEA, 2 mM), a potassium channels blocker and superoxide dismutase (SOD, 150 U/mL), a superoxide anion scavenger, were investigated by their addition 30 min before performing the concentration-response curve to phenylephrine in vessels with intact endothelium. To investigate the dependent and independent relaxation of the endothelium, concentration-response curves to acetylcholine (ACh, 10 μM - 0.5 mM) and sodium nitroprusside (SNP, 10 μM - 0.5 mM), were performed.

NO Release

Nitric oxide release was measured as previously described [24]. After an equilibration period of 60 min in Krebs-HEPES buffer at 37°C, aortic segments were incubated with 4,5-diaminofluorescein (DAF-2, 2 $\mu\text{mol/L}$) for 45 min. Hereafter, the medium was collected to measure basal NO release. Subsequently, the induced NO release was measured after the segments were incubated with phenylephrine 1 $\mu\text{M/L}$ and relaxed with ACh 10 $\mu\text{M/L}$. The fluorescence was measured using a spectrofluorometer (SpectraMax M5 Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) with excitation at 492 nm and emission at 515 nm. The induced NO release was obtained by subtracting basal NO release from that evoked by ACh. Blank samples were measured in the medium without segments to subtract background emission. The amount of NO released was expressed as arbitrary units/g tissue. Data were expressed as percentage of results obtained for untreated rats.

Pro-oxidant assay

ROS levels in plasma were determined by spectrofluorometric method as previously described by Loetchutinat *et al.* [25]. The samples were diluted (1:1000) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA; 1 mM) was added to the medium. The DCHF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form nonfluorescent DCHF, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of ROS formed. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 488 nm excitation) for 60 min at 15 min intervals. The amount of ROS formed was expressed as fluorescence unit (FU). Data were expressed as percentage of results obtained for untreated rats.

Lipid peroxidation levels were measured in plasma of rats by colorimetric method, as described by Ohkawa *et al.* [26], with modifications. An aliquot of each tissue was incubated with thiobarbituric acid (TBA) 0.8%, phosphoric acid buffer (H₃PO₄) 1% and sodium dodecyl sulphate (SDS) 0.8% at 100°C for 60 min. The color reaction was measured at 532 nm against blanks (Spectrophotometer Femto 600S, São Paulo, Brazil). The results were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per milliliters of plasma.

Antioxidant assay

Non-protein thiols (NPSH) in plasma were determined by the method of Ellman [27]. To determine NPSH, the sample was centrifuged and the supernatant was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid. After a new centrifugation, the protein

pellet was discarded and free -SH groups were determined in the clear supernatant. An aliquot was added in potassium phosphate buffer 1 M, pH 7.4, and 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 10 mM. The color reaction was spectrophotometrically measured at 412 nm. The results were expressed as nmol of NPSH per milliliters of plasma.

Superoxide dismutase (SOD) activity was spectrophotometrically assayed as described by Misra and Fridovich in plasma [28]. This method is based on the capacity of SOD in inhibiting autoxidation of adrenaline to adrenochrome. The color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 26°C. Aliquots of tissues were added in a glycine buffer 50 mM, pH 10.5 in 30°C. Enzymatic reaction was started by adding epinephrine, and results were expressed as Units (U) per milligram.

The catalase (CAT) activity in plasma were spectrophotometrically assayed as described by Aebi [29]. It measures the disappearance of H_2O_2 in the presence of tissues at 240 nm. An aliquot of each tissue was added in potassium phosphate buffer 50 mM, pH 7.0, and the enzymatic reaction was initiated by adding H_2O_2 . The enzymatic activity was expressed in Units (1U decomposes 1 μ mol H_2O_2 /min at pH 7 at 25°C) per milligram of protein. Proteins were measured according Bradford method [30].

Glutathione peroxidase (GPx) activity in plasma was spectrophotometrically assayed [31] through the reduced glutathione (GSH)/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)/glutathione reductase (GR) system by the dismutation of H_2O_2 at 340 nm. In this assay, the enzyme activity was indirectly measured using a NADPH decay. H_2O_2 was decomposed, generating oxidized

glutathione (GSSG) from GSH. GSSG was regenerated back to GSH by glutathione reductase present in the assay medium at the expense of NADPH. Sample was added to the system, and the enzymatic reaction was initiated by adding H₂O₂ 4 mM. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH per min per milligram of protein.

Glutathione S-transferase (GST) activity in plasma were assayed spectrophotometrically at 340 nm [32]. The reaction mixture contained an aliquot of each sample, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM GSH and 100 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), which was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB per min per milligram of protein.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. In the vascular reactivity experiments, vasoconstrictor responses were expressed as the % of contraction induced by 75 mM KCl in order to normalize forces obtained from each aortic ring. To compare the effect of L-NAME, TEA, apocynin and SOD on the response to phenylephrine in aortic segments from each group, some results were expressed as differences of area under the concentration-response curves (dAUC) in control and experimental situations. AUCs were calculated from the individual concentration-response curve plots; the differences were expressed as a percentage of the AUC of the corresponding control situation. Results were analyzed using either Student's t-test or two-way ANOVA unpaired for comparison between groups. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's *post hoc* test was used and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

After a single intraperitoneal injection of aluminum chloride of 100 mg/kg serum aluminum concentration was of $147.7 \pm 25.0 \mu\text{g/L}$ ($n=4$), which is an increase of 119% in Al content when compared to the Untreated group ($67.04 \pm 10.75 \mu\text{g/L}$, $n=5$).

Rats untreated and acutely exposed to AlCl_3 had similar blood pressure (SBP - *Untreated*: 123.2 ± 1.8 vs *AlCl₃*: 119.6 ± 2.9 mmHg and DBP - *Untreated*: 77.9 ± 2.5 vs *AlCl₃*: 72.7 ± 5.5 mmHg; $P>0.05$, $n=10$) and heart rate (HR - *Untreated*: 311.8 ± 14.0 vs *AlCl₃*: 326.2 ± 19.2 bpm; $P>0.05$, $n=10$) after one hour of administration.

Effect of acute AlCl_3 -exposure on vascular reactivity

Aluminum at 100 mg/kg did not alter the vascular response to KCl (*Untreated*: 1.73 ± 0.32 g; *AlCl₃*: 1.76 ± 0.26 g, $P>0.05$, $n=8$). However, Al-exposure for one hour decreased the vascular response to phenylephrine (Fig. 1A) without differences on the vasodilator response induced by Ach and SNP in aortic segments (Fig. 1B, C).

Endothelium removal and incubation with L-NAME both leftward shifted the concentration-response curve to phenylephrine in aortic segments from either group (Figs. 2A, B; 3A, B; Table 1). However, these effects were greater in the AlCl_3 -exposure group, as shown by dAUC values (Figs. 2C, 3C), suggesting that NO bioavailability might be enhanced after aluminum exposure. In agreement, Ach-induced NO release was increased in arteries from aluminum treated rats (Fig. 3D).

The presence of TEA increased the vasoconstrictor response to phenylephrine (Fig. 4A, B), being this effect greater in segments from aluminum-treated rats, as shown by the comparison of the dAUC values (Fig. 4C).

In order to investigate the involvement of ROS in the vasoconstrictor response to phenylephrine, vascular experiments were performed in the presence of apocynin and SOD. After incubation with both compounds, there was a decreased response to phenylephrine in arteries from Untreated and treated groups (Fig. 5A, B; 6A, B); however, these effects were greater in preparations from aluminum-treated rats, as shown by dAUC values. (Fig. 5C, 6C).

Effect of acute AlCl₃-exposure on oxidative stress biomarkers

Aluminum administration increased plasmatic ROS levels and MDA levels (Fig. 7A and 7B). Antioxidant defense system was also affected by Al-acute exposure. The aluminum treatment significantly increased NPSH levels (Fig. 8A) as well as GST and catalase enzymatic activities (Figs. 8B, C). On the contrary, there was a significant decrease on SOD activity (Fig. 8D), whereas no change was observed in GPx activity of rats acutely exposed to aluminum (Fig. 8E).

Discussion

AlCl₃-exposure for one hour causes vascular changes, through endothelium-dependent mechanisms. These alterations are probably outcome from increased nitric oxide bioavailability and its action on potassium channels, despite the increased oxidative stress. Namely, a single intraperitoneal injection of AlCl₃ decreases the

vasoconstrictor responses induced by phenylephrine and points to NO involvement on these responses, as a compensatory mechanism against oxidative stress, mainly superoxide anions and NADPH oxidase participation. Moreover, the increase on lipid peroxidation and changes on antioxidant defense systems might account to oxidative stress as a potential route for vascular damage after Al exposition.

In the current study, we used a model of controlled single-dose administration of AlCl_3 for one hour of exposure and attained a serum Al concentration of 147.7 $\mu\text{g/L}$, similar to levels found in hemodialysis patients with intoxication [9], but far to those values considered to be safe by environmental protection agency [33]. This is the first study showing the effects of AlCl_3 on vascular function. However, there are few studies investigating the cardiac effects of Al poisoning. In this sense, isolated rat hearts exposed to Al at 18-fold higher concentrations than found in our study, promoted a reduction of coronary blood flow as well isovolumetric systolic pressure [21]. Al exposure was likely related to hypertension development since it was able to increase renin expression in mice after 48 h of aluminum administration of 50mg/kg by *ip* injection [20]. In addition, in humans with normal renal function, plasmatic Al levels had been related with arterial hypertension [22]. In our study we did not find differences on blood pressure; differences in Al concentrations, exposure time, administration routes and the postulated increase on NO bioavailability might account for these discrepancies.

An imbalance between reactive species production and antioxidant defense systems can lead to oxidative damage [34]. Several studies have shown that Al can act as a toxic element with pro-oxidant actions, enhancing ROS production, thus producing lipid peroxidation [35,36]. In fact, we found increased plasmatic MDA and ROS levels in AlCl_3 -treated rats, indicating enhanced lipid peroxidation in the Al

group. However, we also observed increased NPSH levels and GST activity, which suggest a compensatory mechanism against increased oxidative stress [37], which was already reported to occur in different organs [3]. Nevertheless, plasmatic SOD activity was strongly inhibited after Al administration. These results are in agreement with others studies in different systems and Al doses [3,16,38,39].

