

MARLI DO CARMO CUPERTINO

**DANOS OXIDATIVOS E HISTOLÓGICOS CRÔNICOS CAUSADOS PELO
CÁDMIO NO FÍGADO E NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C974d

2012

Cupertino, Marli do Carmo, 1986-

Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo
cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos / Marli do
Carmo Cupertino. – Viçosa, MG, 2012.

69f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fígado. 2. Testículos. 3. Cádmio. 4. Espermatogênese
em animais. 5. Toxicologia experimental. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 573

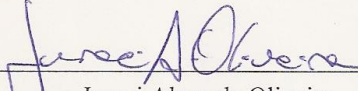
MARLI DO CARMO CUPERTINO

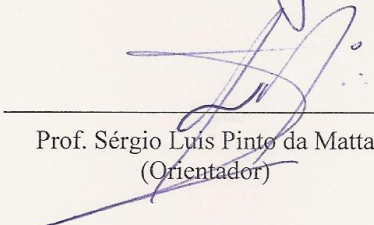
**DANOS OXIDATIVOS E HISTOLÓGICOS CRÔNICOS CAUSADOS PELO
CÁDMIO NO FÍGADO E NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de Fevereiro de 2012.


João Bosco Gonçalves de Barros


Juraci Alves de Oliveira
(Coorientador)


Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

*O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.*

Cora Coralina

*“... se ergues da justiça a clava forte,
verás que um filho teu não foge à luta,
nem teme, quem te adora, a própria morte.”*

Hino Nacional Brasileiro

*Dedico aos que me dedicaram suas vidas,
meus pais, Manoel e Graça
e aos meus irmãos,
Nei, Rose e Sueli.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a contribuição de muitas pessoas às quais expresso meu profundo agradecimento.

A Deus pela vida e presença constante em todos os momentos. Obrigada por tornar possível diversas conquistas, inclusive esta, e por traçar o melhor caminho e não permitir que eu desistisse.

Aos meus amados pais, Manoel e Graça, pelo amor incondicional, pelo exemplo de força, humildade e caráter. Obrigada pelo carinho e dedicação e pela forma como me ensinaram a conduzir as adversidades da vida.

Agradeço aos meus amados irmãos, Nei, Rose e Sueli, pela alegria de crescer ao lado de vocês, pelo aprendizado constante e por acreditarem em mim.

Aos meus sobrinhos e cunhados pelos choros e sorrisos que tornaram meu trajeto mais alegre e possível.

Ao Rodrigo que, nessa fase final, me deu constante apoio. Pela amizade, amor, compreensão e ajuda durante este período. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e influenciar meu aprendizado. Você é muito especial!

Aos que estão presentes na minha memória, por serem parte do que ainda me faz forte e por isso não permitir que eu desista. A presença de vocês jamais se apaga da minha mente. Muitas saudades.

A toda minha família pelo amor que nunca deixaram faltar e por confiarem em mim.

Ao querido orientador e amigo Prof. Sérgio Luis P. Matta pela confiança, por acreditar na minha capacidade de vencer, pelo exemplo de profissionalismo, pelos preciosos ensinamentos, pela orientação competente e por todas as contribuições ao longo do trabalho. Muito obrigada por me mostrar à beleza da histologia e me tornar uma “pesquisadora”!

As amigas Kyvia, Daiane e Suellen pela ajuda durante o experimento. Obrigada pela amizade que construímos. Vocês foram fundamentais para que esse trabalho se concretizasse.

Aos amigos do laboratório e da vida: Kyvia, Suellen, Daiane, Natália, Diane, Bruna Moraes, Alex, Matheus, Dani, Bruna Fontana, Fabíola, Maytê, Marta, Pablo, Ana Paula, Rômulo, Arlete, Reggiany, Manuela, Mariana Moraes, Sendy, Juliana Mattos, Fausto Ferraz, Juliana Silveira, Grazi, Tati, Susana, Camila, Vivi, Carol Torres, Carol

Neves, Michele, Dani Valente, Glenda, Ana Cláudia, Helen, Kenner, Jefferson e Ítalo por me proporcionarem momentos tão agradáveis de aprendizado e descontração.

Ao técnico e amigo do laboratório de Biologia Estrutural, Alex Bhering, pelo auxílio competente com os reagentes, soluções, equipamentos e animais; pelo sempre pronto atendimento e pelos momentos de descontração que fizeram com que a rotina se tornasse mais afável.

A minha querida estagiária, Ana Carolina, pela valiosa ajuda em todas as fases do mestrado e pelos momentos de descontração e carinho.

A amiga Kyvia Lugatte, pessoa humana maravilhosa. Obrigada pela parceria, carinho e por toda ajuda ao longo do trabalho.

A todos os amigos do mestrado em Biologia Animal, por compartilharmos esse momento tão importante de nossas vidas.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Sérgio, Isabel, Clóvis, Adilson, Mariana e Juliana pela colaboração na análise do material histológico, no uso de equipamentos e materiais e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos professores do Departamento de Biologia Animal da UFV, pelos ensinamentos e lições durante o curso.

Aos amigos das secretarias dos Departamentos de Biologia Geral e Animal, Beth, Diana e Adnilson, pelo sempre pronto atendimento e disponibilização em resolver os problemas. Obrigada pelo sorriso no rosto e por serem solícitos sempre que precisei.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso, crescimento profissional e pessoal.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pesquisa, imprescindível na realização deste trabalho.

Aos Professores Juraci Alves de Oliveira de Paula e João Bosco Gonçalves de Barros por aceitarem participar da banca examinadora e por todas as sugestões e críticas feitas e que foram fundamentais à complementação deste trabalho.

Aos professores Tarcízio Antônio Rego de Paula e Juraci Alves de Oliveira pela co-orientação e contribuições ao longo deste trabalho.

Aos professores Juraci Alves de Oliveira e Maria do Carmo Pelúzio pelo auxílio e disponibilização de equipamentos e laboratórios para análises de quantificação de metal e enzimas de estresse oxidativo. Obrigada pela oportunidade e lições.

Ao Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Nutrição e Saúde pelo apoio durante o período de tratamento dos animais e ao Laboratório de Anatomia Vegetal pelo uso do fotomicroscópio.

Aos funcionários do Biotério Central da UFV, Adão e Juliano, pelo fornecimento dos animais a apoio durante o experimento.

Ao Sr. Toninho, funcionário do departamento de Nutrição, pela preciosa ajuda e bons momentos de descontração sempre.

Aos ratinhos utilizados neste estudo.

Agradeço ainda, a todos com que tive a oportunidade de conviver nestes últimos anos e que muito contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada por tudo!

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Metais	2
2.1.1 Metais pesados	3
2.2. Cádmio	3
2.3. Espécies reativas de oxigênio (EROs)	5
2.4. Fígado	6
2.5. Testículo	7
2.5.1. Efeitos do cádmio sobre o aparelho reprodutor masculino	9
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivos Gerais	11
3.2. Objetivos Específicos	11
4. REFERÊNCIAS	11
ARTIGO I	20
DANOS OXIDATIVOS E HISTOLÓGICOS CRÔNICOS EM FÍGADO DE RATOS EXPOSTOS A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO	20
RESUMO	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Animais	22
2.2. Tratamentos	22
2.3. Eutanásia e análises biométricas	23
2.4. Análises enzimáticas	23
2.5. Morfometria	23
2.6. Determinação da concentração de cádmio tecidual	24
2.7. Análise estatística	24
3. RESULTADOS	25
3.1. Parâmetros biométricos e concentração do metal no fígado	25
3.2. Parâmetros estereológicos, histomorfológicos e histopatológicos hepáticos	25
3.3. Armazenamento de glicogênio pelos hepatócitos	29
3.4. Parâmetros bioquímicos	30
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS	35
ARTIGO II	40
DANOS OXIDATIVOS E HISTOLÓGICOS CRÔNICOS NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS EXPOSTOS A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO	40
RESUMO	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1. Animais	42
2.2. Tratamentos	42
2.3. Eutanásia e análises biométricas	43
2.4. Análises enzimáticas	43
2.5. Morfometria	43
2.6. Determinação da concentração de cádmio tecidual	47

2.7. Análise estatística.....	47
3. RESULTADOS.....	48
3.1. Parâmetros biométricos e concentração do metal no testículo.....	48
3.2. Parâmetros histomorfométricos, estereológicos e histopatológicos testiculares	50
3.3. Parâmetros bioquímicos	56
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS.....	62

RESUMO

CUPERTINO, Marli do Carmo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos.** Orientador: Sérgio Luis P. da Matta. Coorientadores: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula e Juraci Alves de Oliveira.

Diversos estudos demonstram que o cádmio induz efeitos prejudiciais nos sistema reprodutivo e hepático, porém estudos sobre alterações causadas por baixas doses ainda estão pouco descritos. Este estudo investigou os danos oxidativos e histológicos crônicos em testículo e fígado de ratos expostos a baixas concentrações de cádmio. Cinco grupos experimentais foram testados, sendo um controle e os restantes recebendo as doses 0,67; 0,74; 0,86 e 1,1 mg de Cd/kg PC/IP, respectivamente. Os animais foram eutanasiados 56 dias após a exposição, sendo feitas análises de biometria corporal, além de análises de fígado e órgãos reprodutores, quantificação de cádmio e água tecidual, atividade de marcadores de estresse oxidativo superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além de estereologia e histopatologia testiculares e hepáticas. Na menor dose testada já ocorreram alterações testiculares e hepáticas relevantes. No testículo foi visto vacuolização do epitélio seminífero, diminuição do índice mitótico e rendimento geral da espermatogênese, bem como diminuição do volume das células de Leydig e peso das glândulas testosterona dependentes, glândula vesicular e próstata. Nas maiores doses encontramos aumento das patologias e alterações morfométricas, como células aberrantes multinucleadas, necrose total do epitélio seminífero e aumento do tecido conjuntivo intersticial. No fígado ocorreu diminuição no acúmulo de glicogênio pelos hepatócitos e aumento no percentual de capilares sinusóides, vasos sanguíneos, hepatócitos binucleados e macrófagos (células de Kupffer) nos animais expostos ao cádmio. O percentual de núcleo aumentou e o percentual de citoplasma diminuiu. Houve também aumento no índice hepatossomático e de edema no fígado dos animais expostos ao Cd. Áreas de necrose foram encontradas nos animais expostos às maiores doses. Em ambos os órgãos houve aumento da atividade CAT e SOD mesmo quando não houve diferença na detecção do metal no tecido. Conclui-se que, já em pequenas doses, o cádmio pode provocar efeitos adversos no fígado e testículo, comprovado pelo aumento de danos morfológicos e na atividade funcional desses órgãos; e que os efeitos crônicos do cádmio ocorrem através da indução do estresse oxidativo, comprovado pelo aumento das enzimas antioxidantes endógenas CAT e SOD.

ABSTRACT

CUPERTINO, Marli do Carmo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012
Oxidative and histological chronic damage caused by cadmium in the liver and in spermatogenesis of rat. Adviser: Sérgio Luis P. da Matta. Co-advisers: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula and Juraci Alves de Oliveira.

Several studies have shown that cadmium induces adverse effects on the reproductive system and liver, but studies of changes caused by low doses are rarely described. This study investigated the oxidative damage and chronic histology in testis and liver of rats exposed to low concentrations of cadmium. Five experimental groups were set up, and a control and the other receiving the doses of 0.67, 0.74, 0.86 and 1.1 mg of Cd/Kg PC/IP, respectively. The animals were euthanized 56 days after exposure, being analyzed in the body biometrics, as well as analyzes of liver and reproductive organs, cadmium and quantification of tissue water, activity of oxidative stress markers superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), besides stereology and testicular and liver histopathology. At the lowest dose tested as testicular and liver changes relevant. In the testis was seen vacuolation of the seminiferous epithelium, decreased mitotic index and overall yield of spermatogenesis, and decreased volume of Leydig cells and testosterone dependent glands weight, vesicular gland and prostate. In larger doses found increased pathologies and morphological changes such as aberrant multinucleated cells, total necrosis of the seminiferous epithelium and increased interstitial connective tissue. In the liver there was a decrease in glycogen accumulation by hepatocytes and increased percentage of sinusoidal capillaries, blood vessels, binucleated hepatocytes and macrophages (Kupffer cells) in animals exposed to cadmium. The percentage of core increased and the percentage of cytoplasm decreased. There was an increase in hepatosomatic index and swellings in the liver of animals exposed to Cd. Areas of necrosis were found in animals exposed to higher doses. In both organs increased CAT and SOD activity even when there was no difference in the detection of metal in the tissue. We conclude that, even in small doses, cadmium can cause adverse effects in the liver and testis, due to increased morphological damage and functional activity of these organs, and that the chronic effects of cadmium occur through induction of oxidative stress as evidenced the increase in endogenous antioxidant enzymes SOD and CAT.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, uma das grandes preocupações ambientais está relacionada aos resíduos sólidos gerados pela sociedade moderna e consumista. Com a intensificação do processo industrial, aliada ao crescimento da população e à conseqüente demanda por bens de consumo, o homem tem produzido quantidades significativas destes resíduos, possibilitando o aparecimento de enfermidades relacionadas com os diversos metais pesados (Leite et al., 2004).

O cádmio (Cd) é um metal pesado desprovido de funções biológicas, ou seja, naturalmente, este elemento não participa das reações bioquímicas necessárias à manutenção da vida. Contudo, uma vez ingressado no organismo este elemento é transportado para diversos sítios, interage de várias formas com os elementos celulares e gera uma extensa lista de efeitos tóxicos. A carga tóxica e o tempo de contaminação são fundamentais na determinação da qualidade e da intensidade das manifestações a serem apresentadas (Murphy, 1996).

O cádmio é um metal pesado extremamente tóxico e onipresente ocorrendo em quase todos os tipos de solo, águas superficiais e plantas. Esse metal é facilmente mobilizado pelas atividades humanas, como mineração, e incorporado ao solo através de aplicações de fertilizantes na agricultura. Esses fatores fizeram com que o cádmio fosse apontado como uma ameaça potencial para a saúde animal e humana (Larison et al., 2010; Cheng & Mruk, 2011). No Brasil a concentração máxima de cádmio têm sido regulamentada desde 1965 pelo decreto 55.871-65, publicado em 27/3/1965. Para a maioria dos alimentos o limite estabelecido foi de 1 mg de cádmio/kg-peso úmido de alimento. Este limite foi reafirmado várias vezes, seja por tratados internacionais ou por órgãos brasileiros, como a Secretaria de Vigilância Sanitária (atual ANVISA, Ministério da Saúde, portaria 685 publicada em 27/8/98) (Porfírio, 2006)

A toxicidade do cádmio pode ser mais comum entre as populações naturais de vertebrados do que tem sido demonstrado até o momento e pode muitas vezes passar despercebida ou até não ser reconhecida (Larison et al., 2010), além de que a ingestão de pequenas doses pode influenciar não somente a fisiologia e a saúde de organismos individuais, mas também a demografia e a distribuição das espécies.

O fígado e o testículo são órgãos suscetíveis á exposição ao Cd. A gravidade da sua intoxicação depende da rota, dose e duração da exposição ao metal (Ognjanović et al., 1995; Štajn et al., 1997). O fígado desempenha um papel crucial na desintoxicação do organismo e embora seja conhecida sua capacidade de regeneração, em certas

condições ele pode ser severamente danificado, por exemplo, pela exposição a altas doses de cádmio (Yu, 2004). O cádmio influencia negativamente também na reprodução (Murphy, 1996). Diversos estudos apontam redução na contagem de espermatozoides associada à disfunção reprodutiva em homens expostos aos tóxicos ambientais (Benoff et al., 2000; Phillips & Tanphaichitr, 2008; Bonde, 2010; Cheng et al., 2011. Wong & Cheng, 2011). Estudos realizados há mais de cinco décadas já relatavam que tóxicos ambientais, como o cádmio causavam lesão testicular (Parizek & Zahor, 1956; Parizek, 1960; Chiquoine, 1964). No entanto, os efeitos do cádmio na função reprodutiva masculina em roedores e humanos, após exposição a baixas doses, não estão completamente elucidados (Telisman et al., 2007; Wirth & Mijal, 2010).

Diversos estudos demonstram que o cádmio induz efeitos prejudiciais no sistema reprodutor e no fígado (Yu, 2004; Wong & Cheng, 2011), porém estudos sobre alterações causadas por baixas doses, que são as que usualmente ocorrem no caso de exposições naturais, ainda não estão descritos. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos crônicos de baixas doses de cádmio em testículo e fígado de ratos Wistar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metais

A presença de altas concentrações de metais pesados no ambiente constitui hoje um problema global devido à dimensão dos lançamentos de origem antrópica e o seu contínuo aumento nos diferentes ecossistemas, atribuído em grande parte à industrialização e ao desenvolvimento urbano. Dentre os metais existe um grupo que desempenha papel importante no organismo e são considerados como nutrientes essenciais: o Sódio, Potássio, Manganês, Ferro, Cobre, Zinco e o Cálcio. Outros como o Cádmio, Chumbo e Mercúrio, não têm função conhecida no metabolismo animal ou vegetal, e geralmente prejudicam os organismos quando ocorrem em teores acima dos normais (Beveridge et al., 1997). Os efeitos tóxicos dos metais pesados e dos compostos de metais são determinados pela taxa com que os metais ou compostos se convertem em uma forma biodisponível. Ao ingressar no ambiente, os íons livres do metal podem ligar-se com matéria orgânica, reduzindo a quantidade que está biodisponível (Muniz & Oliveira-Filho, 2008).

2.1.1 Metais pesados

Os metais pesados possuem grande densidade específica e geram toxicidade em muitas funções biológicas, sendo o metabolismo enzimático potencialmente sensível a esses elementos. O sítio de ligação dos metais pesados pode competir com o sítio de ligação de elementos essenciais ao organismo havendo, por isso, diferença de efeito em cada local e respostas diferentes de toxicidade entre espécies (Perottone, 2006). Todos os tipos de metais são considerados potencialmente tóxicos e capazes, portanto, de provocar efeitos biológicos adversos quando presentes em concentrações elevadas. O fator-chave é o grau de exposição que afeta o organismo. A exposição está relacionada tanto com a quantidade envolvida como com o tempo de exposição (Goyer, 1996). Dessa forma, a atividade de uma substância tóxica depende de sua concentração no organismo, já que a maioria dos metais pesados, mesmo se ingeridos em concentrações baixas, são venenos cumulativos para o organismo devido à meia vida longa (Guilherme et al., 2005).

Uma vez absorvidos, os metais pesados são geralmente retidos por proteínas e então transportados pelo sangue até tecidos onde podem ser estocados, ou biotransformados. A toxicidade causada por esses metais se deve à ocorrência de dois principais mecanismos de ação: formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas, o que prejudica o perfeito funcionamento do organismo; e danos as membranas celulares através do aumento da formação de radicais livres e destruição das defesas antioxidantes endógenas, levando a alteração ou impedindo completamente o transporte de substâncias essenciais (Goldhaber, 2003). Os efeitos tóxicos podem incluir efeitos letais e subletais como, alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (Rand & Petrolezzi, 1985).

2.2. Cádmi

O cádmio (Cd) é o elemento número 48 da tabela periódica, com um peso atômico de 112,4 (Varma, 1986). Embora inicialmente tenha sido descrito como um elemento relativamente raro (Valle & Ulmer, 1972; Wood, 1974), foi constatado posteriormente que se encontra presente no ambiente em baixos níveis (Varma, 1986). A concentração de cádmio na crosta terrestre varia entre 0,15 e 0,20 mg/kg, sendo o 67º metal em abundância e sua forma mais estável, em ambientes naturais, é o Cd^{+2} . (Mattiazzo-Prezotto, 1994).

Cádmio não apresenta função essencial ao organismo humano, animal, e ao metabolismo de plantas. Ele é um metal pesado muito utilizado em estudos de toxicologia devido ao aumento significativo da sua concentração no ambiente, resultante da crescente acumulação de resíduos industriais e domésticos (Goering et al., 1995), e por possuir caráter persistente e sofrer acumulação nos organismos (Alazemi et al., 1996). Estas características suscitaram pesquisas na área de alimentos, uma vez que este contaminante tem caráter cumulativo na cadeia biológica da qual o homem faz parte (Miranda, 1993). Como resultado do fenômeno de bioacumulação, as quantidades subtóxicas presentes no ambiente podem atingir níveis de risco nos elos finais da cadeia trófica (Volesky, 1990).