Regarding enzymatic defense system, $AlCl_3$ exposure increased plasmatic catalase activity without differences on GPx activity. The enhanced catalase activity despite of decreased SOD activity, may suggest that H_2O_2 might be directly produced by other enzymes such as NADPH oxidase [40] and not by the superoxide dismutation. Also, high levels of H_2O_2 can up-regulate the activity of catalase and down-regulate SOD activity [41]. Moreover, in a model of Alzheimer's disease, aluminum toxicity is exacerbated by H_2O_2 , increasing lipid peroxidation [42]. It is known that catalase and GPx have different affinities for the peroxide, being GPx more effective at low levels of H_2O_2 while catalase acts mainly at high levels of this substrate [43]; these differences might explain the dissimilarities on aforementioned enzymatic activities.

Vascular endothelium is highly sensitive to ROS actions [44]. The NADPH oxidase enzyme complex plays an important role on vascular ROS production, known as an significant source of vascular superoxide anion and hydrogen peroxide [45]. We investigated the participation of NADPH oxidase and superoxide anions on vascular reactivity of $AlCl_3$ -exposed aortic rings by incubation with apocynin, a presumed NADPH oxidase inhibitor and with the scavenger SOD. The decreased contractile response to phenylephrine observed followed by a greater involvement of NADPH oxidase and superoxide anions suggest a role of this enzyme. Its major participation as well as release of vascular superoxide anions after Al exposure,

suggest that NADPH oxidase could be responsible for vascular damage in this model.

Other metals such as cadmium, mercury and lead can promote vascular dysfunction with increased vasoconstriction induced by phenylephrine and reduction of acetylcholine-induced vasodilatation in response to enhanced vascular superoxide production from NADPH oxidase and lipid peroxidation [46-48]. The reduction of vascular reactivity observed in the current study seems to be dependent on NO bioavailability, since we found an increase on endothelial and NO participation after Al exposure. This suggested that compensatory mechanism may occur due to an attempt to maintain endothelial function and can be the first step against oxidative damage [49-52]. Moreover, this increase on NO bioavailability might not be able to protect arterial function in a chronic Al exposition, which is already known in other metals exposures [46,53]. Since NO promotes vasodilation, endothelial cell migration and platelet aggregation inhibition, the increase NO bioavailability seems to be beneficial to vascular function [54].

In addition, our results showed an important involvement of K⁺ channels in vascular reactivity that are in agreement with NO enhanced release, both acting to decrease vascular reactivity in a compensatory way to avoid the development of endothelial impairment induced by oxidative stress [55,56]. In accordance with our hypothesis, studies with other metals have associated their decreased vascular reactivity to mechanisms dependent on NO bioavailability and K⁺ channels [57] in response to increased oxidative stress [58]. Moreover, Al exposure was related with NO generation with could be responsible for neurotoxicity promoted by this metal [59,60].

Nowadays, we live at the aluminum age where its omnipresence leads all population to have a body burden of aluminum [61]. The present study is the first to demonstrate that AlCl_3 acute exposure for one hour promotes vascular alterations as an initial step for Al cardiovascular toxicity. This effect seems to be related with increased NO bioavailability and its action on K^+ channels as a compensatory response to increased oxidative stress induced by this metal. Insofar, due to presenting effects on vascular system, our results might raise a concern about Al-induced vascular diseases development.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Pró-reitoria de Pesquisa (nº 10.134.14) – Federal University of Pampa, Brazil.

References

1. Sparling DW, Lowe TP. Environmental hazards of aluminum to plants, invertebrates, fish, and wildlife. *Rev Environ Contam Toxicol*. 1996;145:1-127.
2. Kawahara M, Kato-Negishi M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:276393. pii: 10.4061/2011/276393 [doi]. Pubmed PMID: PMC3056430.
3. Prabhakar PV, Reddy UA, Singh SP, Balasubramanyam A, Rahman MF, Indu KS, et al. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. *J Appl Toxicol*. 2012 Jun;32(6):436-45. pii: 10.1002/jat.1775 [doi].
4. Bohrer D, Schmidt M, Marques RC, Dorea JG. Distribution of aluminum in hair of Brazilian infants and correlation to aluminum-adjuvanted vaccine exposure. *Clin Chim Acta*. 2014 Jan 20;428:9-13. pii: S0009-8981(13)00429-4 [pii];10.1016/j.cca.2013.10.020 [doi].
5. Veiga M, Bohrer D, Banderó CR, Oliveira SM, do Nascimento PC, Mattiazzi P, et al. Accumulation, elimination, and effects of parenteral exposure to aluminum in newborn and adult rats. *J Inorg Biochem*. 2013 Nov;128:215-20. pii: S0162-0134(13)00192-X [pii];10.1016/j.jinorgbio.2013.07.028 [doi].
6. Yokel RA, McNamara PJ. Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. *Pharmacol Toxicol*. 2001 Apr;88(4):159-67.
7. Shaw CA, Li Y, Tomljenovic L. Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes. *J Inorg Biochem*. 2013 Nov;128:237-44. pii: S0162-0134(13)00177-3 [pii];10.1016/j.jinorgbio.2013.07.022 [doi].
8. Food and Drug Administration (FDA). Code of Federal Regulations 21CFR201.323, Title 21, Vol. 4. 2014.
9. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2003 Oct;42(4 Suppl 3):S1-201. pii: S0272638603009053 [pii].
10. Elevated serum aluminum levels in hemodialysis patients associated with use of electric pumps--Wyoming, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008 Jun 27;57(25):689-91. pii: mm5725a4 [pii].
11. Li X, Hu C, Zhu Y, Sun H, Li Y, Zhang Z. Effects of aluminum exposure on bone mineral density, mineral, and trace elements in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2011 Oct;143(1):378-85. pii: 10.1007/s12011-010-8861-4 [doi].

12. Barata JD, D'Haese PC, Pires C, Lamberts LV, Simoes J, De Broe ME. Low-dose (5 mg/kg) desferrioxamine treatment in acutely aluminium-intoxicated haemodialysis patients using two drug administration schedules. *Nephrol Dial Transplant*. 1996 Jan;11(1):125-32.
13. Walton JR. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*. 2006 May;27(3):385-94. pii: S0161-813X(05)00205-6 [pii];10.1016/j.neuro.2005.11.007 [doi].
14. Minami T, Ichii M, Tohno Y, Tohno S, Utsumi M, Yamada MO, et al. Age-dependent aluminum accumulation in the human aorta and cerebral artery. *Biol Trace Elem Res*. 1996 Oct;55(1-2):199-205.
15. Bhattacharjee S, Zhao Y, Hill JM, Culicchia F, Kruck TP, Percy ME, et al. Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD). *J Inorg Biochem*. 2013 Sep;126:35-7. pii: S0162-0134(13)00120-7 [pii];10.1016/j.jinorgbio.2013.05.007 [doi]. Pubmed PMID: PMC3720708.
16. Kumar V, Bal A, Gill KD. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. *Toxicology*. 2009 Jan 31;255(3):117-23. pii: S0300-483X(08)00468-X [pii];10.1016/j.tox.2008.10.009 [doi].
17. Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 Jan;110(1):87-94. pii: 10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x [doi].
18. Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard JC, Lorgis L, Cottin Y, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*. 2013 Dec;140(3):239-57. pii: S0163-7258(13)00150-2 [pii];10.1016/j.pharmthera.2013.07.004 [doi].
19. Lind PM, Olsen L, Lind L. Circulating levels of metals are related to carotid atherosclerosis in elderly. *Sci Total Environ*. 2012 Feb 1;416:80-8. pii: S0048-9697(11)01380-5 [pii];10.1016/j.scitotenv.2011.11.064 [doi].
20. Ezomo OF, Matsushima F, Meshitsuka S. Up-regulation in the expression of renin gene by the influence of aluminium. *J Inorg Biochem*. 2009 Nov;103(11):1563-70. pii: S0162-0134(09)00170-6 [pii];10.1016/j.jinorgbio.2009.07.018 [doi].
21. Gomes MG, Moreira CA, Mill JG, Massaroni L, Oliveira EM, Stefanon I, et al. Effects of aluminum on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. *Braz J Med Biol Res*. 1994 Jan;27(1):95-100.
22. Granadillo VA, Tahan JE, Salgado O, Elejalde LE, Rodriguez-Iturbe B, Romero GB, et al. The influence of the blood levels of lead, aluminum and vanadium upon the arterial hypertension. *Clin Chim Acta*. 1995 Jan 16;233(1-2):47-59.
23. Noremborg S, Veiga M, Bohrer D, Viana C, Nascimento PC, Carvalho LM, et al. Determination of aluminum and silicon in bovine liver by graphite furnace atomic

absorption spectrometry after dissolution with tetramethylammonium hydroxide. *Analytical Methods*. 2015;7:500-6.

24. Avendano MS, Lucas E, Jurado-Pueyo M, Martinez-Revelles S, Vila-Bedmar R, Mayor F, Jr., et al. Increased nitric oxide bioavailability in adult GRK2 hemizygous mice protects against angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2014 Feb;63(2):369-75. pii: HYPERTENSIONAHA.113.01991 [pii];10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01991 [doi].
25. Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J, Mankhetkorn S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Rad Phys Chem*. 2005;72:323-31.
26. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8.
27. ELLMAN GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959 May;82(1):70-7.
28. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5.
29. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. pii: S0003269776699996 [pii].
31. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981;77:325-33.
32. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974 Nov 25;249(22):7130-9.
33. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Aluminum. Atlanta, GA: U.S.: Department of Health and Human Services, Public Health Services.; 2008.
34. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):1147-50. pii: BST0351147 [pii];10.1042/BST0351147 [doi].
35. Becaria A, Campbell A, Bondy SC. Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health*. 2002 Aug;18(7):309-20.
36. Ohyashiki T, Suzuki S, Satoh E, Uemori Y. A marked stimulation of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in phospholipid liposomes by a lipophilic aluminum complex, aluminum acetylacetonate. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Jan 15;1389(2):141-9.