O cádmio acumula-se principalmente no fígado e nos rins, mas também nos testículos (Waalkes et al., 1992; Jarup & Akesson, 2009), em grande parte devido à alta concentração de metalotioneínas nesses órgãos. A metalotioneína é uma proteína intracelular de baixo peso molecular disponível no fígado, rim, intestino e pâncreas. Essa proteína é conhecida como substância bioquímica importante que se liga aos metais pesados, principalmente cádmio, a fim de minimizar seus efeitos tóxicos no organismo (ATSDR, 1999). Uma vez ingerido, o Cd é transportado, através do sangue, ligado à albumina, na maioria dos animais, e ao chegar ao fígado induz a síntese de metalotioneína à qual se complexa. O cádmio pode entrar em células eucarióticas ligado a proteínas transportadoras de zinco e também por algumas proteínas que são encontradas nos testículos (Dalton et al., 2005). Outra forma do Cd^{2+} entrar nas células é usando um cotransportador de metal divalente Fe^{2+}/H^+ e transportadores, como bombas de fluxo (Su et al., 2011). A ligação do metal à metalotioneína é feita através dos grupos tióis dos resíduos de cisteína que compõem a molécula de metalotioneína. Essas proteínas estão localizadas na membrana do aparelho de Golgi e protegem as células da citotoxicidade de metais pesados. Dessa maneira, grande quantidade de cádmio e/ou exposição prolongada a este metal pode ultrapassar a capacidade das metalotioneínas de se ligar ao Cd, causando assim lesões e até morte tecidual (Wong et al., 2010).

O cádmio é um importante tóxico ambiental que é liberado na atmosfera na forma de óxido de cádmio, cloreto de cádmio ou sulfeto de cádmio resultante de atividades industriais, como a fabricação de baterias e pigmentos, fundição e refino de metais e incineração de resíduos. Ele entra na cadeia alimentar via água e alimentos contaminados (WHO, 2000; ATSDR, 2008). A média de ingestão diária de cádmio por

pessoa é de aproximadamente 1 a 30 µg em alimentos e água, com um adicional de 2-30 µg de cádmio/pessoa/dia entre os usuários de cigarro (cada cigarro possui aproximadamente 1 a 2 µg de cádmio) (ATSDR, 2008; Pan et al., 2010). No entanto, o cádmio tem uma meia-vida extremamente longa, entre 20 e 40 anos em humanos e maior que 200 dias em roedores o que leva à bioacumulação no organismo (Kjellstrom & Nordberg, 1978; WHO, 2000; Wong et al., 2010).

O cádmio é facilmente absorvido e translocado nas plantas tendo potencial de entrar na cadeia alimentar humana, causando sérios problemas de saúde, como anemia, hipertensão, enfisema pulmonar, disfunções gástricas e intestinais e graves problemas reprodutivos (Dias et al., 2001). Ele afeta a função placentária, podendo atravessar a barreira placentária e provocar distúrbios no desenvolvimento fetal. Pode, também, ser excretado pelo leite. O organismo animal é particularmente suscetível à exposição ao Cd no período perinatal. (Picoli, 2004).

O Cd também atua como agente mitogênico promovendo a proliferação das células cancerosas da mama (Siewit et al., 2010; Yu et al., 2010). Em múltiplos órgãos o cádmio está associado a um aumento nos riscos de carcinogênese (Waalkes et al., 1992; Pan et al., 2010). Ele induz também lesão tecidual, através de apoptose e necrose (Templeton & Liu, 2010). Induzindo o estresse oxidativo o Cd desempenha um papel central na carcinogênese o que é confirmado pelas alterações significativas na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase em tecidos danificados por esse metal (Waalkes, 2003; Liu et al., 2009).

2.3. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O oxigênio molecular é indispensável à vida da maioria dos organismos. Entretanto, considerando as características químicas e as vias metabólicas de sua utilização, podem ocorrer algumas reações que resultam em efeitos deletérios à própria vida. Assim, os produtos intermediários de seu metabolismo, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs), estão envolvidos em diversos tipos de eventos oxidativos ocasionando a oxidação de estruturas celulares como membranas, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA), podendo causar disfunção celular (Halliwell & Gutteridge, 2006). Nas células, o oxigênio molecular não reage diretamente com os substratos, porém uma pequena parte do oxigênio consumido pode sofrer redução univalente seqüencial e formar ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. O

peróxido de hidrogênio pode ser precursor do radical hidroxil que é considerada a ERO mais reativa (Newsholme & Leech, 1994).

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais existe a produção constante de EROs acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de antioxidantes de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas (Davies, 1991). Um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante, de maneira que os primeiros sejam predominantes ou, na situação mais crítica, quando o aumento do sistema pró-oxidante vem acompanhado de uma redução paralela do sistema antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 2006).

As EROs podem afetar diferentes órgãos e organelas celulares onde são geradas, podendo acarretar variadas patologias (Rocha et al., 2003). Em espermatozoides humanos, as injúrias de EROs em fosfolípidos da membrana celular, induzem a geração de peróxidos de ácidos graxos, que estão associados com comprometimento da função espermática. Uma associação foi demonstrada entre a formação excessiva de EROs em espermatozoides e comprometimento da sua capacidade de fertilização, estando a geração de EROs negativamente associada com a penetração do espermatozoide no ovócito em ensaios de fertilidade *in vitro* (Aitken & West, 1990).

2.4. Fígado

O fígado possui uma das mais altas atividades de enzimas antioxidantes do corpo e está envolvido na maioria das desintoxicações do organismo. Ele é importante na degradação e bioativação dos compostos tóxicos ao organismo (Akhgari et al., 2003). É o órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos. É, portanto, uma interface entre o aparelho digestório e o sangue. A posição do fígado no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabólitos e para a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas pela bile (Junqueira & Carneiro, 2004). Os componentes estruturais do fígado incluem: hepatócitos, organizados como cordões celulares; estroma de tecido conjuntivo; veia central do lóbulo, nervos, vasos linfáticos e ducto biliar; capilares sinusóides entre os cordões de hepatócitos onde se encontram macrófagos, que no fígado são denominados células de Kupffer (Lee et al., 2001).

No metabolismo de carboidratos, o fígado desempenha funções específicas de armazenamento de glicogênio, conversão da galactose e frutose em glicose,

gliconeogênese e formação de vários compostos químicos importantes a partir dos produtos intermediários do metabolismo de carboidratos (Kierszenbaum, 2008). No metabolismo de gorduras, o fígado é responsável pela oxidação dos ácidos graxos para a produção de energia, pela formação da maioria das lipoproteínas, pela síntese de colesterol e fosfolipídios e pela conversão de grandes quantidades de carboidratos e proteínas em gordura (Motta, 2000; Widmaier et al., 2006).

O fígado é um órgão envolvido no metabolismo e na desintoxicação de vários componentes e assim, o hepatócito é susceptível à injúria devido à função de absorver e estar em contato com vários metabólitos, substâncias tóxicas e drogas (Lee et al., 2007). A capacidade de desintoxicação realizada pelo hepatócito é dependente do grande desenvolvimento do retículo endoplasmático liso (REL) presente em seu interior. No REL ocorre a modificação da molécula do agente agressor através dos processos de conjugação, metilação e oxidação tornando essas moléculas suscetíveis à ação das oxirredutases. Um vasto número de substâncias químicas usadas, industrial e farmacologicamente, fornece aumento constante do risco de lesões do fígado existindo um espectro muito grande de efeitos hepatotóxicos produzidos por estas substâncias. A maior causa de desordens do fígado ocorre devido à exposição a diferentes poluentes, metais pesados como o cádmio, xenobióticos como paracetamol, tetracloreto de carbono e álcool, que lesam o tecido hepático e levam à produção de espécies reativas de oxigênio (Sreelatha et al., 2009).

2.5. Testículo

Os testículos realizam as funções de espermatogênese e de esteroidogênese. São órgãos pares revestidos por uma espessa cápsula conjuntiva, a albugínea testicular, a qual envia septos para o interior da gônada, dividindo o testículo em lóbulos e formando o mediastino testicular. O parênquima testicular consiste na parte funcional dos testículos e apresenta dois compartimentos: o tubular e o intersticial ou intertubular (Russell et al., 1990). O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; Godinho, 1999). Neste compartimento, responsável pela produção dos espermatozóides, encontram-se túbulos seminíferos, que se conectam através das duas extremidades à rede testicular, localizada no mediastino de onde o conteúdo tubular é direcionado para dentro dos ductos eferentes e epidídimo. Os túbulos seminíferos são constituídos, de sua porção externa para a interna, de túnica própria, epitélio seminífero

e lume. Na túnica própria são observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e fibras colágenas (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998). As células mióides estão relacionadas com a movimentação de fluidos e espermatozóides pelos túbulos seminíferos (Russell et al., 1990). No epitélio seminífero estão presentes dois tipos celulares: as células de Sertoli e as células germinativas ou espermatogênicas. Juntamente com as células mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes funcionais distintos: o basal onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos e leptótenos), e o adluminal, onde se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Essa compartimentalização isola as células nas fases meiótica e pós-meiótica da espermatogênese formando a barreira hematotesticular. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um ambiente segregado do sistema imune e apropriado para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Sharpe, 1994). As junções entre as células de Sertoli modificam-se de modo a permitir a passagem dos espermatócitos em pré-leptóteno do ambiente basal para o adluminal, quando estes iniciam a meiose, o que significa que existe uma dinâmica das junções que permite que as células envolvidas no processo espermatogênico progridam no sentido da luz do túbulo, sem a ruptura da barreira (Lui et al., 2001). No lume tubular são encontrados o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides recém-espermiados (Russell et al., 1990). Parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, como diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos, apresentam uma relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo informações para o estabelecimento desse processo em uma dada espécie (França & Russell, 1998; Paula, 1999).

O compartimento intertubular é constituído de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras e células do tecido conjuntivo, como macrófagos e mastócitos, e células de Leydig. As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol, e são responsáveis pela manifestação dos caracteres sexuais secundários masculinos e pela manutenção da espermatogênese em animais sexualmente maduros (Bardin, 1996). A

célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente neste compartimento. (França & Russell, 1998)

A organização geral da espermatogênese é basicamente a mesma em todos os mamíferos. A espermatogênese é um processo sincrônico, no qual uma espermatogônia (célula diplóide) sofre uma série de divisões e se diferencia gradativamente em uma célula haplóide altamente especializada, o espermatozóide. Esse processo pode ser dividido em três fases, de acordo com as diferentes características funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial), na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica, que envolve a síntese de DNA no espermatócito em pré-leptóteno, síntese de RNA no espermatócito em paquíteno e finalização da meiose, durante a qual ocorre uma divisão reducional, acompanhada de recombinação gênica e uma divisão equacional na qual, teoricamente, cada espermatócito paquíteno dará origem a quatro espermátides haplóides; (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por mudanças estruturais e bioquímicas e diferencia-se em espermatozóide, um tipo celular estruturalmente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (Russell et al, 1990; Sharpe, 1994). Em seguida ocorre a espermição, quando os espermatozóides resultantes são liberados para o lume dos túbulos seminíferos (Kierszenbaum, 2008).

2.5.1. Efeitos do cádmio sobre o aparelho reprodutor masculino

Uma característica importante na toxicologia do cádmio é sua excepcional tendência em acumular-se no organismo, apresentando meia vida biológica longa. Esta tendência cumulativa é acentuada nos testículos (Oteiza et al., 1997), provavelmente devido ao fato de este órgão apresentar constantes processos de divisão e diferenciação, tornando-o mais suscetível a substâncias tóxicas (Yano & Dolder, 2002). A propensão dos testículos aos efeitos cumulativos e tóxicos do cádmio o torna um importante modelo experimental, aplicado não somente a estudos referentes à fertilidade de mamíferos, como também ao organismo em geral (Leite, 2008).

A dose mínima de Cd necessária para causar danos testiculares foi relatada por Gunn et. al. (1968), sendo de aproximadamente 0,44 mg/kg. Estudos utilizando doses maiores têm descrito diversas alterações morfológicas e bioquímicas nos testículos de mamíferos, tais como necrose testicular (Gunn et al.,1968), degeneração de células germinativas e aumento na taxa de peroxidação de lipídios (Oteiza et al., 1997). Estudos *in vitro* demonstram que o cádmio também afeta a viabilidade de células de Leydig,

reduzindo a produção de testosterona (Yang, 2003). Baixas doses de Cd induziram astenozoospermia (reduzida motilidade espermática), que está associada com infertilidade (Benoff et al., 2000). Estes achados são significativos porque eles suportam a noção de que a tendência atual de declínio da qualidade do sêmen, verificado pela contagem e motilidade dos espermatozóides em habitantes de países industrializados, é causada pelo menos em parte, pela exposição de baixo nível a tóxicos ambientais como o cádmio (Cheng & Mruk, 2011).

Embora seja sabido que o cádmio causa efeitos adversos nos órgãos reprodutores de ratos machos, poucos estudos têm quantificado morfometricamente alterações causadas pelo uso de suas baixas doses. O que se sabe é que doses mais baixas causam ligeiras alterações morfológicas testiculares (Predes et al., 2010; Wirth & Mijal, 2010).

Setchell & Waites (1970) relataram que o alvo primário da toxicidade de cádmio no testículo é a destruição da barreira hematotesticular, seguido por hemorragia de microvasos no tecido intersticial. Vários estudos mostram que, embora a barreira hematotesticular seja uma das barreiras sanguíneas mais eficientes é mais suscetível aos danos induzidos pelo cádmio em relação à barreira hematoencefálica, hematoepididimária, ou microvasos localizados no interstício. Isso ocorre, pois o cádmio atua principalmente nas junções onde as moléculas de adesão celular são Ca^{2+} dependentes (Setchell & Waites, 1970; Hew et al., 1993; Cheng & Mruk, 2002; Cheng & Mruk, 2011). Estudos feitos por Prozialeck & Lamar (1999) ilustram que o Cd^{2+} interage com os sítios de ligação do Ca^{2+} substituindo assim Ca^{2+} nestas moléculas de adesão celular. O Cd, por sua vez, interrompe a caderina E nas junções de epitélios e endotélios, reforçando a hipótese que a caderina E pode ser um alvo molecular direto de toxicidade do cádmio (Prozialeck, 2000). Nos vasos sanguíneos a caderina está protegida por junções fibrilares, por exemplo, claudinas que independem de Ca^{2+} (Wong & Cheng, 2005) enquanto a barreira hematotesticular é composta de junções dependentes de Ca^{2+} . Assim, as caderinas que estão localizadas na barreira hematotesticular são mais suscetíveis a ação tóxica do Cd^{2+} (Lee et al., 2003).

Hew et al. (1993) relataram que o Cd induz falha na espermiacção em ratos pela interrupção no transporte de espermátide alongada, já que estas permanecem incorporadas dentro do epitélio seminífero, evidenciando que o cádmio é capaz de interromper a comunicação Sertoli-espermátide, que é conhecida por ser crucial para o transporte de espermátides em todo o epitélio durante o ciclo do epitélio seminífero (Mruk & Cheng, 2004).

Outro mecanismo de ação tóxica deste metal é o aumento da produção de radicais livres, os quais geram danos oxidativos em DNA, lipídios e proteínas (Ilkes et al., 2004) o que, por sua vez, desestabiliza a junção entre as células do testículo destruindo assim a barreira hematotesticular (Wong & Cheng, 2011). O Cd atua em enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, que modulam estresse oxidativo. De fato, um aumento do estresse oxidativo foi registrado em aproximadamente 80% dos homens inférteis clinicamente comprovados que tiveram exposição, em longo prazo, à metais pesados, estando assim esse fator comprovadamente relacionado à infertilidade masculina (Kiziler et al., 2007; Venkatesh et al., 2011). Lesão na barreira hematotesticular leva à perda de células germinativas do epitélio induzindo disfunção reprodutiva masculina como resultado da perda prematura de células germinativas, levando à redução do número de espermatozóides, da qualidade do sêmen e, eventualmente, causando infertilidade masculina (Cheng & Mruk, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O presente estudo avaliou os efeitos crônicos de quatro diferentes doses de cádmio nos diferentes compartimentos do testículo e fígado de ratos Wistar adultos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliação, através de morfometria, dos efeitos crônicos de diferentes concentrações de cádmio no fígado e no testículo;
- Avaliação dos teores de cádmio nos diferentes tecidos;
- Avaliação das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo;
- Avaliação qualitativa e quantitativa, através de análises histométricas, estereológicas e histopatológicas, possíveis alterações no processo espermatogênico, bem como nas estruturas testiculares e hepáticas nos ratos expostos a baixas dosagens de cádmio em condições experimentais.

4. REFERÊNCIAS

Aitken, R.J., West, K.M. 1990. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Journal of Andrology* 13:433-451.

- Akhgari, M., Abdollahi, M., Kebryaezadeh, A., Hosseini, R., Sabzevari, O. 2003. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human Experimental Toxicology* 22:205-211.
- Alazemi, B.M., Lewis, J.W., Andrews, E.B. 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environmental Technology* 17: 225-238.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Portaria 685 de 27 de agosto de 1998. Diário Oficial da União, Brasília.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1999. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US. Available at: ><http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2008. Cadmium toxicity: ATSDR Case Studies in Environmental Medicine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=6&po=0>
- Bardin, C.W.1996. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (eds). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, Cap.2, p.31-42.
- Benoff, S., Jacob, A., Hurley, I.R. 2000. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Reproduction Update* 6:107-121.
- Beveridge, T.J., Hugles, M.N., Lee, H., Leung, K.T., Poole, R.K., Savivaidis, I., Silver, S., Trevors, J.T. 1997. Metal microbe interactions: contemporary approaches. *Advances in Microbial Physiology*, 38:177-243.
- Bonde, J.P. 2010. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian Journal of Andrology* 12:152–156.
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological Reviews* 82:825-874.
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D. 2011. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews* 64:16-64.
- Cheng, C.Y., Wong, E.W., Lie, P.P., Li, M.W., Su, L., Siu, E.R., Yan, H.H., Mannu, J., Mathur, P.P., Bonanomi, M. 2011. Environmental toxicants and male reproductive function. *Spermatogenesis* 1:2-13.

- Chiquoine, A.D. 1964. Observations on the early events of cadmium necrosis of the testis. *Anatomical Record* 149:23-35.
- Dalton, T.P., He, L., Wang, B., Miller, M.L., Jin, L., Stringer, K.F., Chang, X., Baxter C.S., Nebert, D.W. 2005. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102:3401-3406.
- Davies, K.J.A. 1991. *Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medical aspects*. Oxford: Pergamon Press, 899p.
- Dias, N.M.P., Alleoni, L.R.F., Casagrande, J.C., Camargo, O.A. 2001. Isotermas de adsorção de cádmio em solos ácidos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 5:229-234.
- França, L.R., Russell, L.D. 1998. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, R. (Eds.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Communications, pp.198-219.
- Godinho, C.L. 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduro. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 79p.
- Goering, P.L., Waalkes, M.P., Klaasen, C.D. 1995. Toxicology of cadmium. In: Boyer, R.A., Cherian, M.G. *Toxicology of Metals: Biochemical aspects*. Springer, Berlin, pp.189-214.
- Goldhaber, S.B. 2003. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 38: 232-242.
- Goyer, R. A. 1996. Toxic Effects of Metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.). *Casarett & Doull's toxicology: The basic science of poisons*. McGraw Hill, New York, pp. 691-736.
- Guilherme, L.R.G., Marques, J.J., Pierangeli, M.A.P., Zuliani, D.Q., Campos, M.L., Marchi, G. 2005. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos em Ciências do Solo* 4:345-390.
- Gunn, S.A., Gould, T.C., Anderson, W.A.D. 1968. Mechanisms of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium induced vascular injury to mouse testis. *Journal of Reproduction and Fertility* 15:65-70.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2006. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA, 704p.

- Hew, K.W., Heath, G.L., Jiwa, A.H., Welsh, M.J. 1993. Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction* 49:840-849.
- Ilkes, A., Suzen, H.S., Aydin, A., Karagaya, A. 2004. The oxidative DNA base damage in testes of rats after intraperitoneal cadmium injections. *Biometals* 17: 371-377.
- Jarup, L., Akesson, A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238:201-208.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. 2004. Órgãos associados ao trato digestivo. In: Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Histologia Básica. Décima Edição*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 317-338.
- Kierszenbaum, A.L. 2008. *Histologia e Biologia Celular - Uma introdução à Patologia*. Elsevier, Rio de Janeiro, 696p.
- Kiziler, A.R., Aydemir, B., Onaran, I., Alici, B., Ozkara, H., Gulyasar, T., Akyolcu, M.C. 2007. High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biological Trace Element Research* 120:82-91.
- Kjellstro, M. T., Nordberg, G.F. 1978. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environmental Research* 16:248-269.
- Larison, J.R., Likens G.E., Fitzpatrick J. W., Crock. J. G. 2010. Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains. *Nature* 406:181-183.
- Lee, C.H., Park, S.W., Kim, Y.S., Kang, S.S., Kim, J.A., Lee, S.H. 2007. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Biological & Pharmacological Bulletin* 30:1898-1904.
- Lee, K.S., Lee, S.J., Park, H.J., Chung, J.P., Han, K.H., Chon, C.Y., Lee, S.I., Moon, Y.N. 2001. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Medical Journal* 42:1-8.
- Lee, N.P., Mruk, D., Lee, W.M., Cheng, C.Y. 2003. Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis? *Biology of Reproduction* 68:489-508.
- Leite, C.M.B., Bernardes, R.S.O., Sebastião, A. 2004. Método Walkley-Black na determinação da matéria orgânica em solos contaminados por chorume. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 8: 111-115.

- Leite, R.P. 2008. Efeitos da associação de cloreto de cádmio e guaraná (*Paullinia cupana*) no testículo de ratos Wistar: análise morfométrica, estrutural e ultraestrutural. Dissertação (Mestrado). Unicamp, Campinas, São Paulo, 82p.
- Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238:209-214.
- Lui, W.Y., Lee, W.M., Cheng, C.Y. 2001. Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology* 142:1865-1877.
- Mattiazzo-Prezotto, M.M. 1994. Comportamento de cobre, cádmio, cromo, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH. Piracicaba. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 197p.
- Miranda, C.E.S. 1993. Determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com pré-concentração em resina de troca iônica empregando sistema FIA. Dissertação (Mestrado). Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 89p.
- Motta, V.T. 2000. Bioquímica Clínica: Princípios e interpretações. 3° ed. Medbook, Porto Alegre, 400p.
- Mruk, D.D., Cheng, C.Y. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 25:747-806.
- Muniz, D.H.F., Oliveira-Filho, E.C. 2008. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. *Oecological Brazilian*. 12: 680-693.
- Murphy, V.A. 1996. Cadmium: acute and chronic neurological disorders. In: Yasui, M., Strong, M.J, Ota, K. Verity, M.A. (Eds.). *Mineral and Metal Neurotoxicology*. Boca Raton: CRC Press, 480p.
- Newsholme, E.A., Leech, A.R. 1994. *Biochemistry for the medical science*. Chichester: John Willey & Sons, 982p.
- Ognjanović, B., Žikić, R.V., Štajn, A., Saičić, Z.S., Kostić, M.M., Petrović, V.M. 1995. The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium. *Physiological Research* 44:293-300.

- Oteiza, P.I., Olin, K.L., Fraga, C.G.;Keen, C.L. 1997. Oxidative defense system in testes from zinc deficient rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 213:85-91.
- Pan, J., Plant, J.A., Voulvoulis, N., Oates, C.J., Ihlenfeld, C. 2010. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environmental Geochemistry and Health* 32:1-12.
- Parizek, J., Zahor, Z. 1956. Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 177:1036-1037.
- Parizek, J. 1960. Sterilization of the male by cadmium salts. *Journal of Reproduction and Fertility* 1:294-309.
- Paula, T.A.R. 1999. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 84p.
- Perottone, J. 2006. Avaliação dos efeitos promovidos pelo chumbo, selênio e/ou sacarose em parâmetros oxidativos em roedores. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 100p.
- Phillips, K.P., Tanphaichitr, N. 2008. Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews* 11:188-220.
- Picoli, L.C. 2004. Efeito do cádmio no soalho da boca de ratos durante a lactação. *Brazilian Oral Review* 18:105-109.
- Porfírio, R.A. 2006. Avaliação dos teores de cádmio, cobre, chumbo, zinco e cromo em mexilhões perna perna na ilha do frade. Monografia. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo.
- Predes, F.S., Diamante, M. A. S., Dolder, M.A.H..2010. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology* 91:125–131.
- Prozialeck, W.C., Lamar, P.C. 1999. Interaction of cadmium with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. *Biochemica et Biophysica Acta* 1451:93-100.
- Prozialeck, W.C. 2000. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 164:231–249.
- Rand, G.M., Petrocelli, S.R. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere, New York 666p.

- Rocha, M.E.M., Dutra, F., Bandy, B., Baldini, R.L., Gomes, S.L., Faljoni-Alario, A. 2003. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Archive Biochemistry and Biophysics* 409:349–65
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha, H.A.P., Clegg, E.D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Bolesta: Cache River Press*, 286p.
- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York, pp.1363-1434.
- Setchell, B.P., Waites, G.M. 1970. Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat. *Journal of Endocrinology* 47:81-86.
- Setchell, B.P. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P.T. (Ed.). *Reproduction in domestic animals*. Academic, San Diego, 6:221-250.
- Siewit, C.L., Gengler, B., Vegas, E., Puckett, R., Louie, M.C. 2010. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER α and c-Jun. *Molecular Endocrinology* 24:981-992.
- Sreelatha, S., Padma, P.R., Umadevi, M. 2009. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 47:702-708.
- Štajn, A., Žikić, R.V., Ognjanović, B., Saičić, Z.S., Pavlović, S.Z., Kostić, M.M., Petrović, V. M. 1997. Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117:167-172.
- Su, L., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, C.Y. 2011. Drug transporters and blood-testis barrier function. *Journal Endocrinology* 209:337-351.
- Telisman, S., Colak, B., Pizent, A., Jurasovic, J., Cvitkovic, P. 2007. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environmental Research* 105:256-266.
- Templeton, D.M., Liu, Y. 2010. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chemical Biological Interact* 188:267-275.
- Valle, B.L., Ulmer, D.D. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annual Review of Biochemistry* 41:91-128.
- Varma, A. 1986. *Handbook of atomic absorption analysis*. CRC Press, Boca Ranton, 464p.
- Venkatesh, S., Shamsi, M.B., Dudeja, S., Kumar, R., Dada, R. 2011. Reactive oxygen species measurement in neat and washed semen: comparative analysis and its

- significance in male infertility assessment. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 283:121-126.
- Volesky, B. 1990. *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, Boca Raton, 396p
- Waalkes, M.P. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research* 533:107-120.
- Waalkes, M.P., Coogan, T.P., Barter, R.A. 1992. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Critical Review in Toxicology* 22:175-201.
- WHO (World Health Organization). 2000. Cadmium, in *Air Quality Guidelines*, pp 136–138, World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark. Available at: www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf
- Widmaier, P., Strang K.T., Haff, H.E. 2006. *Fisiologia Humana*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 834p.
- Wirth, J.J., Mijal, R.S. 2010. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Systems Biological Reproductive Medical* 56:147-167.
- Wong, C.H., Cheng, C.Y. 2005. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Current Topics in Development Biology* 71:263-296.
- Wong, E.W., Cheng, C.Y. 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacology Science* 32:290-299.
- Wong, E.W., Yan, H.H., Li, M.W., Lie, P.P., Mruk, D.D., Cheng, C.Y. 2010. Cell junctions in the testis as targets for toxicants. In: Hoyer, P.B., Richburg, J.H. (Eds.). *Reproductive and Endocrine Toxicology*, Academic Press/Elsevier, Oxford, pp 167-188.
- Wood, J.M. 1974. Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science* 183:1049-1052.
- Yang, J. M. 2003. Cadmium- induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive Toxicology* 17:553-560.
- Yano, C.L., Dolder, H. 2002. Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment. *Contraception* 66: 463-467.
- Yu, M., 2004. *Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants*. CRC Press, 339p.

Yu, X., Filardo, E.J, Shaikh, Z.A. 2010. The membrane estrogen receptor GPR30 mediates cadmium-induced proliferation of breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245:83-90.

DANOS OXIDATIVOS E HISTOLÓGICOS CRÔNICOS EM FÍGADO DE RATOS EXPOSTOS A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO

RESUMO

Foram investigados os efeitos crônicos de baixas doses de cádmio, contaminante ambiental dos mais tóxicos dentre os metais pesados, no fígado de ratos Wistar. Cinco grupos experimentais foram testados, sendo um controle e os restantes recebendo as doses de 0,67; 0,74; 0,86 e 1,1 mg de Cd/kg PC/IP, respectivamente. Os animais foram eutanasiados 56 dias após a aplicação, sendo feitas análises de biometria corporal e hepática, variação no ganho de peso, edema do fígado, quantificação do cádmio hepático, atividade de marcadores de estresse oxidativo superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além de estereologia e histopatologia hepática. Ocorreu aumento da atividade da SOD e CAT, juntamente com diminuição no acúmulo de glicogênio pelos hepatócitos e aumento no percentual de capilares sinusóides, vasos sanguíneos, hepatócitos binucleados e macrófagos (células de Kupffer) nos animais expostos ao cádmio. O percentual de núcleo aumentou no grupo tratado com a maior dose (Cd4) e o percentual de citoplasma diminuiu nos grupos tratados com as duas maiores doses (Cd3e Cd4). Houve também aumento no índice hepatossomático e de edema no fígado dos animais expostos à maior dose de Cd (Cd4). Áreas de necrose foram encontradas nos animais expostos às três maiores doses (Cd2; Cd3 e Cd4). Conclui-se que já na dose de 0,67mg/kg, o cádmio pode provocar efeitos adversos no fígado, devido ao aumento de danos morfológicos e na atividade funcional do parênquima hepático, e que os efeitos crônicos do cádmio ocorrem, também, através da indução do estresse oxidativo, comprovado pelo aumento das atividades das enzimas antioxidantes endógenas CAT e SOD.

Palavras-chave: Metal pesado, danos hepáticos, estresse oxidativo, células de Kupffer.

1. INTRODUÇÃO

O fígado desempenha papel crucial na desintoxicação do organismo. Armazena algumas vitaminas e carboidratos digeridos, na forma de glicogênio, que é quebrado liberando glicose para manter os níveis de açúcar no sangue. O fígado é também um local de síntese de enzimas, colesterol, proteínas, fatores de coagulação sanguínea, bile, vitamina A e outras moléculas. Embora seja conhecida a capacidade do fígado de se regenerar em certas condições, este órgão pode, no entanto, ser severamente danificado pela exposição aguda a altas doses de produtos químicos e/ou metais pesados, como o cádmio (Cd), ou por exposição repetida a baixas doses dessas mesmas substâncias (Yu, 2004).

O aumento da industrialização teve como consequência o aumento na exploração e utilização de Cd deixando não apenas os trabalhadores industriais, mas também a população em geral exposta aos efeitos tóxicos deste metal pesado (Ognjanovic et al., 2009). A população está exposta ao Cd através da água potável, alimentos (Ji et al., 2009) e à fumaça de cigarro, pois as plantas de tabaco seletivamente acumulam o metal proveniente do solo (Joseph, 2009). A carga tóxica e o tempo de contaminação são fundamentais na determinação da qualidade e da intensidade das manifestações a serem apresentadas em indivíduos contaminados. Por possuir meia-vida longa, o Cd acumula e pode acarretar desordens no sistema endócrino e alterar os mecanismos de absorção, secreção e excreção de diversas substâncias (Murphy, 1996).

O fígado é muito suscetível a exposição ao Cd e a gravidade da sua intoxicação depende da rota, dose e duração da exposição ao metal (Ognjanović et al. 1995; Štajn et al., 1997). Na célula, o Cd acumula principalmente no citosol (70%), seguido pelo núcleo (15%) e, em menor proporção, nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático (Casalino et al., 1997). O Cd manifesta efeitos tóxicos por alterar o sistema de enzimas antioxidantes, levando ao aumento da produção de radicais livres, como por exemplo, os radicais hidroxila, que por sua vez afetam DNA, lipídios e proteínas, gerando danos oxidativos nas estruturas membranosas como retículo endoplasmático e mitocôndrias, causando falhas e até inativando o mecanismo de fosforilação oxidativa (Jamba et al., 1997; O'Brien & Salasinski, 1998; Stohs et al., 2000; Ilkes et al., 2004). Células e tecidos normalmente possuem mecanismos endógenos de defesa antioxidante e mecanismos provenientes da dieta que são especializados na remoção de radicais livres (Haslam, 1996; Patra et al., 1999). A superóxido dismutase (SOD) faz parte do sistema

antioxidante endógeno que converte radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Sarkar et al., 1997; Faraci et al. 2004). A catalase (CAT) reduz peróxido de hidrogênio à água, catalisando esta reação com taxas extremamente elevadas, possuindo importante papel na proteção do organismo quando o mesmo se encontra sob elevado estresse oxidativo (Cohen et al., 1996; Sarkar et al., 1998).

Assim, os modelos de lesões hepáticas induzidas pelo Cd necessitam ser estudados para serem definidos os danos causados por baixas doses de exposição, que são as que usualmente ocorrem em contaminações ambientais. Dessa maneira, os objetivos deste estudo foram qualificar e quantificar os efeitos crônicos de diferentes doses de Cd, através de análises de quantificação do metal, avaliação do estresse oxidativo, análises morfométricas e histopatologia hepática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Trinta ratos Wistar machos, com setenta dias de idade e pesando (média± desvio padrão) 236±23g, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (Brasil) e mantidos sob condições de temperatura controlada (21±2°C) com umidade relativa do ar de 60 a 70% e 12 horas de luz diárias. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo CEUA/ UFV (Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil), cujo protocolo de aprovação é 030/2010.

2.2. Tratamentos

O cloreto de cádmio (CdCl₂, Fluka/Sigma, St Louis, MO, USA) foi dissolvido em água destilada e a aplicação foi feita em dose única via intraperitoneal (IP). Os trinta ratos foram separados ao acaso em cinco grupos de seis animais: 1) SAL (controle) - os animais receberam uma dose única de solução salina (NaCl 0,9%); 2) Cd1 - CdCl₂ na concentração de 1,1 mg/kg de peso corporal (PC), correspondente a 0,67 mg de cádmio (Cd/kg); 3) Cd2 - CdCl₂ na concentração de 1,2 mg/kg PC (0,74 mg de Cd/kg PC); 4) Cd3 - CdCl₂ na concentração de 1,4 mg/kg PC (0,86 mg de Cd/kg PC); 5) Cd4 - CdCl₂ na concentração de 1,8 mg/kg PC (1,1 mg de Cd/kg PC).

2.3. Eutanásia e análises biométricas

Cinquenta e seis dias após a aplicação os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg/IM) e xilazina (3 mg/kg/IM) (Viana, 2007). Após laparotomia, o fígado foi removido e pesado em balança analítica e dois fragmentos hepáticos de cada animal foram rapidamente removidos, um dos quais foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C e o outro imerso em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965). O tecido hepático restante foi utilizado para medir o teor de água por unidade de peso do tecido (mL/g). Essa análise (índice de edema) foi feita pela relação da massa fresca e a massa seca do órgão (peso úmido - peso seco), sendo a massa seca obtida após secagem do órgão em estufa 70°C, até atingir peso seco constante.

Para cálculo da variação de Peso Corporal (PC) os animais foram pesados no início e no final do experimento. O índice hepatossomático (IHS) foi obtido pela relação entre o peso do fígado (PF) e o peso corporal (PC), sendo $IHS=PF/PC \times 100$.

2.4. Análises enzimáticas

Amostras de 100 mg de fígado congelado foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (PBS), centrifugadas a 3.500 xg a frio (5°C) sendo o sobrenadante utilizado para análise das atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). A atividade da SOD foi avaliada segundo metodologia de Madesh e Balasubramanian (1998) e da CAT avaliada pelo método de Aebi (1984), pela mensuração da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.5. Morfometria

Os fragmentos de fígado, fixados por 24 horas, foram transferidos para álcool 70%, desidratados em série etanólica crescente, e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de 3 µm de espessura foram obtidas utilizando-se micrótopo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha) usando navalhas de vidro. Alguns cortes foram corados por hematoxilina/eosina para análises morfométricas e histopatológicas e outros foram corados pelo método de PAS para identificação de glicogênio. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Para evitar a repetição das análises na mesma célula os cortes foram feitos de modo semi-seriado

em intervalos regulares de 15 µm. As preparações foram analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-60®, Tóquio, Japão) e as imagens capturadas usando um fotomicroscópio (Olympus AX 70 TRF). A histomorfometria e quantificação das patologias foram realizadas utilizando o software para análises de imagem Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

A proporção dos componentes hepáticos (citoplasma e núcleo de hepatócitos, hepatócitos binucleados, capilares sinusóides, vasos sanguíneos e células de Kupffer) e histopatologias (gotículas lipídicas e áreas de necrose) foram determinadas utilizando uma grade com 266 intersecções (pontos) observando-se dez campos por animal, em aumento de 200X, totalizando dois mil seiscentos e sessenta pontos por animal.

Para análises de glicogênio foram avaliados dez campos aleatórios por animal, em preparações coradas pelo método de PAS, sendo fotografadas em aumento de 200X. A densidade volumétrica de glicogênio foi calculada através da contagem de pontos sobre as inclusões citoplasmáticas de glicogênio e aplicando a fórmula $V_v = P_p/P_t$, onde P_p é o número de pontos situados sobre as inclusões de glicogênio e P_t é o número total de campos na área determinada para o teste (Mandarim-de-Lacerda, 2003; Novaes et al., 2011)

2.6. Determinação da concentração de cádmio tecidual

Amostras de fígado foram pesadas em balança digital analítica (precisão 0,0001g – BEL Mark 210A) e posteriormente secas em estufa a 70°C, até peso seco constante. As amostras secas foram colocadas em Erlenmeyers de 25 mL juntamente com 1,5 mL de HNO₃ concentrado e 0,5 mL de HClO₄ (70%) e transferidas para uma chapa aquecedora onde a temperatura foi sendo aumentada gradativamente, a partir de 70 °C até 90°C, de modo que a digestão do material fosse completa. O tempo médio gasto para a digestão foi de 30 minutos. Após a digestão, as amostras foram diluídas em 25 mL de água deionizada e filtradas em papel de filtro. A determinação da concentração de cádmio nessas amostras foi feita em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

2.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão (média±dp). Comparações entre os grupos foram feitas usando o programa Statistica (ANOVA/

MANOVA), através do teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Significância estatística foi estabelecida para $p > 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros biométricos e concentração do metal no fígado

Os parâmetros biométricos e a concentração de cádmio estão dispostos na Tabela 1. Não houve diferença significativa no peso corporal e no peso do fígado entre os grupos. A variação do peso corporal foi menor nos grupos tratados com as duas maiores doses (Cd3 e Cd4) em relação ao grupo SAL. Os índices de edema e a concentração de metal no fígado, tanto por grama de matéria seca quanto de matéria fresca, foi maior no grupo Cd4 em relação ao grupo SAL. O índice hepatossomático (IHS) foi maior no grupo Cd4 em relação aos outros grupos experimentais.

Tabela 1. Parâmetros biométricos e concentração de cádmio no fígado de ratos Wistar expostos a diferentes doses de cádmio

	SAL	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4
PC	413,75±25,79 ^a	383,67±20,9 ^a	366,00±33,44 ^a	362,8±28,79 ^a	372,40±27,26 ^a
VP	168,75±25,79 ^a	145,33±26,58 ^{ab}	147,67±14,32 ^{ab}	119,80±27,87 ^b	129,4±14,2 ^b
PF	13,09±0,88 ^a	11,59±1,53 ^a	12,46±1,46 ^a	11,44±2,03 ^a	14,18±1,14 ^a
IHS	3,16±0,12 ^a	3,02±0,36 ^a	3,40±0,15 ^a	3,15±0,55 ^a	3,82±0,22 ^b
Edema	0,54±0,02 ^a	0,58±0,03 ^{ab}	0,57±0,03 ^{ab}	0,58±0,03 ^{ab}	0,61±0,02 ^b
Cd MS	34,65±6,14 ^a	53,26±17,71 ^{ab}	64,96±12,75 ^{ab}	53,52±14,62 ^{ab}	73,36±25,91 ^b
Cd MF	15,75±2,97 ^a	22,73±8,37 ^{ab}	27,71±4,40 ^{ab}	20,98±6,15 ^{ab}	33,11±13,32 ^b

SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. PC = Peso corporal (g); VP = Variação de peso (g); PF = Peso do fígado (g); IHS = Índice hepatossomático; MS = Matéria seca; MF = Matéria fresca; Edema (mL de água/g de tecido); Cd MS (μ g de Cd /g de matéria seca); Cd MF (μ g de Cd /g de matéria fresca). Dados expressos como média±dp. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

3.2. Parâmetros estereológicos, histomorfométricos e histopatológicos hepáticos

Os dados da estereologia hepática são mostrados na Tabela 2. Não houve diferença no diâmetro nuclear e no volume dos núcleos dos hepatócitos. Porém, houve

diminuição do volume citoplasmático e do volume celular no grupo Cd4 em relação ao grupo SAL e o Cd1. A relação nucleoplasmática (RNP) apresentou aumento no grupo Cd4 em relação aos demais grupos aumentando também nos grupos Cd1, Cd2 e Cd3 em relação ao grupo SAL. O percentual de glicogênio diminuiu em todos os grupos expostos ao cádmio em relação ao grupo SAL (Figura 3).