37. El-Demerdash FM. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;18(1):113-21. pii: S0946-672X(04)00016-1 [pii];10.1016/j.jtemb.2004.04.001 [doi].
38. Nehru B, Anand P. Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. *J Trace Elem Med Biol.* 2005;19(2-3):203-8. pii: S0946-672X(05)00105-7 [pii];10.1016/j.jtemb.2005.09.004 [doi].
39. Kumar V, Bal A, Gill KD. Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Res.* 2008 Sep 26;1232:94-103. pii: S0006-8993(08)01715-0 [pii];10.1016/j.brainres.2008.07.028 [doi].
40. Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF, Jr. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol.* 2008 Jun 30;181(7):1129-39. pii: jcb.200709049 [pii];10.1083/jcb.200709049 [doi]. Pubmed PMID: PMC2442210.
41. Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJ. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J Biol Chem.* 1990 Jul 15;265(20):11919-27.
42. van Rensburg SJ, Daniels WM, Potocnik FC, van Zyl JM, Taljaard JJ, Emsley RA. A new model for the pathophysiology of Alzheimer's disease. Aluminium toxicity is exacerbated by hydrogen peroxide and attenuated by an amyloid protein fragment and melatonin. *S Afr Med J.* 1997 Sep;87(9):1111-5.
43. Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 1994 Jan 14;269(2):1020-5.
44. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res.* 2011 Jan;34(1):5-14. pii: hr2010201 [pii];10.1038/hr.2010.201 [doi].
45. Martyn KD, Frederick LM, von LK, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal.* 2006 Jan;18(1):69-82. pii: S0898-6568(05)00073-2 [pii];10.1016/j.cellsig.2005.03.023 [doi].
46. Almenara CC, Broseghini-Filho GB, Vescovi MV, Angeli JK, Faria TO, Stefanon I, et al. Chronic cadmium treatment promotes oxidative stress and endothelial damage in isolated rat aorta. *PLoS One.* 2013;8(7):e68418. pii: 10.1371/journal.pone.0068418 [doi];PONE-D-13-07866 [pii]. Pubmed PMID: PMC3709967.
47. Rizzetti DA, Torres JG, Escobar AG, Pecanha FM, Santos FW, Puntel RL, et al. Apocynin prevents vascular effects caused by chronic exposure to low concentrations of mercury. *PLoS One.* 2013;8(2):e55806. pii:

10.1371/journal.pone.0055806 [doi];PONE-D-12-34219 [pii]. Pubmed PMID: PMC3563583.

48. Simoes MR, Aguado A, Fiorim J, Silveira EA, Azevedo BF, Toscano CM, et al. MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Mar 1;283(2):127-38. pii: S0041-008X(15)00015-0 [pii];10.1016/j.taap.2015.01.005 [doi].
49. Joshi A, Woodman OL. Increased nitric oxide activity compensates for increased oxidative stress to maintain endothelial function in rat aorta in early type 1 diabetes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012 Nov;385(11):1083-94. pii: 10.1007/s00210-012-0794-3 [doi].
50. Omanwar S, Saidullah B, Ravi K, Fahim M. Modulation of vasodilator response via the nitric oxide pathway after acute methyl mercury chloride exposure in rats. *Biomed Res Int*. 2013;2013:530603. pii: 10.1155/2013/530603 [doi]. Pubmed PMID: PMC3760274.
51. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 1998 Dec 15;102(12):2061-71. pii: 10.1172/JCI4394 [doi]. Pubmed PMID: PMC509160.
52. Takagi K, Kawaguchi Y, Hara M, Sugiura T, Harigai M, Kamatani N. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin Exp Immunol*. 2003 Dec;134(3):538-44. pii: 2320 [pii]. Pubmed PMID: PMC1808884.
53. Wiggers GA, Pecanha FM, Briones AM, Perez-Giron JV, Miguel M, Vassallo DV, et al. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Sep;295(3):H1033-H1043. pii: 00430.2008 [pii];10.1152/ajpheart.00430.2008 [doi].
54. Poppa V, Miyashiro JK, Corson MA, Berk BC. Endothelial NO synthase is increased in regenerating endothelium after denuding injury of the rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Aug;18(8):1312-21.
55. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994 Apr 28;368(6474):850-3. pii: 10.1038/368850a0 [doi].
56. Feletou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol*. 2009 Feb;156(4):545-62. pii: BPH052 [pii];10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x [doi]. Pubmed PMID: PMC2697708.
57. Rodrigues SM, Ximenes CF, de Batista PR, Simoes FV, Coser PH, Sena GC, et al. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. *Toxicol Lett*. 2014 Mar 21;225(3):378-85. pii: S0378-4274(14)00011-3 [pii];10.1016/j.toxlet.2014.01.002 [doi].

58. Nunes KZ, Nunes DO, Silveira EA, Cruz Pereira CA, Broseghini Filho GB, Vassallo DV, et al. Chronic lead exposure decreases the vascular reactivity of rat aortas: the role of hydrogen peroxide. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120965. pii: 10.1371/journal.pone.0120965 [doi];PONE-D-14-45047 [pii]. Pubmed PMID: PMC4373949.
59. Satoh E, Yasuda I, Yamada T, Suzuki Y, Ohyashiki T. Involvement of NO generation in aluminum-induced cell death. *Biol Pharm Bull*. 2007 Aug;30(8):1390-4. pii: JST.JSTAGE/bpb/30.1390 [pii].
60. Stevanovic ID, Jovanovic MD, Jelenkovic A, Colic M, Stojanovic I, Ninkovic M. Effects of L-NAME, a non-specific nitric oxide synthase inhibitor, on AlCl₃-induced toxicity in the rat forebrain cortex. *J Vet Sci*. 2009 Mar;10(1):15-22. pii: 201003015 [pii]. Pubmed PMID: PMC2801103.
61. Exley C. Why industry propaganda and political interference cannot disguise the inevitable role played by human exposure to aluminum in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. *Front Neurol*. 2014;5:212. pii: 10.3389/fneur.2014.00212 [doi]. Pubmed PMID: PMC4209859.

Table

Table 1: Effects of aluminum on maximum response (R_{max}) and sensitivity (pD2)

	Untreated		AlCl ₃	
	R_{max}	pD2	R_{max}	pD2
Control	114.5 ± 1.4	-6.8 ± 0.1	91.0 ± 4.3 [#]	-6.4 ± 0.2
E-	131.1 ± 4.7*	-7.7 ± 0.1*	129.7 ± 5.4*	-7.6 ± 0.2*
L-NAME	137.8 ± 3.9*	-7.5 ± 0.2*	135.7 ± 4.0*	-7.2 ± 0.2*
TEA	133.6 ± 3.7*	-7.3 ± 0.0*	125.4 ± 5.9*	-7.0 ± 0.2*
Apocynin	81.7 ± 6.8*	-6.7 ± 0.1	39.1 ± 8.0 [#]	-6.3 ± 0.2
SOD	73.3 ± 7.4*	-6.4 ± 0.2	45.3 ± 7.5 [#]	-6.1 ± 0.1

Parameters of maximal response (R_{max}) and sensitivity (pD2) of the concentration-response curves to phenylephrine in aortas before (Control) and after endothelial damage (E-), L-NAME (100 μ M), TEA (2 mM), apocynin (0.3 mM) and SOD (150 U/ml) incubations. Results are expressed as mean \pm SEM. R_{max} , maximal effect (expressed as a percentage of maximal response induced by 75 mM KCl) and pD2 expressed as a -log one-half R_{max} .

* $P < 0.05$ compared to the corresponding control in each group in t test.

$P < 0.05$ compared with the Untreated group in t test.

Figure Legends

Figure 1. Effect of AlCl_3 on vasoconstrictor response to phenylephrine, vascular relaxation endothelium-dependent and independent. Concentration-response curve to (A) phenylephrine; (B) acetylcholine and (C) sodium nitroprusside in aorta of rats Untreated and treated with aluminum, pre-contracted with phenylephrine in (B) and (C) graphs. Results (mean \pm SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mM KCl in (A), and as relaxation-response percentage to phenylephrine in (B) and (C) graphs. Number of animals is indicated in parentheses. Two-way ANOVA * $P < 0.05$.

Figure 2. Effect of AlCl_3 on endothelial response. Effect of endothelium participation in concentration-response curve to phenylephrine in aorta of (A) Untreated, (B) aluminum-treated rats and (C) difference area under the curve (dAUC) between experimental groups. Results (mean \pm SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mM KCl. Number of animals is indicated in parentheses. Two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni; t test vs Untreated (dAUC), * $P < 0.05$.

Figure 3. Effect of AlCl_3 on NO bioavailability. Effect of L-NAME incubation in concentration-response curve to phenylephrine in aorta of (A) Untreated, (B) aluminum-treated rats, (C) difference area under the curve (dAUC) between experimental groups and (D) quantification of ACh-induced NO release in aorta from groups. Results (mean \pm SEM) are expressed as a percentage of the response to 75

mM KCl. Number of animals is indicated in parentheses. Two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni; t test vs Untreated (dAUC and NO release), *P<0.05.

Figure 4. Effect of AlCl₃ on K⁺ channels. Effect of blocker potassium channels activated by calcium, TEA (2 mM), on the concentration-response curve to phenylephrine in aorta of (A) Untreated, (B) aluminum-treated rats and (C) difference area under the curve (dAUC) between experimental groups. Results (mean ± SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mM KCl. Number of animals is indicated in parentheses. Two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni; t test vs Untreated (dAUC), *P<0.05.

Figure 5. Effect of AlCl₃ on ROS effects. Effect of NADPH oxidase inhibitor, apocynin (0.3 mM), on the concentration-response curve to phenylephrine in aorta of (A) Untreated, (B) aluminum-treated rats and (C) difference area under the curve (dAUC) between experimental groups. Results (mean ± SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mM KCl. Number of animals is indicated in parentheses. Two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni; t test vs Untreated (dAUC), *P<0.05.

Figure 6. Effect of AlCl₃ in superoxide anion participation. Effect of O₂^{•-} scavenger, SOD (150 U/mL), on the concentration-response curve to phenylephrine in aorta of (A) Untreated, (B) aluminum-treated rats and (C) difference area under the curve (dAUC) between experimental groups. Results (mean ± SEM) are expressed as a percentage of the response to 75 mM KCl. Number of animals is indicated in

parentheses. Two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni; t test vs Untreated (dAUC), *P<0.05.

Figure 7. Effect of AlCl₃ on oxidant biomarkers. (A) ROS values and (B) MDA levels in Untreated and aluminum-treated rats (n=5, 8); number of animals is indicated in parentheses respectively. Data are expressed as mean ± SEM, t test vs Untreated, *P<0.05.

Figure 8. Effect of AlCl₃ on antioxidant biomarkers. (A) Thiol (SH) groups levels; (B) GST activity; (C) SOD activity; (D) catalase activity and (E) GPx activity in Untreated and aluminum-treated rats (n=5, 8); number of animals is indicated in parentheses respectively. Data are expressed as mean ± SEM, t test vs Untreated, *P<0.05.