Tabela 2. Parâmetros estereológicos hepáticos de ratos Wistar expostos a diferentes doses de cádmio

	SAL	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4
DN	8,59±0,62 ^a	8,61±1,03 ^a	8,11±0,68 ^a	8,6±0,77 ^a	7,95±0,34 ^a
VN	336,40±70,74 ^a	345,42±116,5 ^a	283,4±71,45 ^a	339,34±93,92 ^a	264,0±34,24 ^a
VCt	3785,0±675,3 ^a	3912,1±1091,6 ^a	2843,2±677 ^{ab}	3162,2±422,7 ^{ab}	2036,1±350,2 ^b
VCe	4102,8±715,8 ^a	4296,2±1179,2 ^a	3125,6±747,8 ^{ab}	3464,4±470,4 ^{ab}	2286,2±364,3 ^b
RNP	8,45±0,31 ^a	10,16±0,88 ^b	9,95±0,44 ^b	9,77±0,73 ^b	12,46±1,25 ^c
Glic	46,22±6,00 ^a	16,44±7,34 ^b	27,44±4,43 ^b	27,78±4,35 ^b	22,00±2,65 ^b

SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. DN = Diâmetro nuclear (μm); VN = Volume nuclear (μm^3); VCt = Volume citoplasmático (μm^3); VCe = Volume celular (μm^3); RNP = Relação nucleoplasmática; Glic = Glicogênio (%). Dados expressos como média±dp. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Os dados de histomorfometria e histopatologia hepáticas são mostrados na Tabela 3. Não houve diferença no percentual de hepatócitos e no acúmulo de gotículas lipídicas (GL) no citoplasma dessas células. O percentual de núcleo aumentou no grupo tratado com a maior dose em relação aos demais grupos. Houve redução do percentual de citoplasma nos grupos Cd3 e Cd4 em relação aos grupos SAL e Cd1. O percentual de capilares sinusóides, vasos sanguíneos, hepatócitos binucleados e glicogênio foram maiores nos quatro grupos tratados em relação ao SAL. O percentual de macrófagos foi maior em todos os grupos tratados em relação ao controle e o grupo Cd8 apresentou-se aumentado também em relação aos grupos Cd1 e Cd2.

Tabela 3. Parâmetros histomorfométricos e histopatologias hepáticas de ratos Wistar expostos a diferentes doses de cádmio

%	SAL	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4
Núcleo	5,45±0,17 ^a	6,38±0,53 ^a	6,12±0,28 ^a	5,84±0,58 ^a	7,37±0,8 ^b
Citoplasma	64,51±1,01 ^a	64,13±2,16 ^a	61,52±0,73 ^{ab}	59,12±1,7 ^b	59,69±2,11 ^b
Hepatócito	69,98±1,25 ^a	69,26±1,02 ^a	67,64±0,87 ^a	66,05±0,86 ^a	66,95±2,64 ^a
CS	26,72±2,91 ^a	22,95±1,30 ^b	23,38±0,56 ^b	23,59±0,86 ^b	21,26±1,2 ^b
VS	3,31±0,88 ^a	5,14±0,57 ^b	4,57±0,47 ^b	5,59±0,43 ^b	4,9±1,38 ^b
Macrófago	0,79±0,15 ^a	1,53±0,25 ^b	1,6±0,23 ^b	1,95±0,35 ^{bc}	2,29±0,22 ^c
HB	0,61±0,25 ^a	1,32±0,50 ^b	1,28±0,1 ^b	1,26±0,17 ^b	1,48±0,32 ^b
GL	0,32±0,13 ^a	0,33±0,33 ^a	0,13±0,03 ^a	0,27±0,27 ^a	0,78±0,64 ^a

SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. CS = Capilares sinusóides; VS = Vasos sanguíneos; HB = Hepatócitos binucleados; GL = Gotículas lipídicas. Os dados são expressos como média±dp. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Áreas de necrose foram observadas nos grupos expostos as três maiores doses de Cd (Figura 2). Sendo o percentual significativamente maior nos grupos tratados com as três maiores doses em relação aos grupos SAL e Cd1, como mostrado na Figura 1.

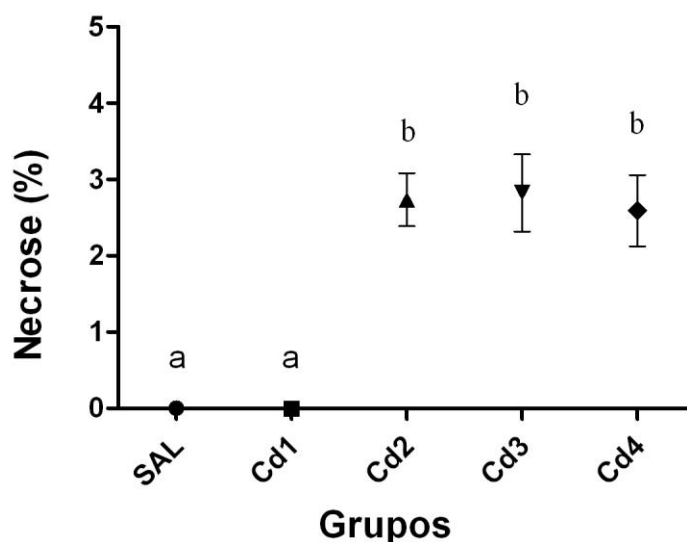


Figura 1. Percentuais de necrose no tecido hepático de animais expostos a diferentes doses de Cd. SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Fotomicrografias representativas do fígado de ratos Wistar controle e expostos a diferentes doses de Cd são mostradas na Figura 2. Podem ser observados núcleo de hepatócito, capilar sinusóide, hepatócito binucleado, gotícula lipídica e macrófago. São observadas áreas de necrose nos grupos Cd2, Cd3 e Cd4.

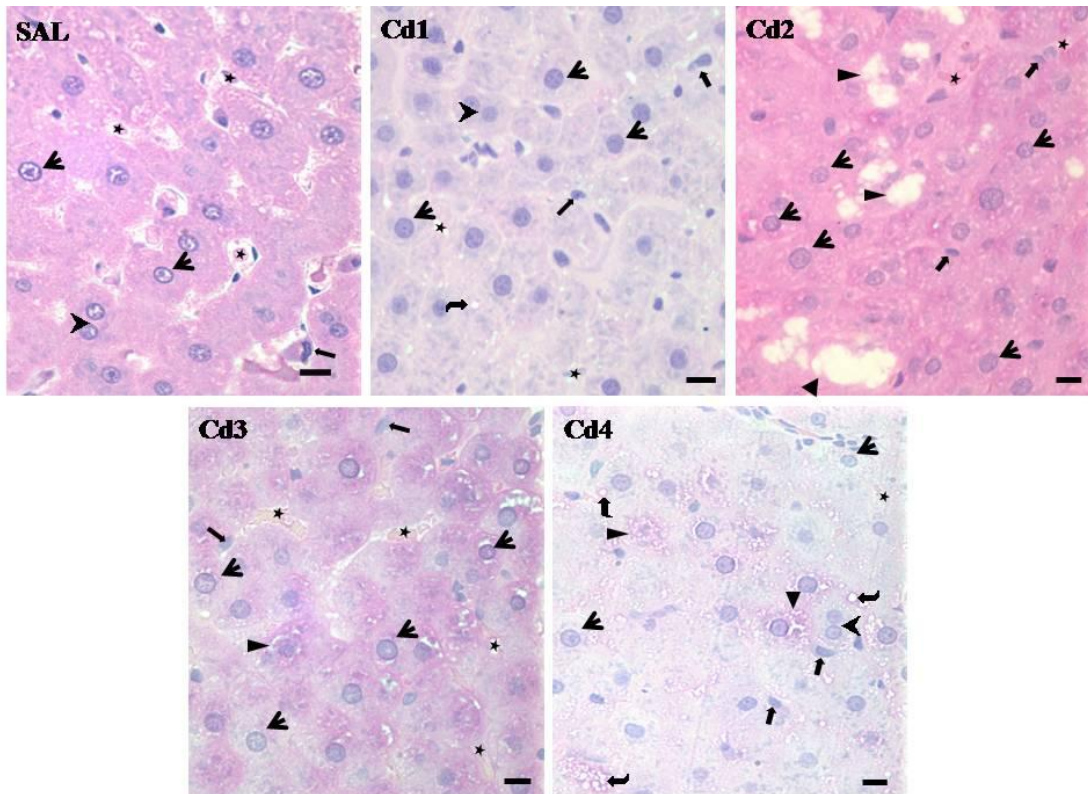
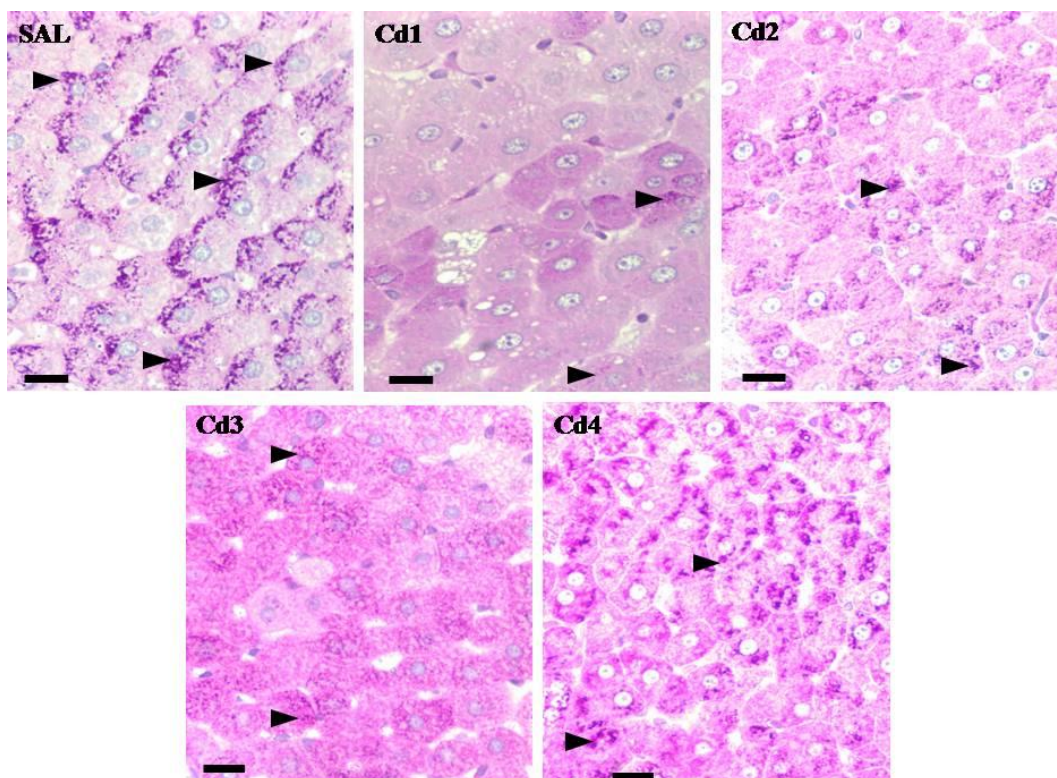


Figura 2. Fotomicrografias representativas do fígado de ratos Wistar expostos a diferentes doses de Cd. (→) Núcleo de hepatócito; (▶) Área de necrose; (★) Capilar sinusóide; (►) Hepatócito binucleado; (↪) Gotícula lipídica; (◄) Macrófago. SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. H.E. Barra = 10µm.

3.3. Armazenamento de glicogênio pelos hepatócitos

Fotomicrografias representativas do fígado de ratos Wistar controle e expostos a diferentes doses de Cd, coradas pelo PAS para marcação de inclusões citoplasmáticas de glicogênio, são mostradas na Figura 3. O percentual glicogênio foi maior nos quatro grupos tratados em relação ao SAL, como é mostrado na Tabela 2.



F 3. Fotomicrografias representativas de corte histológico do fígado de ratos Wistar corado pelo método de PAS para glicogênio. Inclusões citoplasmáticas de glicogênio estão indicadas pelas cabeças de seta. SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC Barra = 10 μ m.

3.4. Parâmetros bioquímicos

A atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático dos ratos dos grupos expostos ao Cd foram mais altas comparadas ao controle SAL, como mostrado na Figura 4.

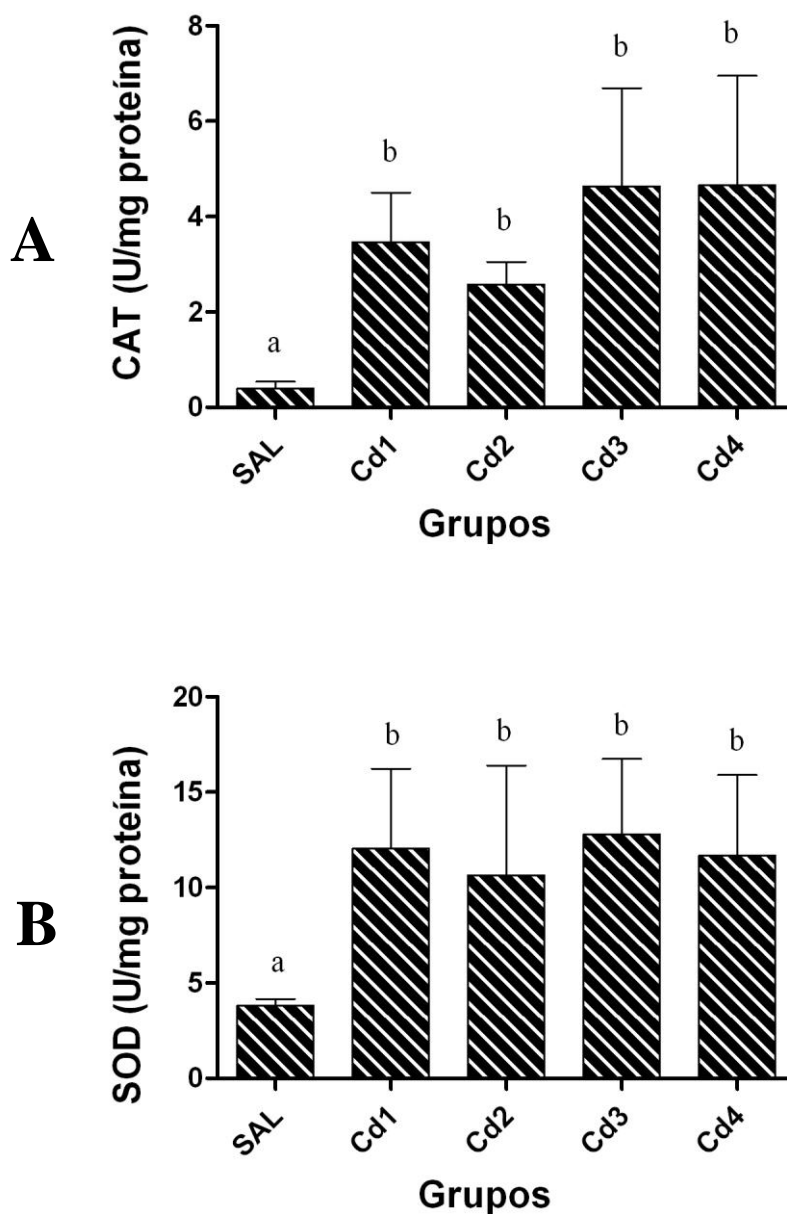


Figura 4. A - Atividade da catalase (CAT); B – Atividade da superóxido dismutase (SOD), ambas no tecido hepático de ratos Wistar, sendo SAL os animais do controle que receberam salina IP. SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74

mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

A quantidade de proteínas totais no tecido hepático dos ratos dos grupos expostos ao Cd foram menores comparadas ao controle SAL, como mostrado na Figura 5.

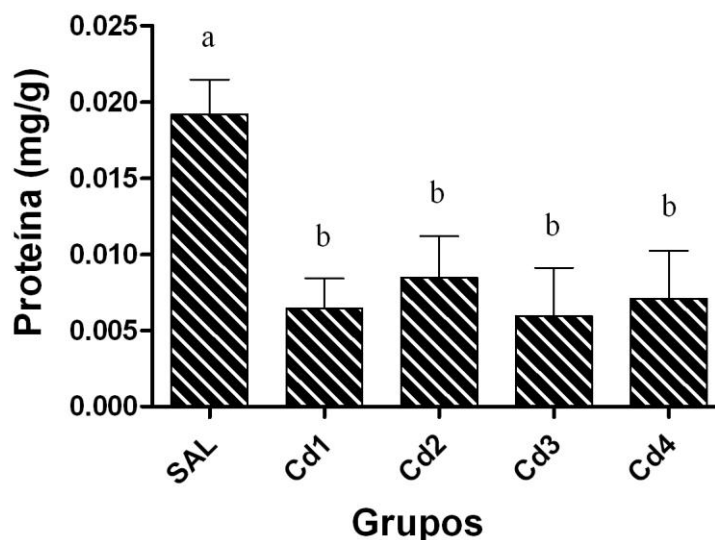


Figura 5. Quantidade de proteínas totais em miligramas por grama de tecido hepático de ratos Wistar, sendo SAL os animais do controle que receberam salina IP. SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou os danos oxidativos e histológicos crônicos em fígado de ratos expostos ao cádmio. As doses de cádmio usadas (0,67; 0,74; 0,86 e 1,1 mg Cd/kg PC) são consideradas baixas para estudos de alterações hepáticas, segundo Manca et al. (1991). Segundo Predes et al. (2010), o uso do Cd em doses baixas é mais apropriado para este tipo de estudo, pois contaminações ambientais usualmente ocorrem em doses menores. A dose letal para 99% dos animais (DL 99) observada em ratos é de 3,9 mg Cd/kg/PC/IV (Dudley et al., 1982).

No presente estudo foi observado aumento na concentração de cádmio no fígado, sendo maior no grupo Cd4 em relação ao grupo controle. Exposições agudas ao cádmio resultam, primariamente, em acúmulo deste metal no fígado (Tzrogianmnis et al., 2003; Koyu et al., 2006; El-Sokkary et al., 2009), com danos nos hepatócitos e nas células

endoteliais (Koyu et al., 2006). O cádmio é acumulado também no pulmão, ossos e rins (Stohs & Bagchi 1995; Ercal et al., 2001). Jamba et al. (1997) submeteram camundongos a altas doses de cádmio (8 mg Cd/kg/dia/oral durante 8 semanas) e observaram expressivo acúmulo de cádmio no fígado. Esse aumento pode ser explicado pela dose ofertada, pela sua redistribuição a partir de outros tecidos e órgãos (Jamall & Smith, 1985), bem como pela formação de complexos Cd e proteínas (Jamba et al., 1997; Combs & Gray 1998). O acúmulo do cádmio no organismo pode ocorrer devido à ligação à albumina do plasma ou outras proteínas de alto peso molecular no fígado ou pode ligar-se a metalotioneína nos rins. Isso explica a toxicidade hepática após exposição parenteral aguda ao cádmio (Jonah e Bhattacharyya, 1989)

Neste estudo foi observado aumento na atividade da CAT e SOD dos animais expostos ao cádmio. Este resultado suporta a hipótese de que a atividade da SOD é estimulada por um aumento na geração do radical superóxido (Allen & Balin, 1989) e que sua atividade antioxidante antagoniza o efeito do metal pesado (El-Tohamy & El-Nattat, 2010). Ognjanović et al. (2007) submeteram animais a altas doses de cádmio (15 mg Cd/ kg /dia, como CdCl₂ por 4 semanas) observando redução na atividade da SOD e CAT no fígado. A exposição a altas doses de Cd aumentou a peroxidação lipídica e diminuição a atividade da SOD em fígado de camundongos, ratos e coelhos (Jamba et al., 1997; Patra et al., 1999; El-Tohamy et al., 2002). Segundo Wolf & Baynes (2006), em estudo *in vivo*, baixas concentrações de cádmio induzem defesas antioxidantes enquanto níveis mais elevados do metal reduzem os mecanismos de defesa antioxidantes como a atividade da SOD (El-Tohamy, 2005; Ognjanović et al., 2007) e da CAT (Jamba et al., 1997; Ognjanović et al., 2007). A quantidade de proteínas totais no tecido hepático dos ratos dos grupos expostos ao Cd foram menores comparadas ao controle SAL. Em condições de estresse oxidativo ocorre diminuição da capacidade hepática de síntese protéica, levando a depressão da quantidade de proteínas totais (Jardim et al., 1979).

Apesar de serem encontrados poucos trabalhos que mostrem análises morfométricas hepáticas, há evidências de uma estreita correlação entre os marcadores de dano oxidativo e alterações morfológicas no parênquima hepático (Sreelatha et al., 2009). Neste estudo, o aumento no percentual de núcleos no grupo tratado com a maior dose em relação aos demais grupos e a redução no percentual de citoplasma foram resultantes do aumento da população de hepatócitos binucleados. Essas células

apresentaram aumento da proporção de núcleo em detrimento da redução do citoplasma, o que aumentou a relação nucleoplasmática.

A diminuição do volume citoplasmático e do volume celular no grupo Cd4 em relação aos grupos SAL e o Cd1 devem-se à redução do percentual citoplasmático dos hepatócitos. O volume nuclear não mostrou diferença entre os grupos. Novaes et al. (2011), analisando fígado de animais tratados com o herbicida paraquat, encontraram aumento do volume nuclear do hepatócito e redução do número de células por unidade de volume de tecido hepático, o que não foi observado neste trabalho.

O percentual de macrófagos (células de Kupffer) foi maior em todos os grupos tratados em relação ao controle. As células de Kupffer estão envolvidas na defesa do organismo retirando os materiais tóxicos da circulação portal (Naito et al., 2004). É conhecida a ligação de alta afinidade de cádmio com metalotioneínas (MT), as quais aumentam sua expressão no fígado em condições de contaminação por cádmio (Trinchella et al., 2006; Simoniello et al., 2009), sendo expressas unicamente pelas células de Kupffer e monócitos (Naito et al., 2004). Células de Kupffer representam um componente secundário do fígado e, apesar de aumentar em número após uma contaminação, podem ser incapazes de produzir MT acima de certo nível, mesmo em presença de altas concentrações de cádmio (Simoniello et al., 2009). É significativo que o aumento no número das células de Kupffer não depende de uma proliferação *in situ*. Hipóteses sugerem que os monócitos são recrutados e diferenciam localmente (Van Furth, 1992) ou, alternativamente, que células de Kupffer inicialmente silenciosas, sejam ativadas (Simoniello et al., 2009).

No presente estudo foram observadas áreas de necrose nos grupos expostos às três maiores doses de Cd. Tzirogiannis et al. (2003) relata que as características histopatológicas da hepatotoxicidade do cádmio podem ser marcadas por necrose, esteatose e edema dos hepatócitos, conforme observado também por Shimizu & Morita (1990). Esses danos podem ser atenuados pela ligação de alta afinidade do cádmio com metalotioneína (Trinchella et al., 2006), resultando em lesão celular moderada e ausência de necrose na exposição a baixas concentrações de cádmio (Simoniello et al., 2009).

O fígado desempenha um papel central no metabolismo de lipídios e carboidratos do corpo inteiro. Perturbações dos mecanismos normais para a síntese, transporte e remoção de ácidos graxos de cadeia longa e triacilgliceróis (TAG) são a base para o desenvolvimento de alterações hepáticas (Anstee & Goldin, 2006). Não foi observada neste estudo diferença no acúmulo de gotículas lipídicas no citoplasma dos hepatócitos

entre os tratamentos, porém foi notada diminuição no armazenamento de glicogênio pelos hepatócitos, nos grupos tratados com cádmio. Essa resposta ocorre não apenas na exposição ao Cd, conforme relatado por Simoniello et al. (2009), mas também a outros agentes poluentes, como o herbicida paraquat (Novaes et al., 2011).

Não houve diferença no peso corporal e no peso do fígado entre os grupos, porém a variação do peso corporal (ganho de peso) foi menor nos grupos Cd3 e Cd4 em relação ao SAL. Em ratos tratados com dose única de Cd (1,2 mg/kg PC/IP) também não se obteve variação no peso do fígado, nos efeitos agudos e crônicos (Predes, 2010). A redução do peso corporal, em algumas ocasiões, pode ser resultado de uma diminuição da circulação de TAG (Poullain et al., 1989). Segundo Yu (2004), animais cronicamente expostos ao cádmio podem exibir emagrecimento.

O aumento do índice hepatossomático (IHS) observado no grupo Cd4 em relação aos outros grupos experimentais pode estar relacionado à ocorrência de maior índice de edema hepático encontrado nesse trabalho e em outros vertebrados intoxicados com cádmio como: ovinos (Stoev et al, 2003), teleósteos (Thophon et al, 2004) e lagartos (Simoniello et al., 2009). Esse edema pode ser explicado pelo aumento da permeabilidade endotelial causado pelo cádmio (Nolan e Shaikh, 1986), possivelmente através da inibição de transporte de Na^+/H^+ (Vilella et al., 2000) e assim, prejudicar o equilíbrio osmorregulatório (Simoniello et al., 2009).

O aumento nos percentuais de capilares sinusóides e vasos sanguíneos observados nos animais tratados com Cd podem ocorrer devido à deposição de matriz extracelular, glicoproteínas e proteoglicanas (Gressner, 1994). Esse aumento foi, também, relatado por Predes (2010) em animais expostos a baixas doses de Cd.

5. CONCLUSÕES

Observou-se neste estudo que os efeitos crônicos do cádmio ocorrem devido à indução do estresse oxidativo, o que foi comprovado pelo aumento das defesas antioxidantes endógenas: atividade da SOD e CAT. O aumento dos danos observados na morfologia hepática e na atividade funcional do parênquima hepático comprovam os efeitos danosos do cádmio, mesmo em pequenas doses.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

6. REFERÊNCIAS

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 105: 121-126.
- Allen, R.G., Balin, A.K. 1989. Oxidative influence on the development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radical Biology & Medicine* 6:631-661.
- Anstee, Q.M., Goldin, R.D. 2006. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International Journal of Experimental Pathology* 87:1-16.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, C. 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346:171-179.
- Cohen, G.; Kim, M.; Ogwu, V. 1996. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for analysis of brain cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods* 67:53-56.
- Combs Jr, G.F., Gray, W.P. 1998. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacology & Therapeutics* 79:179-192.
- Dudley, R.E., Svoboda, D.J., Klaassen. C. 1982. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 65:302-313.
- El-Sokkary, G., Nafady, A., Shabash, E. 2009. Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:456-463.
- El-Tohamy, M.M. 2005 .Combined therapy with antioxidants against cadmium induced testicular dysfunction in rabbits. *International Society for Animal Hygiene Warsaw* 2:409-414.
- El-Tohamy, M.M., El-Nattat, W.S. 2010. Effect of antioxidant on lead-induced oxidative damage and reproductive dysfunction in male rabbits. *Journal of American Science* 11:613-622.

- El-Tohamy, M.M., Hamam, A.M., El-Nattat, W.S. 2002. Cadmium toxicity consequences on testicular and prostate tissues in male rabbits fed on zinc deficient diet. *Journal of Egyptian Veterinary Medical* 62:37-50.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1:529-539.
- Faraci, F.M.; Didon, S.P. 2004. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in vessel wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 24:1367-1373.
- Gressner, A.M. 1994. Activation of proteoglycan synthesis in injured liver- a brief review of molecular and cellular aspects. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 32:225-237.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products* 59:205-215.
- Ilkes, A., Suzen, H.S., Aydin, A., Karagaya, A. 2004. The oxidative DNA base damage in testes of rats after intraperitoneal cadmium injections. *Biometals* 17:371-377.
- Jamall, I.S., Smith, J.C. 1985. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 80:33-42.
- Jamba, L., Nehru, B., Bansal, M.P. 1997. Selenium supplementation during cadmium exposure: changes in antioxidant enzymes and the ultrastructure of the kidney. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 10:233-242.
- Jardim E.C., Neto J.M.F., Fichtner S.S. 1979. Proteínas totais, transaminase glutâmica oxalacética e transaminase glutâmica pirúvica em bovinos intoxicados experimentalmente pelo tetracloreto de carbono. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 9:15-31.
- Ji, Y., Wang, H., Liu, P., Wang, Q., Zhao, X., Meng, X., Yu, T., Zhang, H., Zhang, C., Zhang, Y. 2009. Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice. *Reproductive Toxicology* 29:176-183.
- Jonah, M.M., Bhattacharyya, M.H. 1989. Early changes in the tissue distribution of cadmium after oral but not intravenous cadmium exposure. *Toxicology* 58:325-338.
- Joseph, P. 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238:272-279.

- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138.
- Koyu, A., Gokcimen, A., Ozguner, F., Bayram, D., Kocak, A. 2006. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Molecular and Cellular Biochemistry* 284:81-85.
- Madesh, M., Balasubramanian, K.A. 1998. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 35:184-188.
- Manca, D., Ricard A.C., Trottier B., Chevalier, G. 1991 Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology* 67:303-323.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2003. Stereological tools in biomedical research. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 75:469–86.
- Murphy, V. A. 1996. Cadmium: acute and chronic neurological disorders. In: Yasui, M., Strong, M.J, Ota, K. Verity, M.A. (Eds.). *Mineral and Metal Neurotoxicology*. Boca Raton: CRC Press, 480p.
- Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., Yamamoto, T. 2004. Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical Electron Microscopy* 37:16-28.
- Nolan, C.V., Shaikh, Z.A., 1986. The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. *Life Sciences*. v. 39, p.1403–1409.
- Novaes, R.D., Gonçalves, R.V., Marques, D.C.S., Cupertino, M.C., Pelúzio, M.C.G., Leite, J.P.; Maldonado, I.R.S.C. 2011. Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicologic Pathology* 40:62-70.
- O'brien, P., Salasinski, H.J. 1998. Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Archives of Toxicology* 72:690-700.
- Ognjanovic, B., Markovic, S., Ethordevic, N., Trbojevic, I., Stajn, A., Saicic, Z. 2009. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology* 29:191–197.
- Ognjanović, B. I., Marković, S. D., Pavlović, S. Z., Žikić R. V., Štajn A. Š., Saičić, Z. S. 2007. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiological Research* 57: 403-411.

- Ognjanović, B., Žikić, R.V., Štajn, A., Saičić, Z. S., Kostić, M.M., Petrović, V.M. 1995. The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium. *Physiological Research* 44:293-300.
- Patra, R.C., Swarup, D., Senapati, S.K. 1999. Effects of cadmium on lipid peroxides and superoxide dismutase in hepatic, renal and testicular tissue of rats. *Veterinary & Human Toxicology* 41:65-67.
- Poullain, M.G., Vacher, D., Cezard, J.P., Girard-Globa, A. 1989. Serum lipids and apolipoproteins in the rat refed after starving: influence of the molecular form of nitrogen (protein, peptides, or free amino acids). *Metabolism* 38:740-744.
- Predes, F.S. 2010. Efeito antioxidante da bardana (*Arctium lappa*) no testículo, epidídimo e fígado de ratos danificados pelo cádmio: bioquímica, morfologia, morfometria e ultraestrutura. Tese para obtenção do Título de Doutor na área de Biologia Celular. Unicamp, Campinas, São Paulo, 103p.
- Predes, F.S., Monteiro, J.C., Matta S.L.P., Garcia M. C., Dolder, H. 2010. Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and *Ginkgo biloba*. *Biological Trace Elements Research*, 140: 330-341.
- Sarkar, S., Yadav, P., Bhatnagar, D. 1998. Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes: a study with relation to time. *Biometals* 11:153-7.
- Simoniello, P., Filosa, S., Riggio, M., Scudiero, R., Tammara, S., Trinchella, F., Motta, C. M. 2009. Responses to cadmium intoxication in the liver of the wall lizard *Podarcis sicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 151: 194-203.
- Shimizu, M., Morita, S. 1990. Source effects of fasting on cadmium toxicity, glutathione metabolism, and metallothionein synthesis in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 103, 28-39.
- Sreelatha, S., Padma, P.R., Umadevi, M. 2009. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 47:702-708.
- Štajn, A., Žikić, R.V., Ognjanović, B., Saičić, Z.S., Pavlović, S.Z., Kostić, M.M., Petrović, V.M. 1997. Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117:167- 172.
- Stoev, S.D., Grozeva, N., Simeonov, R., Borisov, I., Hubenov, H., Nikolov, Y., Tsaneva, M., Lazarova, S. 2003. Experimental cadmium poisoning in sheep. *Experimental and Toxicologic Pathology* 55:309-314.

- Stohs, S., Bagchi, D. 1995. Oxidative stress in the toxicity of metal ions. *Free Radical & Biology Medicine* 18:321-336.
- Stohs, S., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 19:201-213.
- Thophon, S., Pokethitiyook, P., Chalermwat, K., Upatham, E.S., Sahaphong, S. 2004. Ultrastructural alterations in the liver and kidney of white sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Toxicology* 19:11-19.
- Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Volpe, M.G., Parisi, E., Scudiero, R. 2006. Cadmium Distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144: 272-278.
- Tzirogiannis, K., Panoutsopoulos, G., Demonakou, M., Hereti, R., Alexandropoulou, K., Basayannis, A., Mykoniatis, M. 2003. Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis. *Archives of Toxicology* 77:694-701.
- Van Furth, R. 1992. Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages. In: van Furth, R. (Ed.), *Mononuclear Phagocytes. Biology of Monocytes and Macrophages*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands p. 3-12.
- Viana, F.A.B. 2007. *Guia Terapêutico Veterinário*. 2ª ed. Editora CEM: Lagoa Santa-MG. 324p.
- Vilella, S., Ingrosso, L., Lionetto, M.G., Schettino, T., Zonno, V., Storelli, C. 2000. Effect of cadmium and zinc on the Na⁺/H⁺ exchanger present on the brush border membrane vesicles isolated from eel kidney tubular cells. *Aquatic Toxicology* 48:25-36.
- Wolf, M.B., Baynes, J.W. 2006. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biometals* 20:73-81.
- Yu, M. 2004. *Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants*. CRC Press, 339p.

ARTIGO II

DANOS OXIDATIVOS E HISTOLÓGICOS CRÔNICOS NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS EXPOSTOS A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO

RESUMO

Este estudo investigou os danos oxidativos e histológicos crônicos na espermatogênese de ratos expostos a baixas concentrações de cádmio. Cinco grupos experimentais foram pesquisados, sendo um controle e os restantes recebendo as doses de 0,67; 0,74; 0,86 e 1,1 mg de Cd/kg PC/IP, respectivamente. Os animais foram eutanasiados 56 dias após a exposição, sendo feitas análises de biometria corporal e órgãos reprodutores, quantificação de cádmio e água tecidual, atividade de marcadores de estresse oxidativo superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além de estereologia e histopatologia testiculares. Na menor dose testada, já ocorreram alterações relevantes como vacuolização do epitélio seminífero, diminuição do índice mitótico e rendimento geral da espermatogênese, bem como diminuição do volume das células de Leydig. Isso pode ter levado à menor produção de testosterona que, juntamente com a quantidade de vasos linfáticos diminuída, dificultou o escoamento deste hormônio e, em consequência, à diminuição do peso das glândulas testosterona dependentes: glândula vesicular e próstata. Houve também aumento da atividade CAT mesmo quando não houve diferença na concentração de cádmio nos testículos. Nas maiores doses ocorreram aumento das patologias e alterações morfométricas, como células aberrantes multinucleadas, necrose total do epitélio seminífero e aumento do tecido conjuntivo intersticial, acompanhados de aumento da atividade das defesas antioxidantes, CAT e SOD, e aumento gradativo da quantidade do metal no órgão. Concluímos que, mesmo uma dose baixa em exposição aguda interfere tanto em túbulo, quanto intertúbulo, bem como glândulas anexas. Por se tratar de efeitos crônicos conclui-se que o tecido testicular não retorna a sua fisiologia e morfologia normais quando cessada a exposição.

Palavras-chave: Toxicologia, metal pesado, lesão testicular, estresse oxidativo, espermatogênese.

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos apontam a redução na contagem de espermatozóides associada à disfunção reprodutiva em homens expostos aos tóxicos ambientais (Benoff et al., 2000; Phillips & Tanphaichitr, 2008; Lucas et al., 2009; Siu et al., 2009; Bonde, 2010; Sakkas & Alvarez, 2010; Cheng et al., 2011; Wong & Cheng, 2011). Em estudo recente foi demonstrada conclusivamente a tendência de redução na qualidade do sêmen e aumento de câncer testicular entre homens finlandeses causado pela exposição a metais pesados (Jørgensen et al., 2011). Há mais de cinco décadas já era relatado que tóxicos ambientais, como o cádmio, um dos mais importantes contaminantes ambientais, causavam lesão testicular (Parizek & Zahor, 1956; Parizek, 1960; Chiquoine, 1964). Exposição aguda de roedores ao cádmio em dose única via intraperitoneal, induzem sérias lesões testiculares, como por exemplo, necrose, esgotamento de células germinativas, danos no tecido intersticial e alteração na barreira hematotesticular (Parizek & Zahor, 1956; Parizek, 1957, 1960; Setchell & Waites, 1970; Hew et al., 1993; Siu et al., 2009; Wong et al., 2010). O mecanismo que causa alterações reprodutivas pela exposição ao cádmio é dado através de um desequilíbrio da barreira hematotesticular (Setchell & Waites, 1970), ocasionado por perda das junções entre as células, resultado da substituição do cálcio pelo Cd^{2+} , nos sítios de ligação onde é necessária a atuação do Ca^{2+} (Prozialeck & Lamar, 1999), e pelo aumento da peroxidação lipídica, diminuição da expressão e atividade das enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e catalase (El-Sokkary et al., 2009; Wong & Cheng, 2011). No entanto, os efeitos do cádmio na função reprodutiva masculina em roedores e humanos, após exposição a baixas doses, carecem serem melhor elucidados (Telisman et al., 2007; Wirth & Mijal, 2010).

Por ser extremamente tóxico e onipresente e ocorrer em quase todos os solos, águas superficiais e plantas, além de ser facilmente mobilizado pelas atividades humanas, tais como mineração e incorporado ao solo através de aplicações de fertilizantes na agricultura, o cádmio tem sido apontado como uma ameaça potencial para a saúde de espécies selvagens. Há evidências que a toxicidade do cádmio pode ser mais comum entre as populações naturais de vertebrados do que tem sido demonstrado até o momento e que a toxicidade do cádmio pode muitas vezes passar oculta ou até não ser reconhecida, além de que a ingestão de pequenas doses pode influenciar não

somente a fisiologia e a saúde de organismos individuais, mas também a demografia e a distribuição das espécies (Larison et al., 2010).

Estes dados são significativos porque suportam a noção de que a tendência atual de declínio da qualidade do sêmen, observado através da contagem e da análise de motilidade dos espermatozoides de homens em países industrializados, é causada, pelo menos em parte, pela exposição de baixo nível a tóxicos ambientais, como o cádmio (Cheng & Mruk, 2011).

Necessitando os modelos de baixas doses de cádmio, que são as que usualmente ocorrem em contaminações ambientais, induzindo alterações reprodutivas serem mais bem estudados para definir os graus de lesão. Dessa maneira, os objetivos deste estudo foram qualificar e quantificar os efeitos crônicos de baixas doses de Cd, através de análises de quantificação do metal, avaliação do estresse oxidativo e de análises morfométricas e histopatológicas no testículo de ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Trinta ratos Wistar machos, com setenta dias de idade e pesando (média± desvio padrão) 236±23g, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (Brasil) e mantidos sob condições de temperatura controlada (21±2°C) com umidade relativa do ar de 60 a 70% e 12 horas de luz diárias. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo CEUA/ UFV (Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil), cujo protocolo de aprovação é 030/2010.