Figures

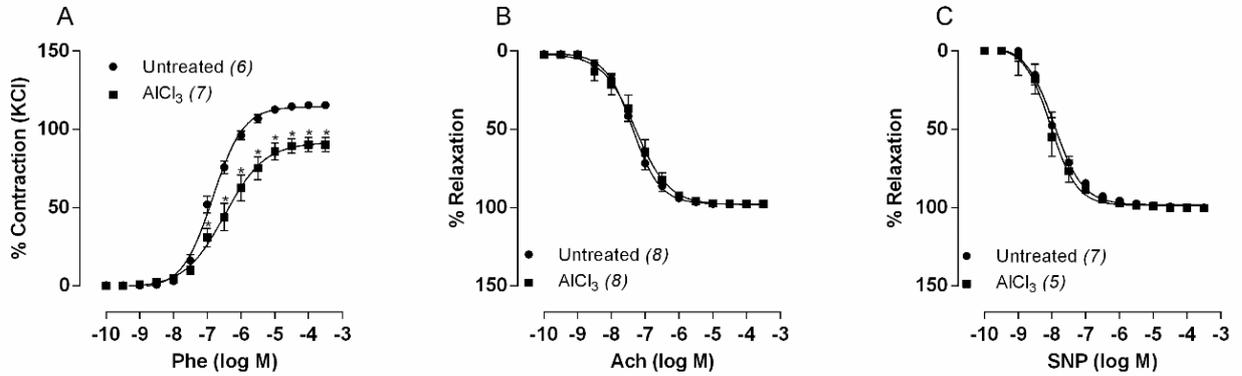


Figure 1. Effect of AlCl_3 on vasoconstrictor response to phenylephrine, vascular relaxation endothelium-dependent and independent.

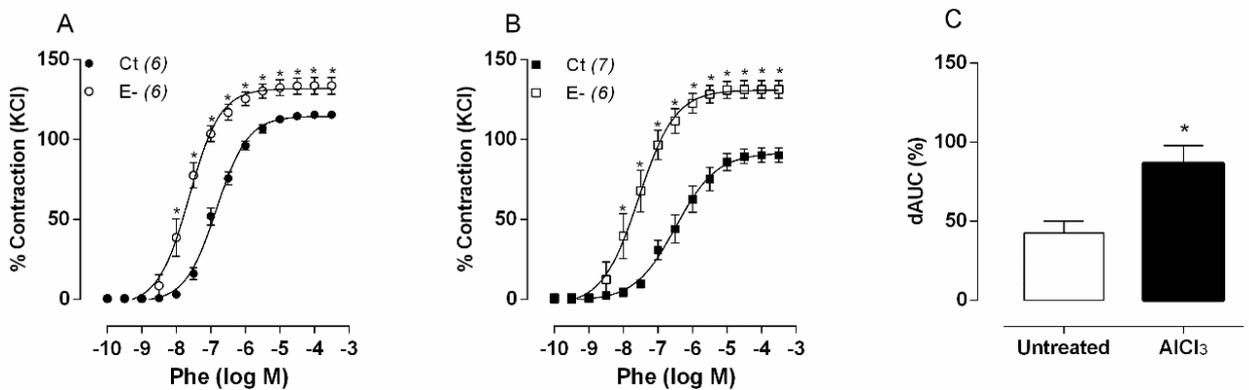


Figure 2. Effect of AlCl_3 on endothelial response.

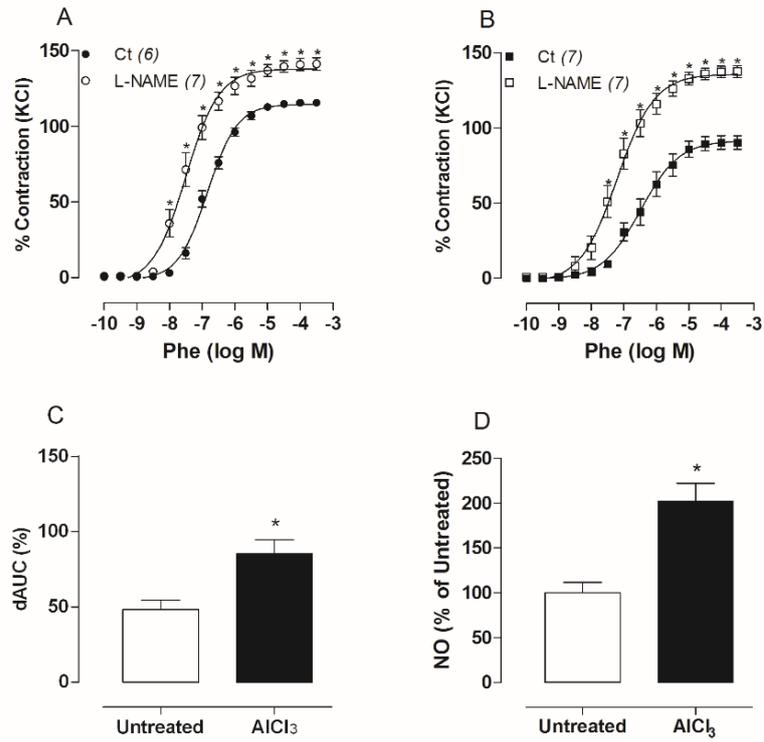


Figure 3. Effect of AlCl_3 on NO bioavailability.

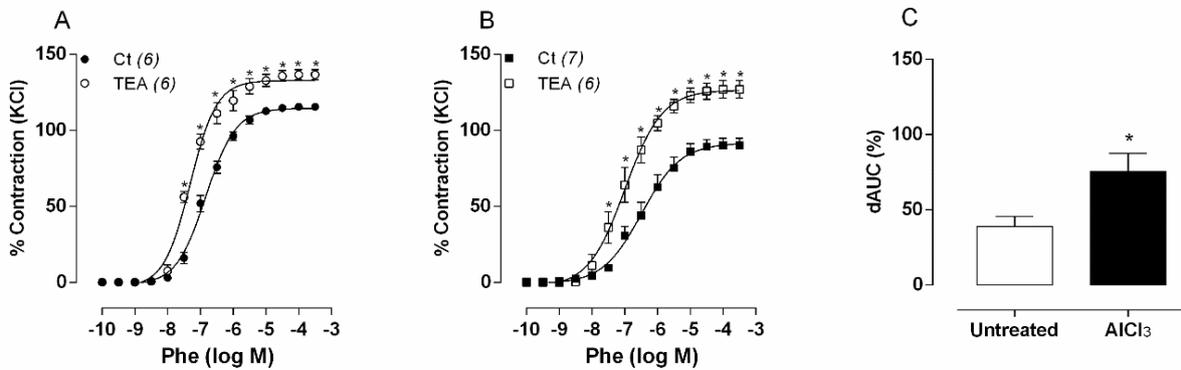


Figure 4. Effect of AlCl_3 on K^+ channels.

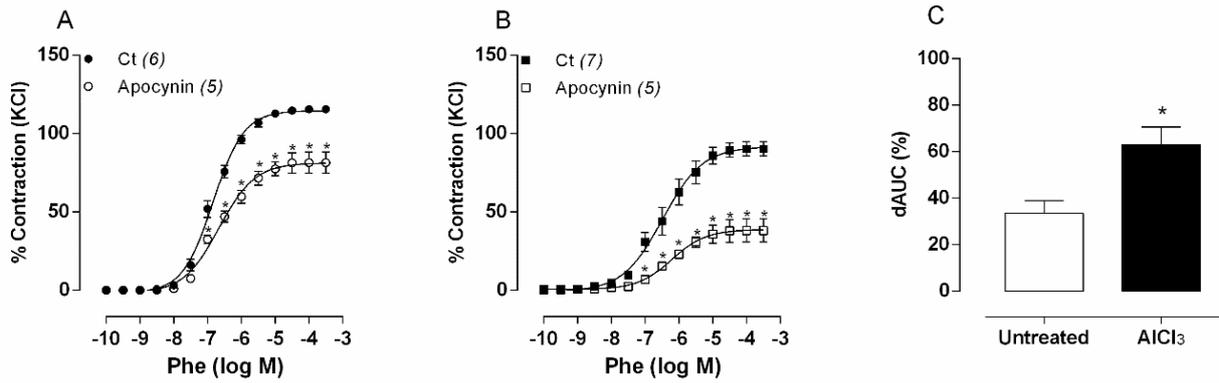


Figure 5. Effect of AlCl_3 on ROS effects.

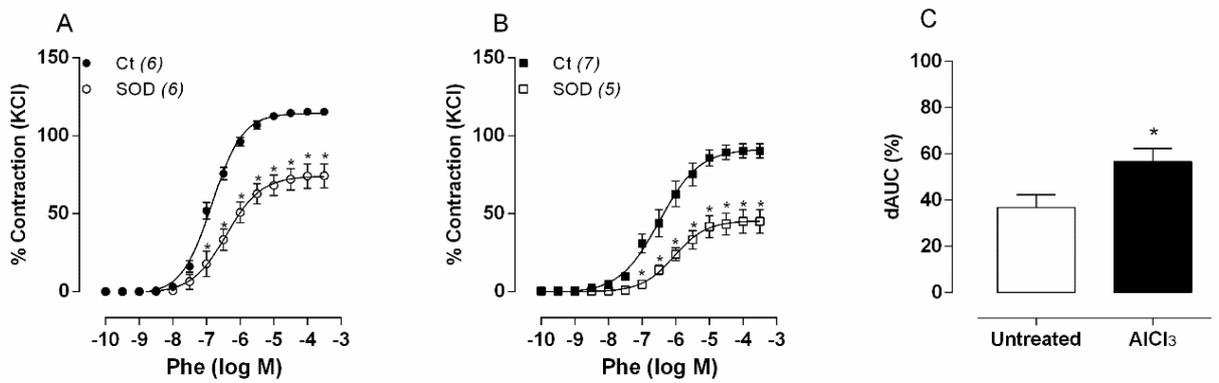


Figure 6. Effect of AlCl_3 on superoxide anion participation.

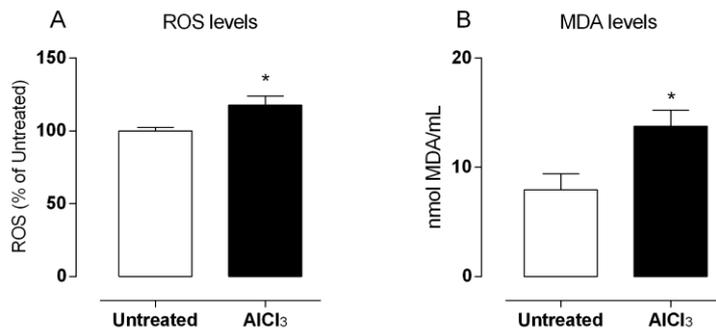


Figure 7. Effect of AlCl_3 on oxidant biomarkers.

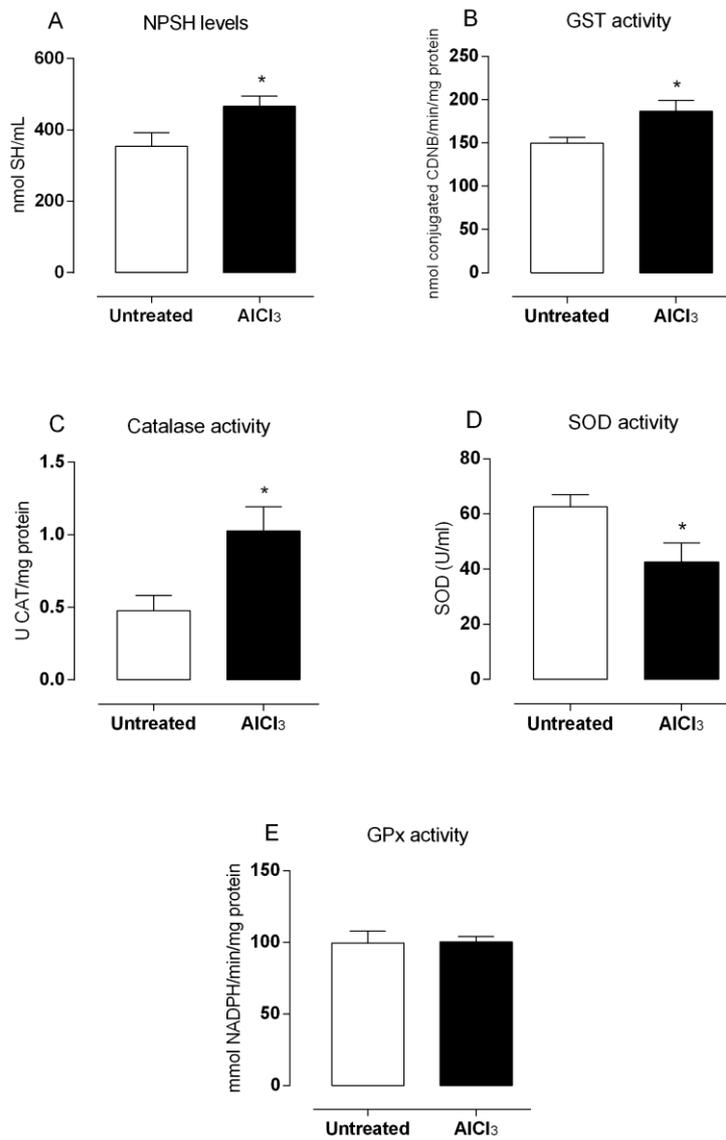


Figure 8. Effect of AlCl₃ on antioxidant biomarkers.

PARTE III

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a exposição aguda ao cloreto de alumínio (AlCl_3) durante uma hora foi capaz de causar alterações vasculares através de mecanismo dependente do endotélio, e que possivelmente o aumento da biodisponibilidade do NO e sua ação nos canais de potássio estejam envolvidas na indução de tais alterações. Ainda, observamos que além de uma única administração intraperitoneal de AlCl_3 diminuir a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina, houve o envolvimento de NO nesta resposta, sugerindo que o NO agiu de forma compensatória a fim de evitar o processo oxidante, principalmente de ânions superóxido e da maior participação da NADPH oxidase. Por fim, o aumento na peroxidação lipídica e as mudanças no sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático sugerem que o estresse oxidativo é uma potencial via para esta alteração vascular promovida pela exposição ao AlCl_3 .

Neste estudo foi utilizado modelo experimental constituído de única administração intraperitoneal de 100 mg/kg de AlCl_3 seguida por uma hora de exposição, alcançando uma concentração sérica de 147,7 $\mu\text{g/L}$ de Al, semelhante a níveis observados em sujeitos submetidos a hemodiálise que apresentam quadro de intoxicação pelo metal (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2003). Vale ressaltar que esta concentração é superior à indicada como segura para esta população segundo a Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 2008), órgão regulamentador americano utilizado mundialmente como referência.

Em razão de que existem poucas pesquisas relacionadas às repercussões cardiovasculares promovidas pela exposição ao Al, este estudo mostra de forma inédita tais efeitos sobre a função vascular. Dentre as pesquisas existentes que abordam este sistema, destaca-se o estudo que utilizou a técnica de Langendorff em corações de ratos isolados expostos *in vitro* a concentrações de Al maiores que a utilizada em nosso estudo, onde foi notado que a exposição ao metal promoveu uma redução do fluxo sanguíneo coronariano assim como da pressão sistólica isovolumétrica (GOMES *et al.*, 1994). A hipertensão arterial sistêmica foi associada à exposição ao Al em sujeitos hipertensos com função renal normal que apresentaram concentrações plasmáticas de Al elevadas em comparação a normotensos

(GRANADILLO *et al.*, 1995). Em camundongos expostos agudamente a 50 mg/kg (*ip*) de Al relacionou-se o aumento da expressão da renina com o desenvolvimento de hipertensão essencial (EZOMO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, não encontramos diferenças nas pressões arteriais sistólica e diastólica após a exposição ao metal, o que pode ser devido, ao menos em parte, à diferenças no tempo de exposição, via de administração e concentrações administradas de Al, assim como ao aumento da biodisponibilidade de NO observada neste estudo.

Sabe-se que um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e o sistema de defesas antioxidante pode levar a danos oxidativos em diversos tecidos (HALLIWEL, 2007). Neste sentido, vários estudos já demonstraram que o Al pode atuar como agente tóxico com função pró-oxidante, levando a um aumento na formação de EROs e propagando facilmente a peroxidação lipídica (OHYASHIKI *et al.*, 1998; BECARIA *et al.*, 2002). Em conformidade com estes estudos, encontramos níveis plasmáticos elevados de MDA e de EROs, indicando aumento da peroxidação lipídica após exposição ao Al. Contudo, observamos também aumento dos níveis de tióis não-proteicos e da atividade da glutathione-S-transferase. Estes achados sugerem que ocorreu aumento das defesas antioxidantes como mecanismo compensatório em consequência do aumento do estresse oxidativo, a fim de evitar dano tecidual, o que já foi observado por outros estudos em diferentes órgãos, como fígado, rins e cérebro (EL-DEMERDASH, 2004; PRABHAKAR *et al.*, 2012). No entanto, observamos que a atividade plasmática da SOD foi inibida nos animais expostos ao Al, de forma semelhante a outros estudos que observaram tal inibição em outros sistemas, em diferentes tipos de exposição ao Al (NEHRU; ANAND, 2005; PRABHAKAR *et al.*, 2012). Kumar *et al.* (2008, 2009) sugeriram que a diminuição na atividade da MnSOD no cérebro de ratos pode indicar que a exposição ao Al seja capaz de interromper o sistema de defesa antioxidante mitocondrial, o que é ocasionado através de maior geração de EROs e sua ação oxidante.

Dentre as enzimas do sistema de defesa antioxidante, a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) possuem papéis importantes e semelhantes para proteger a célula dos danos oxidativos causados pelas EROs. Em nosso estudo, a exposição ao AlCl₃ aumentou a atividade plasmática da catalase, sem afetar a atividade da GPx. Este aumento da atividade da catalase simultâneo à inibição da atividade da SOD pode sugerir que o substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi produzido por outras enzimas, como a NADPH-oxidase (CHEN *et al.*, 2008), e não

pela dismutação do ânion superóxido. Além disso, altos níveis de peróxido de hidrogênio podem regular positivamente a atividade da catalase e regular negativamente a atividade da SOD (SALO *et al.*, 1990). Ainda, em um estudo com modelo de doença de Alzheimer observou-se que a toxicidade do Al foi exacerbada pelo H₂O₂, com conseqüente aumento da peroxidação lipídica (VAN RENSBURG *et al.*, 1997). Sabe-se que a afinidade pelo H₂O₂ é diferente entre a catalase e a GPx; enquanto esta última é mais eficaz quando há baixos níveis de H₂O₂, a catalase atua principalmente em níveis elevados deste substrato (MAKINO *et al.*, 1994), o que pode explicar as diferenças nas atividades enzimáticas mencionadas encontradas neste estudo. Somado a isto, o H₂O₂ também já foi relacionado ao aumento da produção de NO, pois já foi demonstrado em estudos *in vivo* e *in vitro* que o H₂O₂ foi capaz de regular positivamente a expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (DRUMMOND *et al.*, 2000; LAUDE *et al.*, 2005).

O endotélio vascular é especialmente sensível à ação de EROs (TOUYZ; BRIONES, 2011), e o complexo enzimático NADPH-oxidase desempenha um importante papel na produção destas espécies nos vasos, sendo conhecido como uma grande fonte de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio vascular (MARTYN *et al.*, 2006). Em nosso estudo observamos maior participação da enzima NADPH-oxidase na reatividade vascular à fenilefrina dos anéis de aorta expostos a AlCl₃, o que foi notado após incubação de apocinina, inibidor não-específico desta enzima. Devido a esta maior participação da NADPH-oxidase, o envolvimento de ânions superóxido foi investigado com a incubação do *scavenger* superóxido dismutase (SOD) na resposta contrátil à fenilefrina. Os anéis de aorta dos ratos expostos ao Al apresentaram maior participação destes ânions após a exposição ao Al, provavelmente produzidos pela NADPH-oxidase. Estes achados, associados à diminuição da resposta contrátil à fenilefrina sugerem que a NADPH-oxidase e mais especificamente seus derivados ânions superóxido, exerce um papel importante e pode ser responsável por danos vasculares promovidos pelo Al.