2.2. Tratamentos

O cloreto de cádmio (CdCl₂, Fluka/Sigma, St Louis, MO, USA) foi dissolvido em água destilada e a aplicação foi feita em dose única via intraperitonal (IP). Os trinta ratos foram separados ao acaso em cinco grupos de seis animais: 1) SAL (controle) - os animais receberam uma dose única de solução salina (NaCl 0,9%); 2) Cd1 - CdCl₂ na concentração de 1,1 mg/kg de peso corporal (PC), correspondente a 0,67 mg de cádmio (Cd/kg); 3) Cd2 - CdCl₂ na concentração de 1,2 mg/kg PC (0,74 mg de Cd/kg PC); 4)

Cd3 - CdCl₂ na concentração de 1,4 mg/kg PC (0,86 mg de Cd/kg PC); 5) Cd4 - CdCl₂ na concentração de 1,8 mg/kg PC (1,1 mg de Cd/kg PC).

2.3. Eutanásia e análises biométricas

Cinquenta e seis dias após a aplicação os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg/IM) e xilazina (3 mg/kg/IM) (Viana, 2007). Os testículos, epidídimos e glândulas acessórias foram removidos, dissecados e pesados em balança analítica. Os testículos de cada animal foram rapidamente removidos, um dos quais foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer -80°C e o outro imerso em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965). A albugínea testicular foi cuidadosamente removida e pesada.

Os animais também foram pesados para cálculo do índice gonadossomático (IGS) que foi obtido pela relação entre o peso das gônadas (PG) e o peso corporal (PC), sendo $IGS = PG/PC \times 100$. O tecido testicular restante foi utilizado para medir o teor de água por unidade de peso do tecido (mL/g). Essa análise foi feita pela relação da massa fresca e a massa seca do órgão (peso úmido - peso seco), sendo a massa seca obtida após secagem do órgão em estufa 70°C até atingir peso seco constante.

2.4. Análises enzimáticas

Amostras de 100 mg de testículo congelados foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (PBS), centrifugadas a 3.500 xg a frio (5°C) sendo o sobrenadante utilizado para análise das atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). A atividade da SOD foi avaliada segundo metodologia de Madesh e Balasubramanian (1998) e da CAT avaliada pelo método de Aebi (1984), pela mensuração da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976)

2.5. Morfometria

Os fragmentos de testículo, fixados por 24 horas, foram transferidos para álcool 70%, desidratados em série etanólica crescente e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha) usando navalhas de vidro. Algumas secções foram coradas por azul de toluidina/borato de sódio 1% para análises morfométricas e histopatológicas e outras foram coradas pelo método de Picro Sírius (PS) para

identificação de fibras colágenas. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Para evitar a repetição das análises da mesma região, as secções foram obtidas de modo semisseriado respeitando-se intervalos de 40 µm. Os cortes corados com azul de toluidina foram analisados em microscópio de luz (Olympus BX-60®, Tóquio, Japão) e as imagens capturadas usando um fotomicroscópio (Olympus AX 70 TRF). Os cortes corados pelo PS foram fotografados em fotomicroscópio de luz polarizada (Olympus AX 70 TRF). A histomorfometria foi realizada utilizando o software para análises de imagem Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Uma vez que o testículo pode ser dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, as proporções volumétricas entre estes elementos foram estimadas a partir da contagem de 2.660 pontos projetados sobre imagens obtidas em lâminas histológicas, em aumento de 100x. Com o uso de um retículo com 266 intersecções (pontos), realizou-se a contagem de 10 campos aleatoriamente distribuídos, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Foram registrados pontos coincidentes com a túnica própria, o epitélio seminífero e lúmen, e também os pontos sobre o espaço intertubular.

O volume dos túbulos seminíferos e do intertúbulo foram estimados a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso testicular total o peso da albugínea testicular. Como a densidade do testículo é próxima de 1 (Johnson et al.,1981; Tae et al.,2005; Costa et al., 2011) o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. Baseado nos volumes de túbulos seminíferos e nos pesos corporais foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula $ITS = VT/PC \times 100$, onde VT = volume de túbulo seminífero e PC = peso corporal.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos, que apresentaram contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo.

Avaliou-se o intertúbulo registrando-se 1.000 pontos sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig (NL e CL), vasos sanguíneos (VS), vasos linfáticos (VL) e tecido conjuntivo (TC). Estas contagens foram feitas utilizando-se o programa para análise de imagens Image Pro Plus®, associado a microscópio Olympus BX-40. O percentual de cada elemento no intertúbulo foi obtido multiplicando por 100 o número de pontos contados sobre o elemento e dividindo o valor obtido por 1.000.

Para morfometria das células de Leydig foram medidos o diâmetro nuclear médio das células em imagens capturadas com objetiva de 40x. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos para cada animal escolhendo-se os núcleos que apresentaram contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear, citoplasmático e conseqüentemente, o volume da célula de Leydig por animal. O volume nuclear foi obtido a partir da fórmula: $VN = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio nuclear. Para cálculo do volume citoplasmático utilizou-se a fórmula: $VC = \% \text{ citoplasma} \times VN/\% \text{ núcleo}$. Finalmente o volume celular foi obtido somando-se o VN e o VC. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3). O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo foi feito a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular x peso do parênquima de um testículo/100. A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula: $ILS = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular} / \text{PC} \times 100$, onde PC=peso corporal.

Utilizando-se dez secções transversais de túbulos seminíferos de cada animal, no estágio um (1) do ciclo do epitélio seminífero (Berndtson, 1977) e de acordo com o método da morfologia tubular, foram quantificadas as seguintes células: espermatogônia A (SGA), espermatócito primário em preleptóteno/ leptóteno (PLP), espermatócito primário em paquíteno (PAQ), espermátides arredondadas (EAR) e células de Sertoli (CSE). A contagem total de células germinativas (TCG) foi obtida pela soma de todas as células espermatogênicas. Para corrigir as variações nos tamanhos destes tipos celulares, considerando-se a espessura do corte e o diâmetro nuclear ou nucleolar no caso de célula de Sertoli, foi utilizada a seguinte fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962), sendo que NC=número corrigido e DM=diâmetro médio.

$$NC = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left[\frac{DM}{2}\right]^2 - \left[\frac{DM}{4}\right]^2}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média das medidas dos diâmetros dos 30 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos utilizando-se o programa de análise de imagens Image Pro Plus associado a microscópio Olympus BX-40, em aumento de 400 X. No caso das

espermatogônias do tipo A, que apresenta núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor. Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Em virtude disso, contabilizou exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente (Amann e Almquist, 1962).

Com a finalidade de se avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli nos animais tratados e controle, foram estimadas as razões entre os números corrigidos de células da linhagem espermatogênica, e entre estes números e o número corrigido de células de Sertoli no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. As seguintes razões foram calculadas: coeficiente de mitoses espermatogoniais (PLP/SPGA), rendimento meiótico (EAR/PAQ), rendimento geral da espermatogênese (EAR/SPGA), eficiência da célula de Sertoli (EAR/CSE) e capacidade de suporte da célula de Sertoli (TCG/CSE).

Foi calculado o número de espermátides arredondadas por testículo considerando-se o número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos, permitindo avaliar a produção espermática diária (PED). Para isto, calculou-se previamente o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo através da fórmula $CT = VTS/\pi R^2/2$, onde VTS = volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

Esta estimativa foi realizada a partir do número corrigido de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 e o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-De-Reviere & Lincoln (1978):

$$\text{N}^\circ \text{ de célula de Sertoli por testículo} = \frac{\text{Comprimento total de túbulos seminíferos por testículo } (\mu\text{m}) \times \text{N}^\circ \text{ corrigido de nucléolo de célula de Sertoli por secção transversal}}{\text{Espessura do corte}}$$

A partir deste cálculo e do peso bruto de um testículo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo utilizando a fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de célula de Sertoli/g de testículo} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de célula de Sertoli/testículo}}{\text{Peso bruto de 1 testículo}}$$

O cálculo da produção espermática diária (PED) total foi feito a partir da histologia quantitativa dos testículos, segundo Amann & Almquist (1961) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{PED} = \frac{\text{Volume total do túbulo seminífero } (\mu\text{m}^3) \times \text{N}^{\circ} \text{ corrigido de espermátides arredondadas}}{\text{Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 } (\mu\text{m}^2) \times \text{Espessura do corte histológico}}$$

Calculou-se previamente o volume total dos túbulos seminíferos através da fórmula $VT = \% \text{ de túbulos} \times \text{volume líquido do testículo}$ e a área da secção transversal do túbulo no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero através da fórmula $A = \pi R^2$ ($R = \text{diâmetro tubular}/2$).

A duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos Wistar é de 12,8 dias (Van Haaster & De Rooij, 1993), sendo uma constante biológica espécie-específica.

Para se obter a produção espermática diária por grama de testículo, a produção espermática diária total foi dividida pelo peso bruto dos testículos. Assim, os resultados são expressos em produção diária de espermátides total e por grama de testículo.

2.6. Determinação da concentração de cádmio tecidual

Amostras de testículo foram pesadas em balança digital analítica (BEL Mark 210A) e posteriormente incubadas em estufa a 70°C até adquirirem peso seco constante. As amostras secas foram colocadas em Erlenmeyers de 25 ml juntamente com 1,5 ml de HNO₃ concentrado e 0,5 ml de HClO₄ (70%) e transferidas para uma chapa aquecedora onde a temperatura foi aumentada gradativamente, a partir de 70 °C até 90°C, de modo que a digestão do material fosse completa. O tempo médio gasto para a digestão foi de 30 minutos. Após a digestão as amostras foram diluídas em 25 ml de água deionizada e filtradas em papel filtro. A determinação da concentração de cádmio nessas amostras foi feita em espectrofotômetro de absorção atômica em chama (SpectrAA 220FS Varian).

2.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão (média±dp). Comparações entre os grupos foram feitas usando o programa Statistica (ANOVA/

MANOVA), através do teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Significância estatística foi estabelecida para $p > 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros biométricos e concentração do metal no testículo

Os parâmetros biométricos dos testículos, epidídimos e glândulas anexas e a concentração de cádmio nos testículos estão dispostos na Tabela 1. Não houve diferença significativa no peso do epidídimo entre os grupos. Os pesos da próstata e albugínea testicular foram menores nos grupos tratados em relação ao controle. O peso da glândula vesicular foi menor em todos os grupos tratados em relação ao controle, sendo que os animais do grupo Cd4 apresentaram peso ainda menor em relação aos animais do grupo Cd1 e Cd2. O índice gonadossomático (IGS) foi menor nos animais dos grupos Cd3 e Cd4 em relação ao controle e os do grupo Cd1, e também do grupo Cd4 menor IGS em relação ao grupo Cd2. A quantidade de água tecidual foi menor nos grupos Cd2, Cd3 e Cd4 em relação ao controle e ao Cd1, e no grupo Cd3 menor que o Cd2 e, juntamente com o Cd2, maior que o Cd4. Já a concentração de metal no testículo, tanto por grama de matéria seca quanto de matéria fresca, foi maior nos grupos Cd2, Cd3 e Cd4 em relação ao controle e ao Cd1, e no grupo Cd3 foi maior que o Cd2 e, juntamente com o Cd2, menor que o Cd4.

Tabela 1. Parâmetros biométricos dos testículos, epidídimos e glândulas anexas e concentração de cádmio nos testículos de ratos Wistar expostos a diferentes doses de cádmio

	SAL	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4
Testículo(g)	1,78±0,07 ^a	1,76±0,17 ^a	1,48±0,49 ^a	1,18±0,63 ^a	1,19±0,75 ^a
Epidídimo(g)	0,61±0,04 ^a	0,66±0,05 ^a	0,63±0,03 ^a	0,51±0,14 ^a	0,48±0,20 ^a
GV(g)	1,42±0,27 ^a	1,09±0,21 ^b	1,07±0,03 ^b	0,97±0,12 ^{bc}	0,73±0,27 ^c
Próstata(g)	1,24±0,25 ^a	0,90±0,09 ^b	0,82±0,22 ^b	0,71±0,25 ^b	0,54±0,32 ^b
AT(g)	0,10±0,03 ^a	0,06±0,01 ^b	0,06±0,01 ^b	0,07±0,02 ^b	0,07±0,01 ^b
IGS	0,85±0,11 ^a	0,89±0,09 ^a	0,78±0,18 ^{ab}	0,52±0,27 ^b	0,54±0,17 ^b
H₂O/g	0,85±0,01 ^a	0,85±0,0 ^a	0,78±0,04 ^b	0,74±0,00 ^c	0,69±0,04 ^d
Cd MS	88,21±12,65 ^a	92,11±3,64 ^a	113,17±6,61 ^b	127,31±4,33 ^c	143,74±7,5 ^d
Cd MF	13,29±1,75 ^a	13,10±1,7 ^a	23,87±2,06 ^b	36,34±3,9 ^c	49,08±2,66 ^d

SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. GV = Glândula Vesicular; AT = Albugínea Testicular; IGS = Índice Gonadossomático; H₂O/g = ml de água/g de testículo; MS = Matéria seca; MF = Matéria fresca; Cd MS (µg de Cd /g de matéria seca); Cd MF (µg de Cd/g de matéria fresca). Dados expressos como média±dp. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos (p > 0,05).

Redução no tamanho testicular (Figura 1A), prostático (Figura 1B inferior) e da vesícula seminal (Figura 1B superior) foram observados em animais expostos ao cádmio.

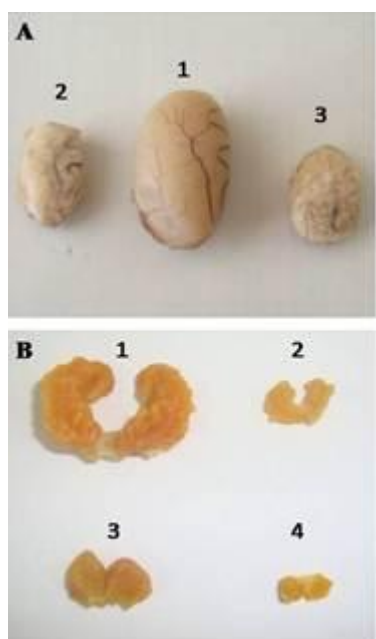


FIGURA 1. A: A1 - Testículo de animal do grupo SAL; A2 - Testículo de animal do grupo Cd3, exposto a dose de 0,86mg de Cd/kgPC; A3 - Testículo de animal do grupo Cd4, exposto a dose de 1,1mg de Cd/kgPC. B: B1 - Glândula vesicular de animal do grupo SAL; B2 - Glândula vesicular de animal exposto ao cádmio; B3 - Próstata de animal do grupo SAL; B4 - Próstata de animal exposto ao cádmio.

3.2. Parâmetros histomorfométricos, estereológicos e histopatológicos testiculares

Os dados de histomorfometria testicular são mostrados na Tabela 2. Não houve diferença no volume de túbulos seminíferos. O volume de intertúbulo diminuiu no grupo Cd4 em relação ao controle e ao Cd1. Houve diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos nos grupos Cd3 e Cd4 em relação ao controle e ao Cd1. O índice tubulossomático diminuiu nos grupos Cd2, Cd3 e Cd4 em relação ao controle e ao Cd4 em relação ao Cd1, Cd2 e Cd3, além do Cd3 em relação ao Cd2. O percentual de túbulos seminíferos e intertúbulo não sofreram variação. Não houve diferença no percentual de epitélio. O percentual de túnica própria dos túbulos seminíferos aumentou nos grupos Cd3 e Cd4 e no grupo Cd4 em relação ao Cd3. O percentual de lume dos túbulos seminíferos diminuiu nos grupos Cd3 e Cd4 e no grupo Cd4 em relação ao Cd3. O percentual de células de Leydig reduziu nos grupos Cd3 e Cd4 em relação ao controle e ao Cd1. O percentual de vasos sanguíneos reduziu nos grupos Cd2, Cd3 e Cd4 em relação ao controle e ao Cd1 e dos grupos Cd3 e Cd4 em relação ao Cd2. Os vasos linfáticos tiveram seu percentual reduzido em todos os grupos tratados e ainda nos grupos Cd2, Cd3 e Cd4 em relação ao Cd1 e do Cd4 em relação ao Cd2 e Cd3. O percentual de conjuntivo aumentou nos grupos Cd2, Cd3 e Cd4 em relação ao controle e ao Cd1 (Figura 2).

Tabela 2. Parâmetros tubulares e intertubulares do testículo de ratos Wistar expostos a diferentes doses de cádmio

	SAL	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4
DT	304,4±9,6 ^a	298,33±12,99 ^a	262,75±33,15 ^{ab}	245,33±44,09 ^b	214,15±20,25 ^b
VT	3,06±0,13 ^a	3,17±0,36 ^a	2,55±1,05 ^a	2,20±1,24 ^a	1,73±1,3 ^a
VI	0,32±0,07 ^a	0,28±0,07 ^a	0,26±0,06 ^{ab}	0,22±0,10 ^{ab}	0,13±0,08 ^b
ITS	0,84±0,05 ^a	0,78±0,03 ^{ab}	0,65±0,7 ^b	0,50±0,10 ^c	0,34±0,07 ^d
TS	90,58±2,24 ^a	91,79±1,86 ^a	89,23±5,47 ^a	90,03±6,03 ^a	91,43±3,38 ^a
IT	9,42±2,24 ^a	8,21±1,86 ^a	10,77±5,47 ^a	9,97±6,03 ^a	8,57±3,38 ^a
TP	2,98±0,25 ^a	3,55±0,37 ^a	3,7±0,84 ^a	8,08±2,8 ^c	7,52±2,14 ^b
ES	54,80±1,86 ^a	52,87±2,27 ^a	52,89±2,69 ^a	51,50±34,36 ^a	72,46±0,66 ^a
LT	32,8±0,94 ^a	35,37±3,3 ^a	28,71±15,13 ^a	18,42±0,98 ^b	15,79±0,27 ^c
CL	34,49±4,00 ^a	31,67±4,54 ^a	27,24±5,35 ^{ab}	23,07±3,35 ^b	21,24±1,91 ^b
VS	11,76±1,33 ^a	10,60±2,48 ^a	5,38±0,65 ^b	2,24±0,56 ^c	3,17±1,07 ^c
VL	54,11±8,20 ^a	46,09±4,59 ^b	26,78±1,48 ^d	26,78±3,68 ^d	36,19±0,84 ^c
TC	3,06±0,70 ^a	6,82±6,66 ^a	28,02±6,06 ^b	37,26±4,34 ^b	32,82±17,22 ^b

SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. DT = Diâmetro dos túbulos seminíferos (μm); VT = Volume dos túbulos (μm^3); VI = Volume do intertúbulo (μm^3); ITS = Índice tubulossomático; TS = Túbulo seminífero (%); IT = Intertúbulo (%); TP = Túnica própria (%); ES = Epitélio seminífero (%); LT = Lume Tubular (%); CL = Célula de Leydig (%); NL = Núcleo de Leydig (%); CL = Citoplasma de Leydig (%); VS = Vaso sanguíneo (%); VL = Vaso linfático (%); TC = Tecido Conjuntivo (%). Os dados são expressos como média±dp. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Testículos de ratos Wistar evidenciando o aumento de tecido conjuntivo nos grupos expostos às três maiores doses de Cd em relação ao controle e a menor dose podem ser observados na Figura 2. Observa-se no grupo SAL a pequena quantidade de colágeno no intertúbulo (Figura 2A), enquanto nos grupos tratados (Figuras 2 B e C) podem ser observadas grandes áreas contendo colágeno evidenciando aumento no tecido fibroso intertubular. Na Figura 2D observa-se intertúbulo de animal tratado, que mostrou aumento no tecido conjuntivo, corado com azul de toluidina. Aumento de conjuntivo no intertúbulo testicular foi observado nos animais dos grupos Cd2, Cd3 e Cd4.