Em estudos com exposições a outros metais como o cádmio, o chumbo e o mercúrio, ocorre indução da disfunção vascular como resposta ao elevado nível de EROs produzidas pela NADPH-oxidase (ALMENARA *et al.*, 2013; RIZZETTI *et al.* 2013; SIMÕES *et al.* 2015). O aumento do estresse oxidativo, como níveis elevados de MDA e aumento na produção de ânion superóxido vascular pode promover disfunção endotelial seguido por um aumento na resposta contrátil induzida pela

fenilefrina e redução na resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina (WIGGERS *et al.*, 2008). Em nosso estudo observamos redução na reatividade vascular após exposição ao Al sem alterações no relaxamento dependente e independente do endotélio, seguido de uma maior biodisponibilidade de NO. Estudos recentes demonstraram que a exposição ao Al parece estar relacionada à geração de NO, podendo inclusive este último ser responsável pela neurotoxicidade promovida pelo metal (SATOH *et al.*, 2007; STEVANOVIC *et al.*, 2009). Nossos achados sugerem que o aumento da biodisponibilidade de NO possa ser um mecanismo compensatório contra o aumento do estresse oxidativo como tentativa de preservar a função endotelial, podendo este ser o primeiro passo contra o dano oxidativo. Outros estudos também encontraram um aumento nos níveis de NO vasculares como resposta compensatória à maior produção de EROs, evento que pode estar presente no princípio do desencadeamento de danos teciduais (OHASHI *et al.*, 1998; JOSHI; WOODMAN, 2012; OMANWAR *et al.*, 2013). É sabido que o NO é um importante regulador da função vascular pois promove vasodilatação, regula negativamente a migração celular endotelial e inibe a agregação plaquetária (POPPA *et al.*, 1998). No entanto, este aumento na biodisponibilidade do NO pode não ser capaz de proteger a função endotelial em uma exposição crônica ao Al, tal como ocorre em exposições a outros metais (WIGGERS *et al.*, 2008; ALMENARA *et al.*, 2013).

Uma vez que o NO pode ativar canais de potássio e contribuir para a redução na resposta vascular (BOLOTINA *et al.*, 1994), podemos relacionar os níveis de NO elevados ao aumento da participação dos canais de potássio observados na resposta vascular do grupo exposto ao $AlCl_3$. Considerando que estes canais estão implicados em respostas dependentes do endotélio como a hiperpolarização, a ativação de canais de potássio tanto endoteliais como do músculo liso pode evitar o desenvolvimento de disfunção endotelial (FÉLÉTOU, 2009). Em conformidade com nossa hipótese, estudos tanto com compostos metálicos quanto com metais têm associado a redução da reatividade vascular à mecanismos dependentes de canais de potássio e da biodisponibilidade de NO (RODRIGUES *et al.*, 2014), ainda que apresentem estresse oxidativo aumentado (NUNES *et al.*, 2015). Vários estudos têm mostrado que o aumento dos níveis de NO pode ser um mecanismo compensatório para neutralizar o aumento do estresse oxidativo em estágios iniciais de toxicidade, o que pode explicar a maior

biodisponibilidade de NO encontrada em nosso estudo (TAKAGI *et al.*, 2003; JOSHI; WOODMAN, 2012).

Atualmente vivemos na “era do alumínio” (EXLEY, 2014), e sua inevitável onipresença faz com que todos os seres vivos tenham sua carga corpórea de Al. O presente estudo é o primeiro a demonstrar que a exposição aguda ao Al durante uma hora promove alterações vasculares, e este efeito parece estar associado a um aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico e sua ação sobre os canais de potássio como mecanismo compensatório sobre o estresse oxidativo induzido por este metal. . Na medida em que nossos resultados demonstraram efeitos sobre o sistema cardiovascular, também levantam uma preocupação acerca da possibilidade de o Al induzir o desenvolvimento de doenças vasculares. Deste modo, ainda são necessários novos estudos em diferentes condições para melhor determinar os efeitos cardiovasculares do alumínio *in vivo*.

CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluirmos que uma única administração intraperitoneal de 100 mg/kg de $AlCl_3$:

- Foi capaz de acumular 119% de alumínio em relação ao grupo não tratado, e apesar de originar alterações vasculares, não promoveu alterações na pressão arterial sistólica ou diastólica, fato que pode ser explicado pelo aumento na biodisponibilidade do NO e pelo pequeno tempo de exposição;
- Provocou aumento do estresse oxidativo, com aumento de peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio, e desequilíbrio nas defesas antioxidantes;
- Induziu alterações na reatividade vascular de artérias aorta com diminuição da resposta vasoconstritora e aumento da modulação endotelial sem alterar as respostas vasodilatadoras dependente e independente do endotélio;
- Aumentou a produção de ânion superóxido derivados da NADPH-oxidase, o que parece estar implicado nas alterações da função vascular;
- Promoveu um aumento da biodisponibilidade de NO e consequente ativação dos canais de potássio, através de mecanismo compensatório como recurso inicial para evitar os efeitos do aumento de liberação de EROs.

Estes resultados sugerem que as alterações vasculares promovidas pela exposição ao alumínio podem ser consideradas fator de risco para doenças vasculares, podendo contribuir no desenvolvimento destas doenças.

REFERÊNCIAS

ABAL (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALUMÍNIO). Fundamentos do Alumínio. Disponível em: <<http://www.abal.org.br>>. Acesso em 10 de março de 2015.

ALDRIDGE, S. e DOWNS, A.J. The Group 13 Metals Aluminium, Gallium, Indium and Thallium: Chemical Patterns and Peculiarities. Ed. John Wiley & Sons Ltd., 2011.

ALMENARA, C. C.; BROSEGHINI-FILHO, G. B.; VESCOVI, M. V.; ANGELI, J. K.; FARIA, T. O.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V. e PADILHA, A. S. Chronic cadmium treatment promotes oxidative stress and endothelial damage in isolated rat aorta. PLoS One v. 8, n. 7, p. e68418, 2013.

AL-NASERI, S. K.; MAHDI, Z. M. e HASHIM, M. F. Quality of water in hemodialysis centers in Baghdad, Iraq. Hemodial.Int. v. 17, n. 4, p. 517-522, Out 2013.

ANSI (AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE). Water for hemodialysis and related therapies. ANSI/AAMI/ISO 13959; Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Arlington, Virginia, 2011.

ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY). Toxicological Profile for Aluminum. Department of Health and Human Services, Public Health Services. Atlanta, 2008.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. Metais: gerenciamento da toxicidade. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

BANKS, W. A.; NIEHOFF, M. L.; DRAGO, D. e ZATTA, P. Aluminum complexing enhances amyloid beta protein penetration of blood-brain barrier. Brain Res. v. 1116, n. 1, p. 215-221, Out 2006.

BARATA, J. D.; D'HAESE, P. C.; PIRES, C.; LAMBERTS, L. V.; SIMOES, J. e DE BROE, M. E. Low-dose (5 mg/kg) desferrioxamine treatment in acutely aluminium-intoxicated haemodialysis patients using two drug administration schedules. Nephrol.Dial.Transplant. v. 11, n. 1, p. 125-132, Jan 1996.

BECARIA, A.; CAMPBELL, A. e BONDY, S. C. Aluminum as a toxicant. Toxicol.Ind.Health v. 18, n. 7, p. 309-320, Ago 2002.

BHATTACHARJEE, S. *et al.* Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease. Journal of Inorganic Biochemistry, n. 126, p. 35–37, 2013.

BHATTACHARJEE, S.; ZHAO, Y.; HILL, J. M.; PERCY, M. E. e LUKIW, W. J. Aluminum and its potential contribution to Alzheimer's disease (AD). Front Aging Neurosci. v. 6, p. 62, 2014.

BJOR, O.; DAMBER, L.; EDSTROM, C. e NILSSON, T. Long-term follow-up study of mortality and the incidence of cancer in a cohort of workers at a primary aluminum smelter in Sweden. *Scand.J.Work Environ.Health* v. 34, n. 6, p. 463-470, Dez 2008.

BOHRER, D.; DO NASCIMENTO, P. C.; BINOTTO, R. e BECKER, E. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminium. Part III: Interaction container-chemicals during the heating for sterilisation. *J.Trace Elem.Med.Biol.* v. 17, n. 2, p. 107-115, 2003.

BOHRER, D.; SCHMIDT, M.; MARQUES, R. C. e DOREA, J. G. Distribution of aluminum in hair of Brazilian infants and correlation to aluminum-adjuvanted vaccine exposure. *Clin.Chim.Acta* v. 428, p. 9-13, Jan 2014.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J. e COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* v. 368, n. 6474, p. 850-853, Abr 1994.

BRAIMOH, R. W.; MABAYOJE, M. O.; AMIRA, C. O. e COKER, H. Quality of hemodialysis water in a resource-poor country: the Nigerian example. *Hemodial.Int.* v. 16, n. 4, p. 532-538, Out 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 11. [Publicado no Diário Oficial da União; 2013; Março 13].

BRASIL, Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria n. 2914/2011. [Publicado no Diário Oficial da União; 2011; Dezembro 12].

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Alumínio: A indústria Brasileira em 2012. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br>>. Acesso em 10 de março de 2015.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de Março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama>>. Acesso em: 25 março 2015.

CHEN, K.; KIRBER, M. T.; XIAO, H.; YANG, Y. e KEANEY, J. F., JR. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J.Cell Biol.* v. 181, n. 7, p. 1129-1139, Jun 2008.

CHEN, S. M.; FAN, C. C.; CHIUE, M. S.; CHOU, C.; CHEN, J. H. e HSEU, R. S. Hemodynamic and neuropathological analysis in rats with aluminum trichloride-induced Alzheimer's disease. *PLoS One* v. 8, n. 12, p. e82561, 2013.

CNI (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA). A sustentabilidade da indústria brasileira do alumínio. Brasília: CNI, 2012.

DARBRE, P. D.; PUGAZHENDHI, D. e MANNELLO, F. Aluminium and human breast diseases. *J.Inorg.Biochem.* v. 105, n. 11, p. 1484-1488, Nov 2011.

DRAGO, D.; CAVALIERE, A.; MASCETRA, N.; CIAVARDELLI, D.; DI, I. C.; ZATTA, P. e SENSI, S. L. Aluminum modulates effects of beta amyloid(1-42) on neuronal calcium homeostasis and mitochondria functioning and is altered in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Rejuvenation.Res.* v. 11, n. 5, p. 861-871, Out 2008.

DRUMMOND, G. R.; CAI, H.; DAVIS, M. E.; RAMASAMY, S. e HARRISON, D. G. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ.Res.* v. 86, n. 3, p. 347-354, Fev 2000.

EL-DEMERDASH, F. M. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J.Trace Elem.Med.Biol.* v. 18, n. 1, p. 113-121, 2004.

EL-SAYED, W. M., AL-KAHTANI, M. A., ABDEL-MONEIM, A.M. Prophylactic and therapeutic effects of taurine against aluminum-induced acute hepatotoxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*, n. 192, p. 880– 886, 2011.

EXLEY, C. Human exposure to aluminium. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, n.15, p. 1807–1816, 2013.

EXLEY, C. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic.Biol.Med.* v. 36, n. 3, p. 380-387, Fev 2004.

EXLEY, C. Why industry propaganda and political interference cannot disguise the inevitable role played by human exposure to aluminum in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. *Front Neurol.* v. 5, p. 212, 2014.

EZOMO, O. F.; MATSUSHIMA, F. e MESHITSUKA, S. Up-regulation in the expression of renin gene by the influence of aluminium. *J.Inorg.Biochem.* v. 103, n. 11, p. 1563-1570, Nov 2009.

FARNDON, J. *The Elements: Aluminum.* Salt Lake City: Benchmark Books, 2001.

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br.J.Pharmacol.* v. 156, n. 4, p. 545-562, Fev 2009.

FIORIM, J.; RIBEIRO, R.F.J.; SILVEIRA, E.A.; PADILHA, A.S.; VESCOVI, M.V.A.; JESUS, H.C.; STEFANON, I; SALAICES, M.; VASSALLO, D.V. 2011. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. *Plos One*, v. 6, n. 2, 2011.

FLAMMER, A.J.; LÜSCHER, T.F. Three decades of endothelium research: From the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Medical Weekly*, n. 140, 2010.

FLAREND, R. Absorption of aluminum from antiperspirants and vaccine adjuvants. In: *Aluminium and Alzheimer's disease: The Science that Describes the Link*, Exley C, Amsterdam: ed. Elsevier Science, p. 75-97, 2001.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Code of Federal Regulations 21CFR201.323. Title 21, v. 4, 2014.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Federal Register v. 68, n. 110, p. 34272-34293, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Aluminium (from all sources, including food additives). In: Evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 940. World Health Organization Library, Geneva, p. 33–44, 2007.

FREITAS, M.B., BRILHANTE, O.M., ALMEIDA, L.M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.3, n.17, p. 651-660, mai-jun, 2001.

FRITSCHI, L.; HOVING, J. L.; SIM, M. R.; DEL, M. A.; MACFARLANE, E.; MCKENZIE, D.; BENKE, G. e DE, K. N. All cause mortality and incidence of cancer in workers in bauxite mines and alumina refineries. Int.J.Cancer v. 123, n. 4, p. 882-887, Aug 15 2008.

FURIERI, L.B.; GALÁN, M.; AVENDAÑO, M.S.; GARCÍA-REDONDO, A.B.; AGUADO, A.; MARTÍNEZ, S.; CACHOFEIRO, V.; BARTOLOMÉ, M.V.; ALONSO, M.J.; VASSALLO, D.V.; SALAICES, M. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. British Journal of Pharmacology, n. 162, p. 1819-1831, 2011.

GEYIKOGLU, F. *et al.* The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminium chronic intoxication. Toxicol Ind Health, p. 1-12, 2012.

GOMES, M. G.; MOREIRA, C. A.; MILL, J. G.; MASSARONI, L.; OLIVEIRA, E. M.; STEFANON, I. e VASSALLO, D. V. Effects of aluminum on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. Braz.J.Med.Biol.Res. v. 27, n. 1, p. 95-100, Jan 1994.

GRANADILLO, V. A.; TAHAN, J. E.; SALGADO, O.; ELEJALDE, L. E.; RODRIGUEZ-ITURBE, B.; ROMERO, G. B. e ROMERO, R. A. The influence of the blood levels of lead, aluminum and vanadium upon the arterial hypertension. Clin.Chim.Acta v. 233, n. 1-2, p. 47-59, Jan 1995.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem.Soc.Trans. v. 35, n. 5, p. 1147-1150, Nov 2007.

HOUSE, E.; POLWART, A.; DARBRE, P.; BARR, L., METAXAS, G.; EXLEY, C. The aluminium content of breast tissue taken from women with breast cancer. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology n. 27, p. 257–266, 2013.

IAI (THE INTERNATIONAL ALUMINIUM INSTITUTE). Aluminum for futures generations. 2012. Disponível em: <primary.world-aluminium.org>. Acesso em 25 de maio de 2015.

IAI (THE INTERNATIONAL ALUMINIUM INSTITUTE) . Global Aluminium Recycling: A Cornerstone of Sustainable Development. Londres: International Aluminium Institute, 2009.

JOSHI, A. e WOODMAN, O. L. Increased nitric oxide activity compensates for increased oxidative stress to maintain endothelial function in rat aorta in early type 1 diabetes. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* v. 385, n. 11, p. 1083-1094, Nov 2012.

KAWAHARA, M. e KATO-NEGISHI, M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int.J.Alzheimers.Dis.* v. 2011, p. 276393, 2011.

KEITH, L. S.; JONES, D. E. e CHOU, C. H. Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations. *Vaccine* v. 20 Suppl 3, p. S13-S17, Mai 2002.

KLEIN, G. L. Aluminum in parenteral solutions revisited--again. *Am.J.Clin.Nutr.* v. 61, n. 3, p. 449-456, Mar 1995.

KUMAR, V.; BAL, A. e GILL, K. D. Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Res.* v. 1232, p. 94-103, Set 2008.

KUMAR, V.; BAL, A. e GILL, K. D. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. *Toxicology* v. 255, n. 3, p. 117-123, Jan 2009.

LAUDE, K.; CAI, H.; FINK, B.; HOCH, N.; WEBER, D. S.; MCCANN, L.; KOJDA, G.; FUKAI, T.; SCHMIDT, H. H.; DIKALOV, S.; RAMASAMY, S.; GAMEZ, G.; GRIENGLING, K. K. e HARRISON, D. G. Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* v. 288, n. 1, p. 7-12, Jan 2005.

LI, X. *et al.* Effects of Aluminum Exposure on Bone Mineral Density, Mineral and Trace Elements in Rats. *Biol Trace Elem Res*, n. 143, p. 378–385, 2011.

LIND, P.M. *et al.* Circulating levels of metals are related to carotid atherosclerosis in elderly. *Science of the Total Environment*, n. 416, p. 80–88, 2012.

MAILLOUX, R.J. *et al.* Hepatic response to aluminum toxicity: dyslipidemia and liver diseases. *Exp Cell Res.*, n. 317, p. 2231–8, 2011.

MAKINO, N.; MOCHIZUKI, Y.; BANNAI, S. e SUGITA, Y. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J.Biol.Chem.* v. 269, n. 2, p. 1020-1025, Jan 14 1994.

MAROUANI, N.; CHAHED, A.; HÉDHILI, A.; HAMDAOUI, M. H.. Both aluminum and polyphenols in green tea decoction (*Camellia sinensis*) affect iron status and hematological parameters in rats. *Eur J Nutr*, n. 46, p. 453–459, 2007.

MARTYN, K. D.; FREDERICK, L. M.; VON, L. K.; DINAUER, M. C. e KNAUS, U. G. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*. v. 18, n. 1, p. 69-82, Jan 2006.

MAZZOLI-ROCHA, F.; DOS SANTOS, A. N.; FERNANDES, S.; FERREIRA NORMANDO, V. M.; MALM, O.; NASCIMENTO SALDIVA, P. H.; WANDERLEY PICANCO-DINIZ, D. L.; FAFFE, D. S. e ZIN, W. A. Pulmonary function and histological impairment in mice after acute exposure to aluminum dust. *Inhal.Toxicol*. v. 22, n. 10, p. 861-867, Ago 2010.

MINAMI, T. *et. al.* Selective Accumulations of Aluminum in Five Human Arteries. *Biological Trace Element Research*, n. 79, 2001.

MINSHALL, C; NADAL, J.; EXLEY, C. Aluminium in human sweat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, n. 28, p. 87–88, 2014.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am.J.Kidney Dis*. v. 42, n. 4 Suppl 3, p. S1-201, Out 2003.

NEHRU, B. e ANAND, P. Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. *J.Trace Elem.Med.Biol*. v. 19, n. 2-3, p. 203-208, 2005.

NUNES, K. Z.; NUNES, D. O.; SILVEIRA, E. A.; CRUZ PEREIRA, C. A.; BROSEGHINI FILHO, G. B.; VASSALLO, D. V. e FIORESI, M. Chronic lead exposure decreases the vascular reactivity of rat aortas: the role of hydrogen peroxide. *PLoS One* v. 10, n. 3, p. e0120965, 2015.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT) . Aluminium factsheet. In: *Material Resources, Productivity and the Environment*. Mechelen: OECD Publishing, 2015.

OESTERLING, E. *et al.* Alumina nanoparticles induce expression of endothelial cell adhesion molecules. *Toxicology Letters*, n. 178, p. 160–166, 2008.

OHASHI, Y.; KAWASHIMA, S.; HIRATA, K.; YAMASHITA, T.; ISHIDA, T.; INOUE, N.; SAKODA, T.; KURIHARA, H.; YAZAKI, Y. e YOKOYAMA, M. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J.Clin.Invest* v. 102, n. 12, p. 2061-2071, Dez 1998.

OHYASHIKI, T.; SUZUKI, S.; SATOH, E. e UEMORI, Y. A marked stimulation of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in phospholipid liposomes by a lipophilic aluminum complex, aluminum acetylacetonate. *Biochim.Biophys.Acta* v. 1389, n. 2, p. 141-149, Jan 1998.

OLIVEIRA, S.M.R.; BERTAGNOLLI, D.; BOHRER, D.; NASCIMENTO, P.C.; POMBLUM S.C.G.; ARANTES, L.C., BARROS, E.J.G. Nível sérico de alumínio: influência da água e de alimentos ingeridos por pacientes com insuficiência renal crônica mantidos em hemodiálise. J Bras Nefrol. V. 17, n. 3, p. 101-109, Set 2005.

OLIVEIRA, S.R.; BOHRER, D.; GARCIA, S.C., NASCIMENTO, P.C., NOREMBERG, S. Aluminum content in intravenous solutions for administration to neonates: role of product preparation and administration methods. J Parenter Enteral Nutr, n. 34, p. 322-328, 2010.