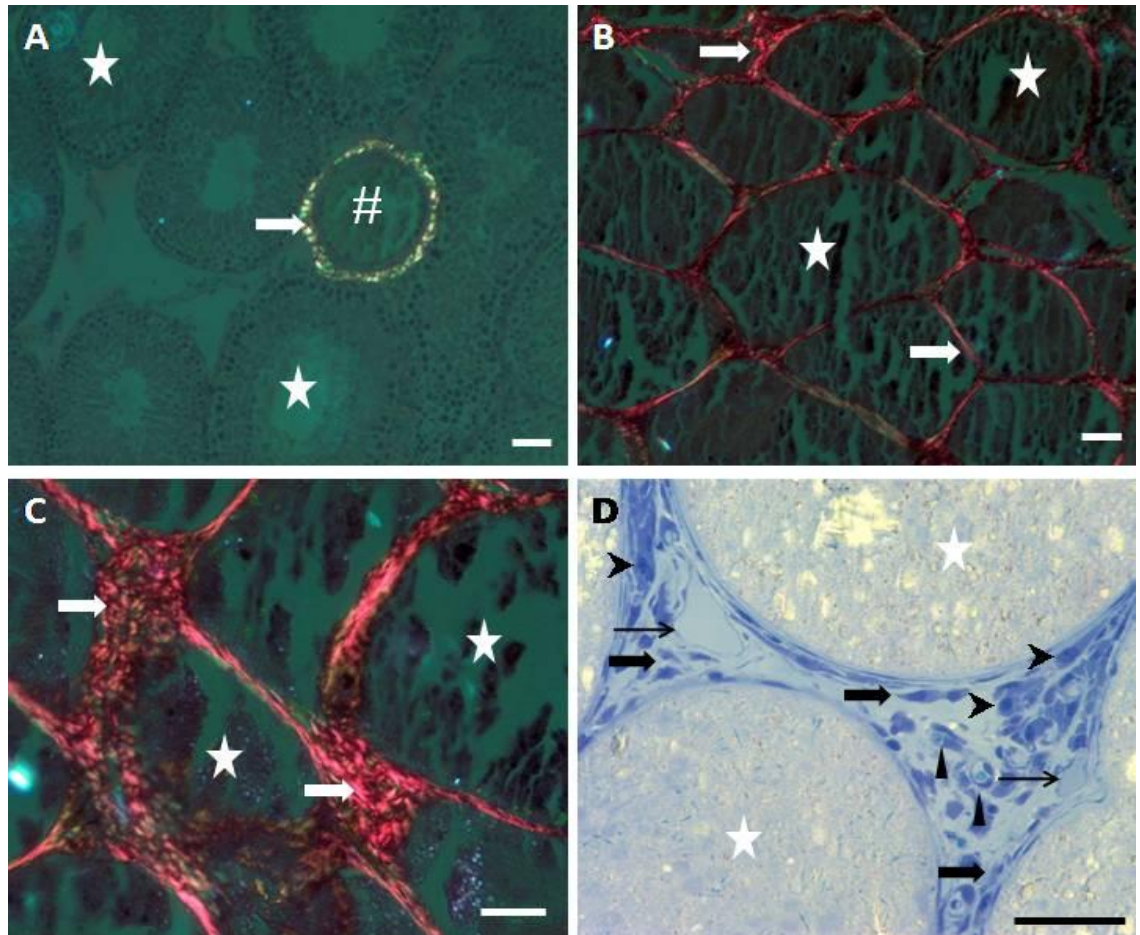


Figura 2. A; B; C: Fotomicrografias de testículos de ratos Wistar controle (A) e expostos a 0,86mg Cd/kgPC (B, C), corados pelo método de Picro Sírius e visualizados em microscópio de polarização. (→) Tecido conjuntivo; (★) Túbulo Seminífero; (#) Vaso Sanguíneo. D: Fotomicrografia representativa de testículo de rato Wistar expostos ao 1,1mg Cd/kgPC corada por azul de toluidina (★) Túbulo Seminífero; (▶) Célula de Leydig; (→) Vaso linfático; (▲) Vaso sanguíneo. Barra = 50µm.

Não ocorreu variação na produção espermática diária e por grama de testículo e no número de células de Sertoli totais e por grama de testículo. Os comprimentos dos túbulos seminíferos totais e por grama de testículo também não apresentaram variação. Na Tabela 3 é mostrado que o índice mitótico e o rendimento geral da espermatogênese reduziram em todos os grupos tratados em relação ao controle. Não houve diferença no índice meiótico, índice de Sertoli; capacidade total de suporte de células de Sertoli e, número total de células germinativas.

Tabela 3. Razões celulares e índices espermatogênicos de ratos Wistar expostos a diferentes doses de cádmio

	SAL	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4
IMit	23,81±4,76 ^a	15,45±1,63 ^b	14,53±3,78 ^b	10,35±0,74 ^b	12,46±1,00 ^b
IMei	2,20±0,34 ^a	2,01±0,16 ^a	1,61±0,91 ^a	1,20±1,11 ^a	0,77±1,00 ^a
IS	7,26±0,75 ^a	6,20±0,66 ^a	5,36±0,80 ^a	5,68±0,26 ^a	7,48±0,01 ^a
CSS	13,74±1,60 ^a	12,26±1,28 ^a	10,51±1,70 ^a	11,34±0,21 ^a	15,27±0,22 ^a
TCG	119,02±8,57 ^a	123,84±7,78 ^a	117,11±19,56 ^a	129,61±23,75 ^a	121,72±19,6 ^a
RG	56,16±8,47 ^a	35,19±4,74 ^b	33,82±2,14 ^b	23,57±1,07 ^b	25,95±4,02 ^b

SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. IMit = Índice mitótico; IMei = Índice meiótico; IS = Índice de Sertoli; TCG = Total de células germinativas; CSS = Capacidade total de suporte de células de Sertoli; RG = Rendimento Geral da espermatogênese. Dados expressos como média±dp. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Os dados da estereologia das células de Leydig são mostrados na Tabela 4. Não houve diferença no percentual de núcleos de células de Leydig. O citoplasma de Leydig teve redução no seu percentual nos grupos tratados com as três maiores doses. O volume de núcleos de células de Leydig diminuiu nos grupos expostos ao cádmio em relação ao controle e nos grupos tratados com as três maiores doses em relação aos tratados com a menor dose. Os volumes citoplasmáticos e o volume das células de Leydig reduziram em todos os grupos tratados em relação ao controle. O volume de células de Leydig por testículo também sofreu redução nos grupos tratados com as duas maiores doses em relação ao controle e ao tratado com a menor dose e do grupo Cd8 em relação ao Cd2. O índice Leydigossomático (ILS) foi menor em relação ao controle e aos grupos tratados com as duas menores doses.

Tabela 4. Parâmetros estereológicos de células de Leydig de ratos Wistar expostos a diferentes doses de cádmio

	SAL	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4
NL	9,50±4,23 ^a	14,27±15,05 ^a	10,03±3,89 ^a	8,48±3,34 ^a	10,30±7,23 ^a
CL	28,39±11,49 ^a	23,61±2,0 ^a	17,22±3,30 ^b	14,59±2,25 ^b	14,09±1,37 ^b
VN	175,56±23,48 ^a	116,82±11,68 ^b	77,61±22,01 ^c	66,28±24,02 ^c	75,87±15,30 ^c
VC	634,68±55,39 ^a	366,38±45,34 ^b	181,35±52,64 ^b	93,17±65,07 ^b	165,33±10,66 ^b
VL	729,38±108,69 ^a	356,65±97,98 ^b	222,69±145,32 ^b	144,68±81,42 ^b	241,20±5,57 ^b
VLT	0,58±0,09 ^a	0,53±0,05 ^a	0,45±0,12 ^{ab}	0,26±0,17 ^{bc}	0,24±0,15 ^c
ILS	0,15±0,02 ^a	0,14±0,01 ^a	0,13±0,02 ^a	0,07±0,05 ^b	0,04±0,03 ^b

SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. NL = Núcleo de Leydig (%); CL = Citoplasma de Leydig (%); VN = Volume dos núcleos da célula de Leydig (μm^3); VC = Volume do citoplasma das células de Leydig (μm^3); VL = Volume das células de Leydig; VLT = Volume de células de Leydig por testículo (μm^3); ILS = Índice Leydigossomático. Dados expressos como média±dp. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Na Figura 3 observa-se fotomicrografias representativas de testículos de ratos Wistar coradas por azul de toluidina/borato de sódio 1%, evidenciando vacuolização do epitélio seminífero na menor dose (Figura 3B), áreas de necrose no epitélio seminífero e aumento das áreas de tecido conjuntivo no intertúbulo (Figura 3C). Na Figura 3D observa-se diminuição do epitélio seminífero e extensas áreas de conjuntivo no intertúbulo. Na Figura 3E tem-se necrose total do epitélio seminífero e extensas áreas de conjuntivo no intertúbulo e na Figura 3F é evidenciado grande número de mastócitos na região de intertúbulo dos animais expostos ao cádmio. Células aberrantes multinucleadas podem ser observadas no epitélio seminífero na Figura 3C. Necrose total do epitélio seminífero ocorreu em um animal do grupo Cd2, em dois animais do grupo Cd3 e em três animais do grupo Cd4.

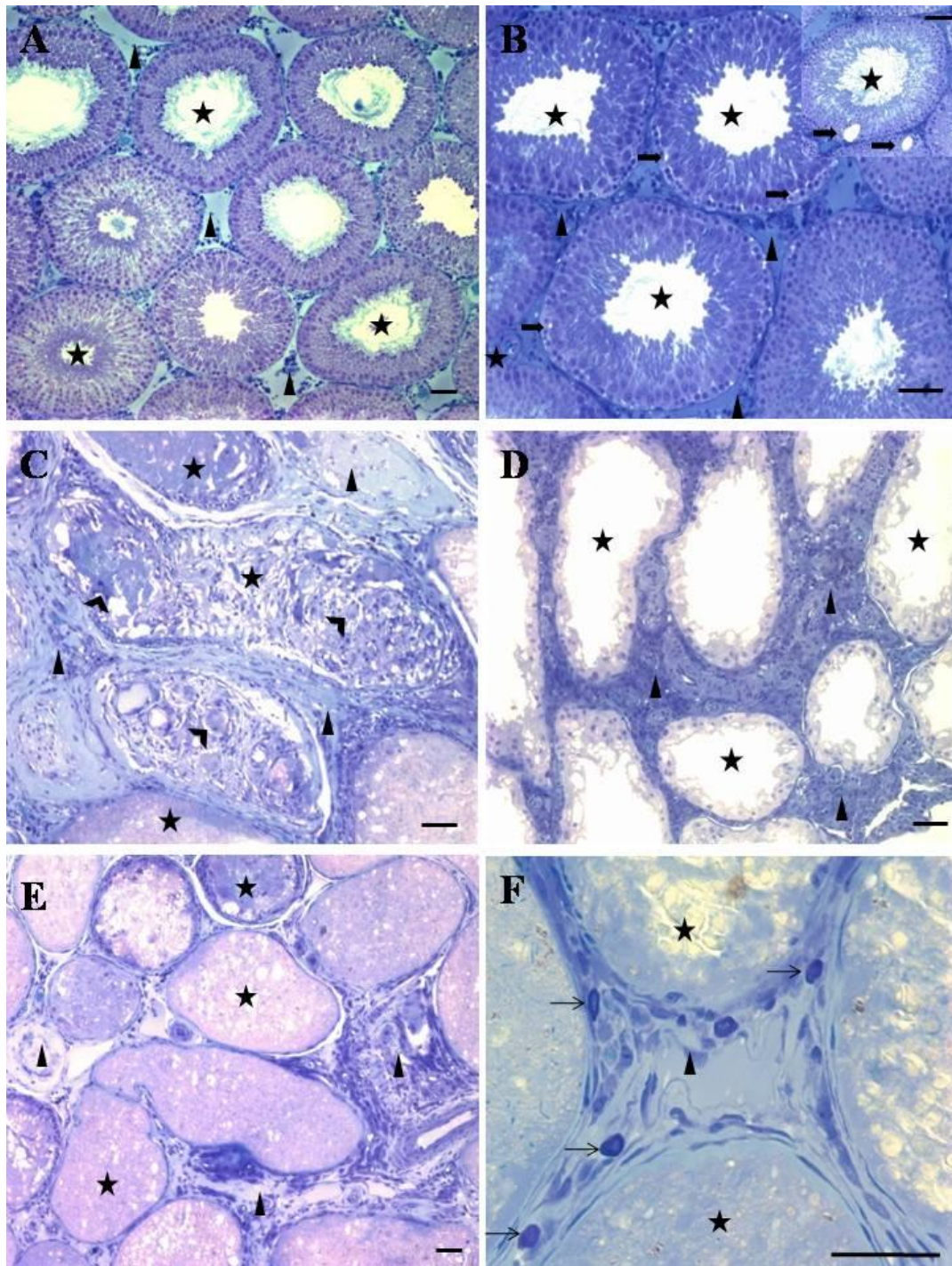


Figura 3. Fotomicrografias de testículos de ratos Wistar: A - SAL controle; B - Cd1 expostos na dose 0,67mg Cd/kgPC; C - Cd2 expostos na dose 0,74mg Cd/kgPC; D - Cd3 expostos na dose 0,86 mg Cd/kgPC; E - Cd4 expostos na dose 1,1mg Cd/kgPC; F - Intertúbulo de animal do grupo Cd4 onde se observa grande quantidade de mastócitos. (★) Túbulo seminífero; (▲) Intertúbulo; (►) Células aberrantes multinucleadas; (→) Mastócitos; Detalhe da Figura 3B - (◄) Vacúolos no epitélio seminífero; Coloração: azul de toluidina/borato de sódio 1%. Barra = 50µm.

3.3. Parâmetros bioquímicos

A atividade da catalase (CAT) no tecido testicular foi maior nos ratos dos grupos expostos ao Cd, com os valores maiores sendo obtidos nas duas doses mais altas, como mostrado na Figura 4.

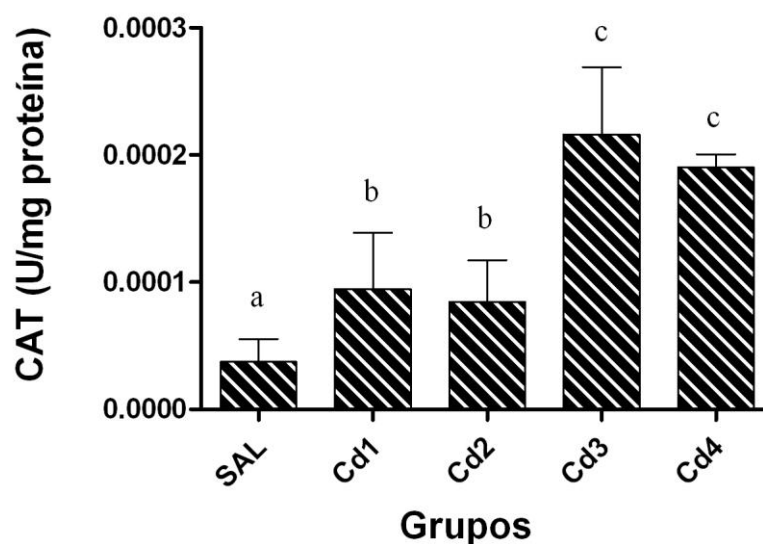


Figura 4. Atividade da catalase (CAT) no tecido testicular de ratos Wistar, sendo SAL os animais do controle que receberam salina IP. SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido testicular dos ratos sofreu alteração apenas a partir do tratamento Cd2, com acréscimos significativos com o aumento da dose de Cd, como mostrado na Figura 5.

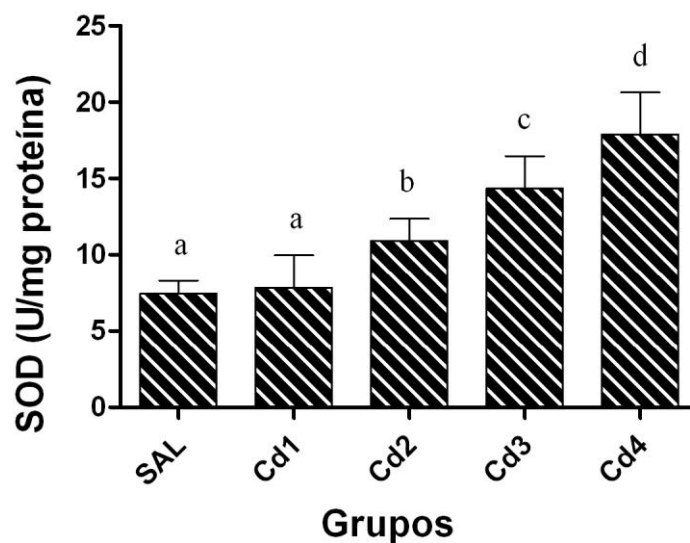


Figura 5. Atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido testicular de ratos Wistar, sendo SAL os animais do controle que receberam salina IP. SAL = controle; Cd1 = 0,67 mgCd/kgPC; Cd2 = 0,74 mgCd/kgPC; Cd3 = 0,86 mgCd/kgPC; Cd4 = 1,1mgCd/kgPC. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Estudos sobre as conseqüências da contaminação por Cd têm demonstrado que o testículo é mais sensível ao Cd do que outros órgãos importantes (Blanco et al., 2007), com indução de efeitos prejudiciais nos sistemas reprodutivos em animais e humanos (Parizek & Zahor, 1956; Parizek, 1960; Chiquoine, 1964; Yu, 2004).

Embora o Cd possa causar atrofia epidimária (Herak-Kramberger et al., 2000), no presente estudo não foi observada diferença significativa no peso do epidídimo entre os grupos expostos ao Cd e controle neste trabalho. De fato a exposição a baixas doses (1 mg CdCl₂/kg PC) podem não ocasionar variação nos pesos epididimários, porém em dose mais elevada (1,2 mg CdCl₂/kg PC) pode ocorrer redução significativa (Predes et al., 2009).

O peso testicular não sofreu alteração em nenhum dos grupos tratados com Cd, conforme foi também relatado por Leite et al., (2010) e Predes et al., (2009), ambos trabalhando com ratos Wistar. Entretanto, é possível que o Cd possa causar redução no peso testicular em camundongos e ratos tratados com CdCl₂ (Manna et al., 2008; Fouad et al., 2009).

Neste estudo o índice gonadossomático (IGS) foi menor nos animais dos grupos Cd3 e Cd4 em relação ao controle e ao grupo Cd1. Predes et al. (2009) observaram que na dose de 1,0 mg CdCl₂/kg, o IGS não sofreu alteração mas na dose de 1,2 mg CdCl₂/kg ocorreu redução após 7 e 56 dias de exposição. A diminuição do peso testicular em relação à dosagem aguda de Cd é atribuída à necrose e lesões degenerativas induzidas pelo cádmio (Blanco et al., 2007).

A redução no peso da albugínea testicular ocorrida nos animais tratados com Cd pode ocorrer também, em exposição a outros elementos, como Níquel (Oliveira, 2010). Diferentemente, a exposição ao Alumínio não causou este tipo de alteração em camundongos (Carvalho, 2009; Mata, 2009), revelando as distintas formas de resposta aos diferentes agentes tóxicos.

A redução do peso da próstata e da glândula vesicular, observados neste trabalho para os animais que receberam Cd, pode ser resultado da diminuição das células de Leydig, levando à possível redução da testosterona, já que essas glândulas são dependentes desse hormônio. A diminuição significativa no peso da glândula vesicular em animais expostos a dose de 1,2 mg de CdCl₂/kg PC após 7 dias da exposição, foi também relatada por Predes et al. (2009), embora os pesos da próstata não tenham sido alterados. Alterações nas glândulas sexuais acessórias após a administração de Cd tem sido relatadas em diversos estudos (Gupta et al., 2003; El-Dermerdash et al., 2004). Segundo Guyton (2006), o hormônio andrógeno testosterona é um esteróide produzido nas células de Leydig, com limitada quantidade produzida pela córtex da adrenal. De acordo com Hafez (2003), a testosterona tem função reprodutiva essencial nos machos, estimulando entre outras coisas o crescimento, o desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais do macho, como próstata e glândulas vesiculares.

Animais dos grupos Cd2, Cd3 e Cd4 mostraram aumento no espaço intertubular, acompanhado por redução de túbulos seminíferos. O percentual de túnica própria dos túbulos seminíferos aumentou nos grupos tratados, semelhante aos resultados encontrados por Leite et al. (2010), em ratos submetidos à dose de 1,15 mg de CdCl₂/kg PC, analisados 48 h após a exposição. Alguns túbulos seminíferos, embora circundados por membrana basal, estavam quase completamente vazios de células reconhecíveis. Como estes animais apresentaram resposta altamente sensível ao cádmio, resultando em destruição dos testículos, eles foram excluídos das análises estereológicas e morfométricas testiculares. Estudos sobre danos testiculares induzidos pelo cádmio mostraram que as diferenças de sensibilidade individuais e entre as espécies pode estar

relacionados às variações na capacidade das células de acumularem cádmio (King et al., 1999; Dalton et al., 2005).

O intertúbulo é o componente testicular mais sensível (Blanco et al., 2007) o que fez com que ocorressem significativas reduções de volume do intertúbulo nos animais expostos as maiores doses de Cd. Segundo Predes et al. (2009), os volumes não sofreram grandes alterações devido à redução dos testículos. Após a exposição aguda, danos testiculares induzidos pelo cádmio podem ser encontrados tanto nos túbulos seminíferos quanto no interstício (Blanco et al., 2007; Predes et al., 2009). A disfunção testicular pode ser resultado de rompimento da barreira hematotesticular, ou nas células de Leydig, comprometendo a produção de andrógenos sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-testicular (Bizarro et al., 2003; Manna et al., 2008; Siu et al., 2009)

Houve diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos nos grupos tratados com as duas maiores doses em relação ao controle e também a menor dose. Predes et al. (2009) observaram redução significativa do diâmetro tubular em animais que receberam Cd na dose de 1,2 mg CdCl₂/kg o que não foi observado no estudo atual. A exposição crônica a baixas doses de cádmio no testículo de camundongos causou aumento do diâmetro e do lume dos túbulos seminíferos, mas com diminuição do percentual de epitélio germinativo (Blanco et al., 2007). Normalmente existe relação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica do testículo (França & Russell, 1998). A diminuição do diâmetro tubular observada neste trabalho está de acordo com a redução da espermatogênese verificada em animais que receberam Cd.

No testículo dos animais do grupo Cd1, observa-se grande número de vacuolizações na base do epitélio seminífero confirmando o efeito deletério do metal com possível perturbação da barreira hematotesticular, conforme observado também por Predes et al. (2009). De acordo com Creasy (2001), a vacuolização é a resposta morfológica mais comum das células de Sertoli em resposta a diversas lesões, seguida de degeneração das células germinativas e desorganização ou esfoliação dessas células.

Em análise histopatológica qualitativa foi notado ausência de lúmen tubular nos animais que receberam Cd. Este processo, resultante de descamação e necrose, ocorre devido ao deslocamento de células germinativas, do epitélio para o lume. Em consequência, há a condução das células descamadas para fora do túbulo restando, finalmente, apenas uma camada basal constituída de células de Sertoli. Parizek (1957) observou que a administração subcutânea cloreto de cádmio em ratos machos e ratos leva à destruição aguda dos testículos, com destruição do epitélio seminífero e do tecido

intersticial. A exposição de ratos a 1,15 mgCdCl₂/kgPC causou evidentes alterações morfológicas em relação ao controle, após 48 h, sendo que alguns tiveram morte celular maciça no epitélio seminífero e no espaço intertubular, indicando que alguns animais são mais sensíveis ao cádmio que outros (Leite et al., 2010). Os danos nos testículos, com ocorrência de necrose observada nas menores doses, pode ocorrer devido ao rompimento da barreira hematotesticular e o estresse oxidativo, com início de necrose (Thompson & Bannigan, 2008). Células gigantes multinucleadas também foram observadas no lume tubular, na fase de descamação, em animais expostos às três maiores doses o que está de acordo com outros estudos em túbulos de seminíferos de ratos (Biswas et al., 2001; Yang et al., 2006) e camundongos (Blanco et al., 2007).

Foi observado também grande número de mastócitos no intertúbulo de animais expostos ao cádmio o que não ocorreu nos animais controle, e esse aumento é correlacionado com a fisiopatologia de distúrbios testiculares (Roaiiah et al., 2007). Em ratos é descrita a ocorrência de raros mastócitos testiculares e estes se localizam imediatamente sob a albugínea testicular e em torno dos vasos sanguíneos, mas estão ausentes no interstício testicular (Gaytan et al., 1989). O aumento de mastócitos testiculares próximo aos túbulos seminíferos indica disfunção da barreira hematotesticular, bem como fibrosamento intertubular e aumento no número de células inflamatórias o que leva a um quadro de infertilidade humana (Haidl et al., 2011). A ação dos mastócitos causa aumento da proteína decorina, através da produção de triptase derivada de mastócitos, causando desequilíbrio nas vias de sinalização parácrinas, o que foi observado em homens infertéis (Adam et al., 2011).

A diminuição nos parâmetros de células de Leydig foram encontrados também, em camundongos expostos cronicamente a baixas doses de cádmio que apresentaram redução no volume de células de Leydig, a partir de três meses (Blanco et al., 2007). Células de Leydig em cultura expostas agudamente a baixas doses de Cd tiveram sua viabilidade reduzida, acompanhado da redução na produção de testosterona (Yang et al., 2003).

As alterações nas células de Leydig levam-nos a inferir que a produção de testosterona também pode estar alterada, justificando a diminuição do peso das glândulas sexuais acessórias o que juntamente com o aumento da barreira de tecido conjuntivo no intertúbulo, dificulta a difusão dos hormônios do intertúbulo até o epitélio seminífero levando à baixa estimulação das células espermatogênicas causando

diminuição do índice mitótico e do rendimento geral da espermatogênese em todos os grupos tratados em relação ao controle.

No intertúbulo o aumento de fibras colágenas foi evidenciado pelo método PSP (picrosirius polarização) sendo observado maior acúmulo de colágeno tipo I nos grupos que receberam Cd. Similar ao encontrado neste trabalho, Predes et al. (2009), após tratamento de ratos com baixas doses de cádmio, observaram que o interstício apresentava uma camada espessa, de aspecto compacto e fibroso, com poucas fenestras. As poucas fenestras poderiam afetar o movimento de fluidos e hormônio na comunicação parácrina entre células de Leydig e os túbulos seminíferos.

A menor quantidade de água tecidual observada nos grupos Cd2, Cd3 e Cd4 pode está relacionada com o aumento do tecido conjuntivo fibroso nos grupos que receberam cádmio, acompanhado da redução no percentual de vasos sanguíneos e vasos linfáticos. Alguns estudos relacionam as alterações histológicas a danos ocorridos em vasos sanguíneos como principal causa da toxicidade (Yang et al., 2003), conforme observado em animais que receberam 1,15mg de CdCl₂/kg PC, nos quais os vasos sanguíneos estavam contraídos e/ou ocluídos pelas células sanguíneas, 48 horas após a exposição (Leite et al., 2010). Essa vasoconstrição foi descrita, também, por Tzotzes et al., (2007) e Leite et al., (2010) e pode ser explicada, pelo menos em parte, pela indução do estresse oxidativo intracelular, resultando em síntese diminuída de óxido nítrico (Skoczynska & Martynowicz, 2005; Martynowicz et al., 2004) e consequente redução da vasodilatação. Alterações de permeabilidade no endotélio capilar, que causa hemorragia, edema ou necrose, parecem ser os principais implicados no mecanismo histopatológico das lesões (Blanco et al., 2007). O nível de defesa parece variar para cada animal, pois os efeitos não são uniformes dentro de um mesmo grupo (Predes et al., 2009). A resposta heterogênea à exposição ao cádmio está de acordo com estudo anterior (Hew et al., 1993) sugerindo que alguns animais são mais sensíveis ao cádmio que outros.

Os danos observados nos testículos estão relacionados ao acúmulo de Cd neste órgão, com concentrações elevadas nas maiores doses de Cd utilizadas. Estudo com intoxicação subcrônica de ratos por via subcutânea na doses 0,6 mg Cd/dia durante 6 semanas mostrou que a concentração de Cd nos testículos aumentou mais de 100 vezes que no soro, depois de 2 semanas, sugerindo ativa acumulação Cd testicular (Aoyagi et al., 2002). O nível molecular e o estado nutricional interferem na absorção do cádmio e

sua retenção em quantidades variadas nos órgãos se deve à quantidade de metalotioneína existente em cada órgão (Nath et al., 1984).

As atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) aumentadas confirmam estudos, que nos últimos anos, atribuem a patogênese das lesões causada pelo cádmio ao estresse oxidativo (Sinha et al., 2007; Borges et al., 2008; Ola-Mudathir et al., 2008). As enzimas antioxidantes, como SOD e CAT, constituem o sistema de defesa mais importante que limita a toxicidade associada com os radicais livres (Sreepriya & Bali, 2006).

5. CONCLUSÕES

Na dose de 0,67 mg de Cd/kg, que foi a menor dose testada, já houveram alterações relevantes nas características morfológicas e morfométricas testiculares, além de alterações nas atividades de defesas antioxidantes, mesmo quando não havia diferença na detecção do metal no testículos dos animais expostos a essa dose. Há indicação do aumento das patologias e alterações morfométricas nas doses maiores. As alterações nas células de Leydig levam-nos a inferir que a produção de testosterona também pode estar alterada, justificando a diminuição do peso das glândulas sexuais acessórias o que juntamente com o aumento da barreira de tecido conjuntivo no intertúbulo, pode levar a uma baixa estimulação das células espermatogênicas causando diminuição do índice mitótico e do rendimento geral da espermatogênese em todos os grupos. Por se tratar de efeitos crônicos e exposição única a baixas doses, conclui-se que o tecido testicular não retorna a sua fisiologia e morfologia normais.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

6. REFERÊNCIAS

- Abercrombie, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Record* 94: 239-247.
- Adam, M., Schwarzer, J.U., Köhn, F.M., Strauss, L., Poutanen, M., Mayerhofer, A. 2011. Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Human Reproduction*. 26:2613-2625

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 105:121-126.
- Amann, R.P., Almquist, J.O. 1961. Reproductive capacity of dairy bulls. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. *Journal Dairy Science* 44,1537-1543.
- Amann, R.P., Almquist, J.O. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science* 45:774-781.
- Aoyagi, T., Shikawa H.I., Miyaji, K., Hayakawa, K., Hata, M. 2002. Cadmium-induced testicular damage in a rat model of subchronic intoxication. *Reproductive Medicine and Biology* 1:59-63.
- Benoff, S., Jacob, A., Hurley, I.R. 2000. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Reproduction Update* 6:107-121.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science* 44:818-833.
- Blanco, A., Moyano, R., Vivo, J., Flores-Acuña, R., Molina, A., Blanco, C., Agüera, E., Monterde, J. 2007. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23:96-101.
- Biswas N.M., Gupta R.S., Chattopadhyay, A., Choudhury, G.R., Sarkar, M. 2001. Effect of atenolol on cadmium-induced testicular toxicity in male rats. *Reproductive Toxicology* 15:699-704.
- Bizarro, P., Acevedo, S., Niño-Cabrera, G., Mussali-Galante, P., Pasos, F., Avila-Costa, M., Fortoul, T. 2003. Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reproductive Toxicology* 17:561-566.
- Bonde, J.P. 2010. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian Journal Andrology* 12:152-156.
- Borges, L., Brandão, R., Godoi, B., Nogueira, C., Zeni, G. 2008. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chemico-Biological Interactions* 171:15-25.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemical* 72:248-254.

- Carvalho, F.A.R. 2009. Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos a exposição crônica ao arsenato. Dissertação para obtenção de Título de Mestre na área de Biologia Celular e Estrutural. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 76p.
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D. 2011. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews* 64, n 1.
- Cheng, C.Y., Wong, E.W., Lie, P.P., Li, M.W., Su, L., Siu, E.R., Yan, H.H., Mannu, J., Mathur, P.P., Bonanomi, M., Silvestrini, B., Mruk, D.D. 2011. Environmental toxicants and male reproductive function. *Spermatogenesis* 1:2-13.
- Chiquoine, A.D. 1964. Observations on the early events of cadmium necrosis of the testis. *Anatomical Record* 149:23-35.
- Costa, K.L.C., Matta, S.L.P., Gomes, M.L.M., Paula, T.A.R., Freitas, K.M., Carvalho, F.A.R., Silveira, J.A., Dolder, H., Mendis-Handagama, S.M.L.C. 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes os spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science* 127:202-212
- Creasy D.M. (2001) Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicology Pathology* 29:64-76.
- Dalton, T.P., He, L., Wang, B., Miller, M.L., Jin, L., Stringer, K.F., Chang, X., Baxter C.S., Nebert, D.W. 2005. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102:3401-3406.
- El-Demerdash, F., Yousef, M., Kedwany, F., Baghdadi, H. 2004. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food and Chemical Toxicology* 42:1563-1571.
- El-Sokkary, G., Nafady, A., Shabash, E. 2009. Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Open Neuroendocrinology Journal* 2:1-9.
- Fouad, A., Qureshi, H., Al-Sultan, A., Yacoubi, M., Ali, A. 2009. Protective effect of hemin against cadmium-induced testicular damage in rats. *Toxicology* 257:153-160.

- França L.R., Russell, L.D. 1998. The testes of domestic animals. In: Regadera, J & Martinez-Garcia, R. (Eds). Male reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, pp. 197-219.
- Gaytan, F., Carrera, G., Pinilla, L., Aguillar, R., Bellido, C. 1989. Mast cell in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *Journal of Andrology* 10:351-358
- Guyton, A.C., Hall, J.E. 2006. Funções reprodutivas e hormonais nos homens In: Tratado de fisiologia médica. 11ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Gupta, R., Sharma, R., Chaudhary, R., Yadav, R., Khan, T. 2003. Effect of textile waste water on the spermatogenesis of male albino rats. *Journal of Applied Toxicology* 23:171-175.
- Hafez, E.S.E. 2003. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: Reprodução animal. 7ª edição. Manole, São Paulo.
- Haidl, G., Duan, Y.G., Chen, S.J., Kohn, F.M., Schuppe, H.C., Allam, J.P. 2011. The role of mast cells in male infertility. *Expert Review of Clinical Immunology* 7:627-634
- Herak-Kramberger, C., Saboli, I., Blanuša, M., Smith, P., Brown, D., Breton, S. 2000. Cadmium inhibits vacuolar H⁺ ATPase-mediated acidification in the rat epididymis. *Biology of Reproduction* 63:599-606.
- Hew, K.W., Heath, G.L., Jiwa, A.H., Welsh, M.J. 1993. Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction* 49:840-849.
- Hochereau-De-Reviers, M.T., Lincoln, G.A., 1978. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 209-213
- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B. 1981. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 25:217-226.
- Jørgensen, N., Vierula, M., Jacobsen, R., Pukkala, E., Perheentupa, A., Virtanen, H.E., Skakkebaek, N.E., Toppari, J. 2011. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *International Journal Andrology* 34:37-48.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138.

- King, L.M., Banks, W.A., George, W.J. 1999. Differences in cadmium transport to the testis, epididymis, and brain in cadmium-sensitive and -resistance murine strains 129/J and A/J. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics* 289:825-830.
- Larison, J.R., Likens, G.E., Fitzpatrick, J.W., Crock., J.G. 2010. Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains. *Nature* 406:181-183.
- Leite, R.P., Wada, R.S., Monteiro, J.C. Predes, F.S., Dolder, H. 2010. Protective effect of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. *Biological Trace Element Research* 141:262-274.
- Lucas, B., Fields, C., Hofmann, M.C. 2009. Signaling pathways in spermatogonial stem cells and their disruption by toxicants. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 87:35-42.
- Madesh, M., Balasubramanian, K.A. 1998. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 35:184-188.
- Manna, P., Sinha, M., Sil, P. 2008. Cadmium induced testicular pathophysiology: prophylactic role of taurine. *Reproductive Toxicology* 26:282-291.
- Martynowicz, H., Skoczynska, A., Wojakowska, A., Turkzyn, B. 2004. Serum vasoactives agents in rats poisoned with cadmium. *International Journal Occupational Medical Environmental* 17:479-485.
- Mata, W.S. 2009. Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos machos adultos. Tese para obtenção de Título de Doutor na área de Biologia Celular e Estrutural. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 124p.
- Nath, R.; Prasad, R., Palinal, V. K., Chopra, R.K., 1984. Molecular basis of cadmium toxicity. *Progress in Food & Nutrition Science* 8:109-164.
- Ola-Mudathir, K., Suru, S., Fafunso, M., Obioha, U., Faremi, T. 2008. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology* 46:3604-3611.
- Oliveira, M.F. 2010. Efeito da exposição crônica ao níquel no testículo de ratos Wistar adultos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 68 p.
- Parizek, J., Zahor, Z. 1956 Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 177:1036-1037.

- Parizek, J. 1957. The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *Journal of Endocrinology* 15:56-63.
- Parizek, J. 1960. Sterilization of the male by cadmium salts. *Journal of Reproduction and Fertility* 1:294-309.
- Phillips, K.P., Tanphaichitr, N. 2008. Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews* 11:188-220.
- Predes, F.S., Diamante, M.A.S., Dolder, H. 2009. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology* 91:125-31.
- Prozialeck, W.C., Lamar, P.C. 1999. Interaction of cadmium (Cd) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1451:93-100.
- Roaiyah, M.M., Khatab, H., Mostafa, T. 2007. Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia* 39:185–189.
- Sakkas, D., Alvarez, J.G. 2010. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* 93:1027-1036.
- Setchell, B.P., Waites, G.M. 1970. Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat. *Journal of Endocrinology* 47:81-86.
- Sinha, M., Manna, P., Sil, P. 2007. Attenuation of cadmium chloride induced cytotoxicity in murine hepatocytes by a protein isolated from the leaves of the herb *Cajanus indicus* L. *Archives of Toxicology* 81:397-406.
- Siu, E.R., Mruk, D.D., Porto, C.S., Cheng, C.Y. 2009. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238:240-249.
- Skoczynska, A., Martynowicz, H. 2005. The impact of subchronic cadmium poisoning in the vascular effect of nitric oxide in rats. *Human Experimental Toxicology* 24:353-361.
- Sreepriya, M., Bali, G. 2006. Effects of administration of Embelin and Curcumin on lipid peroxidation, hepatic glutathione antioxidant defense and hematopoietic system during N-nitrosodiethylamine/Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 284: 49-55.
- Tae, H.J., Jang, B.G., Ahn, D.C., Chol, E.Y., Kang, H.S., Kim, N.S., Lee, J.H., Park, S.Y., Yang, H.H., Kim, I.S. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean

- ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karkpovi*) during the breeding and non-breeding seasons. *Veterinary Research Communications* 29:629-643.
- Telisman, S., Colak, B., Pizent, A., Jurasovic, J., Cvitkovic, P. 2007. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environmental Research* 105:256-266.
- Thompson, J., Bannigan, J. 2008. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*, 25:304-315.
- Tzotzes, V., Tzilalis, V., Giannakakis, S., Saranteas, T., Papas, A., Mourouzis, I., Mourouzis, C., Zarros, A., Pantos, C., Cokkinos, D., Carageorgiu, H. 2007. Effects of acute and chronic cadmium administration on the vascular reactivity of rat aorta. *Biometals* 20:83-91.
- Van Haaster, L.H, De Rooij, D.G. 1993. Spermatogenesis is accelerated in the immature djungarian and chinese hamster and rat. *Biology of Reproduction* 49:1229-1235.
- Viana, F.A.B. 2007. *Guia Terapêutico Veterinário*. 2ª ed. Editora CEM: Lagoa Santa-MG. 324p.
- Wirth, J.J., Mijal, R.S. 2010. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 56:147-167.
- Wong, E.W., Cheng, C.Y. 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacological Sciences* 32:290-299.
- Wong, E.W., Yan, H.H., Li, M.W., Lie, P.P., Mruk, D.D., Cheng, C.Y. 2010. Cell junctions in the testis as targets for toxicants. In: Hoyer, P.B. & Richburg, J.H. (Eds.). *Reproductive and Endocrine Toxicology*. Academic Press/Elsevier, Oxford, pp. 167-188.
- Yang, J.M., Arnush, M., Chen, Q.Y., Wu, X.D., Pang, B., Jiang, X.Z. 2003. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive Toxicology* 17: 553-560.
- Yang, H., Han, D., Kim, J., Sim, J. 2006. Effects of -tocopherol on cadmium-induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. *Journal of Korean Medical Science* 21: 445-451.
- Yu, M. 2004. *Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants*. CRC Press, 339p.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Os efeitos crônicos do cádmio no testículo e no fígado ocorrem devido à indução do estresse oxidativo, comprovado pelo aumento das atividades da SOD e CAT.
- ✓ Existem danos na morfologia hepática e na atividade funcional do parênquima hepático mesmo em pequenas doses.
- ✓ Alterações relevantes nas características morfológicas e morfométricas testiculares ocorrem mesmo em baixas doses.
- ✓ Atividade de defesas antioxidantes está aumentada mesmo quando não existe diferença na detecção do metal no fígado e testículos dos animais expostos em relação ao controle.
- ✓ Há aumento das patologias e alterações morfométricas nas doses maiores.
- ✓ A ação crônica de uma única dose causa alterações irreversíveis, mesmo em doses baixas.