OMANWAR, S.; SAIDULLAH, B.; RAVI, K. e FAHIM, M. Modulation of vasodilator response via the nitric oxide pathway after acute methyl mercury chloride exposure in rats. Biomed.Res.Int. v. 2013, p. 530603, 2013.

PEREIRA, S.F.; LIMA, M.A.; FREITAS, K.H.; MESCOUTO, C.S.; SARAIVA, A.F. Estudo químico ambiental do rio Murucupi – Barcarena, PA, Brasil, área impactada pela produção de alumínio. Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science: v. 2, n. 3, 2007.

POGUE, A.I.; LUKIW, W.J. The mobilization of aluminum into the biosphere. Front Neurol., v. 5, n. 262, 2014.

POPPA, V.; MIYASHIRO, J. K.; CORSON, M. A. e BERK, B. C. Endothelial NO synthase is increased in regenerating endothelium after denuding injury of the rat aorta. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. v. 18, n. 8, p. 1312-1321, Ago 1998.

PRABHAKAR, P. V.; REDDY, U. A.; SINGH, S. P.; BALASUBRAMANYAM, A.; RAHMAN, M. F.; INDU, K. S.; AGAWANE, S. B.; MURTY, U. S.; GROVER, P. e MAHBOOB, M. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. J.Appl.Toxicol. v. 32, n. 6, p. 436-445, Jun 2012.

PRATICÒ, D.; URYU, K.; SUNG, S.; TANG, S.; TROJANOWSKI, J. Q. e LEE, V. M. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. FASEB J. v. 16, n. 9, p. 1138-1140, Jul 2002.

PRIEST, N.D., NEWTON, D., DAY J.P. Human metabolism of aluminium-26 and gallium-67 injected as citrates. Human Exp Toxicol, n. 14, p. 287-93, 1995.

PROZIALECK, W.C.; EDWARDS, J.R.; NEBERT, D.W.; WOODS, J.M.; AARON BARCHOWSKY, A.; ATCHISON, W.D. The Vascular System as a Target of Metal Toxicity. Toxicological sciences, v. 2, n. 102, p. 207-218, 2008.

RAWY, S.M. *et al.* Lethality, accumulation and toxicokinetics of aluminum in some tissues of male albino rats. Toxicol Ind Health, v. 3, n. 29, p. 254-63, 2013.

RIZZETTI, D. A.; TORRES, J. G.; ESCOBAR, A. G.; PECANHA, F. M.; SANTOS, F. W.; PUNTEL, R. L.; ALONSO, M. J.; BRIONES, A. M.; SALAICES, M.; VASSALLO, D. V. e WIGGERS, G. A. Apocynin prevents vascular effects caused by chronic exposure to low concentrations of mercury. PLoS.One. v. 8, n. 2, p. e55806, 2013.

RODRIGUES, S. M.; XIMENES, C. F.; DE BATISTA, P. R.; SIMOES, F. V.; COSER, P. H.; SENA, G. C.; PODRATZ, P. L.; DE SOUZA, L. N.; VASSALLO, D. V.; GRACELI, J. B. e STEFANON, I. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. *Toxicol.Lett.* v. 225, n. 3, p. 378-385, Mar 2014.

RUIPEREZ, F.; MUJIKA, J. I.; UGALDE, J. M.; EXLEY, C. e LOPEZ, X. Pro-oxidant activity of aluminum: promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). *J.Inorg.Biochem.* v. 117, p. 118-123, Dez 2012.

RYAN, T.P.; MCELWAIN, L.L.; MURPHY, T.D. Elevated serum aluminum levels in hemodialysis patients associated with use of electric pumps--Wyoming, 2007. *MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep.* v. 57, n. 25, p. 689-691, Jun 2008.

SAIYED, S.M.; YOKEL, R.A. Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. *Food Additives and Contaminants*, v. 3, n. 22, p. 234-244, 2005.

SAKAMOTO, T.; SAITO, H.; ISHII, K.; TAKAHASHI, H.; TANABE, S. e OGASAWARA, Y. Aluminum inhibits proteolytic degradation of amyloid beta peptide by cathepsin D: a potential link between aluminum accumulation and neuritic plaque deposition. *FEBS Lett.* v. 580, n. 28-29, p. 6543-6549, Dez 2006.

SALO, D. C.; PACIFICI, R. E.; LIN, S. W.; GIULIVI, C. e DAVIES, K. J. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J.Biol.Chem.* v. 265, n. 20, p. 11919-11927, Jul 1990.

SATOH, E.; YASUDA, I.; YAMADA, T.; SUZUKI, Y. e OHYASHIKI, T. Involvement of NO generation in aluminum-induced cell death. *Biol.Pharm.Bull.* v. 30, n. 8, p. 1390-1394, Ago 2007.

SHAW, C.A.; LI, Y.; TOMLJENOVIC, L. Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long-term neurological outcomes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, n. 128, p. 237-244, 2013.

SHAW, C.A.; TOMLJENOVIC, L. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunol Res.*, Jul;v. 3., n. 56, p. 304-316, 2013.

SILVA, R.S.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L.M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Frontiers in physiology*, v. 3, n. 441, 2012.

SIMOES, M. R.; AGUADO, A.; FIORIM, J.; SILVEIRA, E. A.; AZEVEDO, B. F.; TOSCANO, C. M.; ZHENYUKH, O.; BRIONES, A. M.; ALONSO, M. J.; VASSALLO, D. V. e SALAICES, M. MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* v. 283, n. 2, p. 127-138, Mar 1 2015.

SPARLING, D. W. e LOWE, T. P. Environmental hazards of aluminum to plants, invertebrates, fish, and wildlife. *Rev.Enviro.n.Contam Toxicol.* v. 145, p. 1-127, 1996.

STEVANOVIC, I. D.; JOVANOVIĆ, M. D.; JELENKOVIĆ, A.; COLIĆ, M.; STOJANOVIĆ, I. e NINKOVIĆ, M. Effects of L-NAME, a non-specific nitric oxide synthase inhibitor, on AICl₃-induced toxicity in the rat forebrain cortex. *J.Vet.Sci.* v. 10, n. 1, p. 15-22, Mar 2009.

SUN, J.; WANG, S.; ZHAO, D. *et al.* Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells. *Cell Biol Toxicol*, n. 27, p. 333–342, 2011.

SWAMINATHAN, S. *et al.* Cardiac and vascular metal deposition with high mortality in nephrogenic systemic fibrosis. *Kidney International*, n. 73, p. 1413–1418, 2008.

TAKAGI, K.; KAWAGUCHI, Y.; HARA, M.; SUGIURA, T.; HARIGAI, M. e KAMATANI, N. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin.Exp.Immunol.* v. 134, n. 3, p. 538-544, Dez 2003.

TOMLJENOVIC, L. Aluminum and Alzheimer's Disease: after a century of controversy, is there a plausible link? *Journal of Alzheimer's Disease*, n. 23, p. 567–598, 2011.

TOMLJENOVIC, L. e SHAW, C. A. Do aluminum vaccine adjuvants contribute to the rising prevalence of autism? *J.Inorg.Biochem.* v. 105, n. 11, p. 1489-1499, Nov 2011.

TOTTEN, G.E.; MACKENZIE, D.S. *Handbook of Aluminum: Alloy Production and Materials Manufacturing.* CRC Press Ed. v. 2, 2003.

TOUYZ, R. M. e BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens.Res.* v. 34, n. 1, p. 5-14, Jan 2011.

USGS (UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY). *Mineral Commodity Summaries.* 2014. Disponível em: < <http://minerals.usgs.gov/>>. Acesso em 25 de maio de 2015.

VAN RENSBURG, S. J.; DANIELS, W. M.; POTOČNIK, F. C.; VAN ZYL, J. M.; TALJAARD, J. J. e EMSLEY, R. A. A new model for the pathophysiology of Alzheimer's disease. Aluminium toxicity is exacerbated by hydrogen peroxide and attenuated by an amyloid protein fragment and melatonin. *S.Afr.Med.J.* v. 87, n. 9, p. 1111-1115, Set 1997.

VANHOUTTE, P.M.; SHIMOKAWA, H., TANG, E.H.C.; FELETOU, M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica*, n. 196, p. 193-222, 2009.

VASSALLO, D.V.; SIMÕES, M.R.; FURIERI, L.B.; FIORESI, M.; FIORIM, J.; ALMEIDA, E.A.S.; ANGELI, J.K.; WIGGERS, G.A; PEÇANHA, F.M.; SALAICES, M. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 44, p. 939-946, 2011.

VEIGA, M.; BOHRER, D.; BANDERO, C. R.; OLIVEIRA, S. M.; DO NASCIMENTO, P. C.; MATTIAZZI, P.; MELLO, C. F.; LENZ, Q. F. e OLIVEIRA, M. S. Accumulation,

elimination, and effects of parenteral exposure to aluminum in newborn and adult rats. *J.Inorg.Biochem.* v. 128, p. 215-220, Nov 2013.

WALTON, J.R. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *NeuroToxicology*, n. 27, p. 385–394, 2006.

WIGGERS, G. A.; PECANHA, F. M.; BRIONES, A. M.; PEREZ-GIRON, J. V.; MIGUEL, M.; VASSALLO, D. V.; CACHOFEIRO, V.; ALONSO, M. J. e SALAICES, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* v. 295, n. 3, p. 1033-1043, Set 2008.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Aluminium in Drinking-water. World Health Organization Library, 2003.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization Library, 4 ed, 2011.

YANG, S. *et al.* Effects of acute exposure to aluminum on blood–brain barrier and the protection of zinc. *Neuroscience Letters* n. 445, p. 42–46, 2008.

YOKEL, R.A. *et al.* Entry, half-life, and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single ²⁶Al exposure. *Toxicological sciences*, n. 64, p. 77– 82, 2001.

YUAN, C. *et al.* Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *Journal of Biomedical Science*, n. 19, p. 51, 2012.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 028/2013

Título: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CLORETO DE ALUMÍNIO ($AlCl_3$)
SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL, ESTRESSE OXIDATIVO E REATIVIDADE
VASCULAR DE RATOS.

Data da aprovação: 17/12/2013

Período de vigência do projeto: De: 12/2013 Até: 12/2016

Pesquisador: GIULIA ALESSANDRA WIGGERS PEÇANHA

Campus: URUGUAIANA

Telefone: (55) 9914-7174

E-mail: giuliawp@yahoo.com

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alessandra S. K. Tamajusuku Neis', written over a horizontal line.

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis
Professor Adjunto
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA