

SUSANA PUGA RIBEIRO

**EFEITOS DO CÁDMIO, CHUMBO E ZINCO
EM EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR**

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
2013**

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

T

R484e
2013 Ribeiro, Susana Puga, 1962-
Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epididimo de ratos Wistar /
Susana Puga Ribeiro. - Viçosa, MG, 2013.
xiii, 52 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Rato - Reprodução. 2. Toxicologia. 3. Metais pesados. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 599.352

SUSANA PUGA RIBEIRO

EFEITOS DO CÁDMIO, CHUMBO E ZINCO
EM EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR

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: 29 de julho de 2013.



Mariella Bontempo Duca de Freitas



Marcos de Lucca Moreira Gomes



Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

*“Porque dele e por meio dele e para ele são todas as
cousas. A ele, pois, a glória eternamente.”*
Romanos 11:36

*“...para isso que eu me afadigo,
esforçando-me o mais
possível, segundo a sua eficácia que opera
eficientemente em mim.”*
Colossenses 1:29

*Dedico aos que nunca desistiram de mim
meus pais, Osmar e Terezinha
e aos meus irmãos,
Silvana, Lelena e Juninho*

AGRADECIMENTOS

“Tudo posso Naquele que me fortalece.....”, por isso eu O agradeço.

Aos meus amados pais, Osmar e Terezinha, pelo exemplo de amor, de caráter, persistência, por sua amizade, por seus conselhos. Vocês são uma grande prova do amor de Deus por mim, pois Ele permitiu que vocês, papai e mamãe, fossem meus pais. Eu lhes agradeço pelos ensinamentos de vida, e de vida cristã, por tudo de bom que sou e que possa ser ainda.

Agradeço aos meus amados irmãos, Silvana, Lelena e Juninho, pelo exemplo de amor, de trabalho, competência e por acreditarem sempre em mim.

À Glorinha, Glória Bárbara, como diz meu irmão, que me ajudou, que me escutou, que chorou comigo e que estava sempre disposta a me servir. Você foi realmente bárbara nestes dois anos. Obrigada!

Aos meus “tios” e “tias”, Tia Ieda, Tio Daison e Tia Maria, Tio Cambraia e Tia Ivone pelo carinho, pela paciência e por suas orações.

À minha amiga Lôra, por se considerar minha amiga mesmo na minha ausência e por nunca ter esquecido de mim em suas orações.

À minha amiga Júnia, que considero minha irmã mais velha, por sua dedicação e suas orações.

Ao Reverendo Elben, “Rev”, por horas e horas de orações dedicadas a mim em toda a minha existência e, à sua esposa, D. Djanira, por estar sempre sorrindo e disposta a me ajudar.

Ao orientador e amigo conselheiro Prof. Sérgio Luis P. Matta pela confiança, por acreditar em mim, pelo exemplo, pela orientação, pelo sorriso compreensivo, pelas broncas, por não perder a paciência comigo, por ser exemplo de capacidade e experiência.

À Profa. Mariana, por sua doce presença no Laboratório, por estar sempre disposta a me ajudar, por me escutar, por me ensinar e por ser minha amiga.

À Profa. Ana Lúcia, que permitiu-me conviver com seus orientados, me orientando e me ensinando, que confiou em mim e torceu por mim.

Ao Prof. Jenner, pelo exemplo de pessoa e de professor, por ser amigo, por me aconselhar sempre acreditando na minha capacidade.

À Profa. Mariella que confiou, acreditou se dedicou e apostou em mim.

À Profa. Gisele pelo apoio, pelo carinho e torcida pelo meu sucesso.

À minha querida amiga Camila, um agradecimento muito especial. Camila foi muito importante nestes meus dois anos de estudo e pesquisa, foi meus olhos, quando não enxergava os cortes no micrótomo, foi minha paciência nas fotos, na escrita dos resumos, foi meu alerta aos prazos e obrigações, foi minha ajuda na gavagem com os ratinhos, foi minha ajuda com as rãs quando não suportava mais aquele trabalho. Com sua juventude, foi minha âncora, minha alegria e de todo o laboratório com o seu jeitinho meigo mais muito moleque. Obrigada Camila, você foi fundamental nestes dois anos de minha vida.

À minha amiga e colega Lidiane, que estudou comigo, que me ajudou a não parar de estudar mesmo quando eu já estava muito cansada.

As amigas Grazi e Tati pela ajuda com o experimento, com conhecimentos e com a amizade. Obrigada pela paciência e dedicação. Vocês foram importantes para que esse trabalho se concretizasse.

À minha amiga e colega Andreia, que aprendi a amar de paixão. Obrigada por me ajudar muito, pela oportunidade de lhe ajudar, pela confiança, por seu carinho. Agradeço ao casal Andreia e Luis por me apoiarem em momentos muito difíceis. Muito Obrigada!

Aos amigos do laboratório: Kyvia, Marli, Vivi, Carol e Rômulo, por me apoiarem na dissertação e no laboratório sempre, por ensinarem e acreditarem em mim.

À Ana Tereza por me ajudar no experimento para a minha dissertação.

Ao técnico do laboratório de Biologia Estrutural, Matheus, pelo auxílio com os reagentes, soluções, equipamentos; pelo atendimento e pelos momentos de descontração no laboratório.

Aos meus queridos estagiários Isaac e Rose, por me ajudarem, por estarem sempre dispostos, por sua dedicação aos meus projetos.

A todos os colegas do mestrado em Biologia Animal, por compartilharmos conhecimentos e apuros.

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

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

Aos amigos das secretarias do Departamento de Biologia Animal, Lúcia e Adnilson, pelo sempre pronto atendimento e disponibilização em resolver os problemas. Obrigada por me ajudarem sempre que precisei.

À Universidade Federal de Viçosa por ser minha “casa”, meu refúgio e fonte de muitos dos meus conhecimentos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pesquisa para a realização deste mestrado.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo aporte financeiro na aquisição de drogas e reagentes.

Destaco com grande importância meu agradecimento às “Dinas”, especialmente Beatriz, Silvinha, Lina, Débora, Rose, Rita Ferreira e Rita Maria, por serem amigas, por me receberem com carinho de volta em Viçosa, por facilitarem muito este meu retorno pródigo, por horas de risada e companheirismo, por compartilharem dos meus problemas e de minhas vitórias.

À minha amiga “Tize”, um obrigada muito especial, a ela que nunca se esqueceu de mim, que se empenhou em me ajudar em tudo, que me ouviu, que se scandalizou comigo, mas não desistiu de mim, que me aconselhou sabiamente sempre, que me fez rir muito e que fez a minha estadia nesta cidade muito mais agradável.

À amiga Virgínia, que me ensinou muito com seu exemplo de superação e amor.

Ao casal Rosângela e Rogério, que aprendi a admirá-los. Agradeço o carinho com que sempre me trataram.

Agradeço à Joana, minha amiga de Governador Valadares, que compartilhou anos felizes comigo, agradeço pelos cafés, pelo convívio gostoso com sua família e por sua amizade.

Ao Laboratório de Entomologia pelo uso do fotomicroscópio.

Aos animais utilizados neste estudo.

Agradeço ainda, a todos que convivi nestes últimos dois anos e que contribuíram para minha formação. Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Metais pesados	3
2.2 Cádmio	4
2.3 Chumbo	7
2.4 Zinco	12
2.5 Epidídimo	15
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
ARTIGO	39
EFEITOS DO CÁDMIO, CHUMBO E ZINCO EM EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR	39
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Experimento com Cádmio.....	41
2.2. Experimento com Zinco.....	41
2.3. Experimento com Chumbo	41
2.4. Processamento Histológico do Epidídimo	41
2.5. Morfometria do Epidídimo	42
2.6. Proporções Volumétricas do Epidídimo	42
2.7. Análise Estatística	43
3. RESULTADOS	43
3.1 Cádmio	43
3.2 Chumbo	44
3.2 Zinco	46
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

RIBEIRO, Susana Puga, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epidídimo de ratos Wistar**. Orientador: Sérgio Luis P. da Matta.

Há um grande interesse no papel da exposição ocupacional e ambiental a poluentes tóxicos, como os metais pesados, pois se entende que essa é uma das causas da redução da concentração espermática no homem. Portanto, o estudo da influência dos metais pesados em machos tem focado principalmente no sistema reprodutor, lugar de desenvolvimento, diferenciação, maturação e capacitação das células germinativas. Este estudo investigou os efeitos de doses crescentes dos metais pesados, cádmio (Cd), chumbo (Pb) e zinco (Zn), no epidídimo de ratos. O trabalho foi dividido em três experimentos nos quais foram utilizados ratos adultos em idade reprodutiva, colocados em gaiolas individuais e mantidos em ambiente controlado. Para a avaliação dos efeitos do Cd no epidídimo, 24 animais foram separados em 4 grupos experimentais sendo um controle e três grupos que receberam, respectivamente, 1,1, 1,4 e 1,8 mg/kg de cloreto de cádmio via intraperitoneal, em dose única. Para a avaliação dos efeitos do Pb no epidídimo foram utilizados 25 animais distribuídos em 5 grupos experimentais, sendo um controle e quatro que receberam acetato de chumbo, por gavagem, nas concentrações de 16, 32, 64, 128 mg/kg/dia, respectivamente. Na avaliação dos efeitos do Zn 28 animais foram distribuídos em 4 grupos sendo o sulfato zinco administrado a três grupos, na água de beber, nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/dia. Os animais que receberam Cd e Zn foram eutanasiados aos 56 dias de tratamento enquanto os animais submetidos ao Pb foram eutanasiados aos 30 dias. Foram realizadas as seguintes análises em todos os epidídimos coletados: diâmetro tubular (DT), diâmetro luminal (DL), altura de epitélio (EP) e as proporções volumétricas (%) do epitélio (E), tecido conjuntivo (TC), lúmen com espermatozoide (LcE) e lúmen sem espermatozoide (LsE), no segmento inicial, cabeça e cauda do epidídimo. O cádmio provocou aumento na altura do epitélio da cabeça do epidídimo e aumento dos diâmetros tubular e luminal na cauda. Por outro lado os parâmetros proporcionais foram reduzidos na proporção do epitélio da cabeça e cauda do epidídimo. Ainda na cabeça do epidídimo, a proporção do lúmen com espermatozoide foi reduzida enquanto que a proporção do lúmen sem espermatozoide aumentou, tanto no segmento inicial como na cabeça e na cauda do epidídimo. O chumbo, em todos os tratamentos, na região da cauda, reduziu significativamente o diâmetro do túbulo e lúmen

do epidídimo, enquanto que na cabeça provocou aumento na altura do epitélio e redução em sua proporção. Quanto aos efeitos do zinco, foram observadas reduções significativas da altura do epitélio, tanto no segmento inicial, cabeça e cauda do epidídimo e os diâmetros do lúmen e túbulo aumentaram na porção caudal. Assim, entendemos que os três metais avaliados provocaram alterações morfométricas nas três regiões do órgão analisadas, na maioria das vezes se mostrando tóxicos ao epidídimo e que o cádmio se mostrou mais tóxico ao processo reprodutivo, devido ao aumento do lúmen sem espermatozoide que causou, em todas as regiões do epidídimo avaliadas, perdas na capacidade reprodutiva destes animais.

ABSTRACT

RIBEIRO, Susana Puga, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Effects of cadmium lead and zinc in the epididymis of Wistar rats.** Advisor: Sérgio Luis P. da Matta.

There is considerable interest in the role of occupational and environmental exposure to toxic pollutants such as heavy metals, because we understand that this is one of the causes of reduced sperm concentration in man. Therefore, the study of the influence of heavy metals in males has focused mainly on the reproductive system, site development, differentiation, maturation and capacitation of germ cells. This study investigated the effects of increasing doses of heavy metals, cadmium (Cd), lead (Pb) and zinc (Zn) in the epididymis of rats. The work was divided into three experiments were used adult rats of reproductive age, placed in individual cages in a controlled environment. To assess the effect of Cd on the epididymis, 24 animals were divided into 4 experimental groups and one control group and three groups that received respectively 1.1, 1.4 and 1.8 mg / kg intraperitoneally cadmium chloride, a single dose. For the evaluation of the effects of Pb in the epididymis 25 animals were used divided into 5 experimental groups, one control and four receiving lead acetate by gavage at concentrations of 16, 32, 64, 128 mg / kg / day, respectively . In the evaluation of the effects of Zn 28 animals were divided into 4 groups with zinc sulfate administered to three groups in the drinking water at concentrations of 5, 10 and 20 mg / day. Animals receiving Cd and Zn were euthanized after 56 days of treatment while animals subjected to Pb were euthanized at 30 days. The following analyzes were performed in all epididymides collected: diameter tubular (DT), lumen diameter (LD), height of the epithelium (EP) and the volumetric proportions (%) of the epithelium (E), connective tissue (CT), with lumen sperm (LCE) and lumen without sperm (LSE), the initial segment, head and tail of the epididymis. Cadmium caused an increase in epithelial height of the head of the epididymis and increased luminal diameter tubular tail. Moreover proportional parameters were reduced in proportion to the epithelium of the head and tail of the epididymis. Even the head of the epididymis, the proportion of sperm with lumen was reduced while the proportion of the lumen without sperm increased both the initial segment as the head and tail of the epididymis. The lead, in all the treatments, at the tail region, significantly reduced the diameter of the lumen and epididymal tubule, while the head caused an increase in epithelial height and reduction in its amount. The effects of zinc, significant reductions were observed in epithelial height, both in the initial segment, head and tail of the epididymis and the diameters of the tubule lumen and increased in the caudal portion. Thus, we believe that all three evaluated metals caused morphological

changes of the organ in the three regions studied, the most often toxic showing the epididymis and that the cadmium was more toxic to the reproductive process, due to the increased lumen without sperm causing in all epididymal evaluated regions, thus causing loss in reproductive capacity of these animals.

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 consequente demanda por bens de consumo, o homem tem produzido quantidades significativas destes resíduos, possibilitando o aparecimento de enfermidades relacionadas com os diversos metais tóxicos (LEITE et al., 2004).

Dentre os contaminantes ambientais encontram-se os metais pesados, que são altamente resistentes à degradação.

As principais fontes antrópicas de metais no ambiente são água de irrigação contaminada, queima de biomassa na zona rural, emissões veiculares, incineração de resíduos urbanos e industriais, acúmulos de lixo e, principalmente, efluentes industriais, de mineração, de siderurgia e da galvanoplastia (LARSON & WEINCEK, 1994).

Embora sejam comuns na natureza, as atividades humanas têm contribuído para o aumento do nível dos metais pesados nos ecossistemas aquáticos naturais, destacando-se as indústrias e as minerações, o que gera preocupação pela possibilidade destes elementos químicos serem incorporados por organismos, inclusive humanos, que direta ou indiretamente estão em contato ou fazem uso dos recursos hídricos (OLIVEIRA & HORN, 2006).

Metais pesados são poluentes estáveis e acarretam sua permanente adição ao meio aquático. Consequentemente apresentam significativo potencial para bioacumulação na biota aquática, podendo inclusive biomagnificar-se ao longo de cadeias alimentares (BURATINI & BRANDELLI, 2006), causando alterações morfológicas e fisiológicas em diferentes organismos.

Os metais apresentam múltiplos mecanismos de toxicidade, pois os íons metálicos têm alta afinidade por moléculas contendo átomos de nitrogênio e enxofre ligando-se, com relativa facilidade, a proteínas e outras macromoléculas celulares. Assim, sua toxicidade deve-se principalmente à sua capacidade de interferir em reações enzimáticas, bloqueando-as, deslocando o íon essencial ou modificando a conformação ativa de biomoléculas. Seu potencial tóxico deve-se também à sua baixa mobilidade, em virtude da sua pequena dimensão. Essa fraca mobilidade faz com que se acumulem, modificando profundamente o metabolismo do organismo (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Dentre os metais pesados que causam maior preocupação

destacam-se o chumbo, o mercúrio e o cádmio (LIU et al., 2008). Há um crescente interesse no papel da exposição ocupacional e ambiental a poluentes tóxicos, pois entende-se que essa é uma das causas de declínio da concentração espermática na população humana (APOSTOLI & CASTALANI, 2011). A disfunção testicular induzida por metais pesados pode levar a modificações estruturais nas células de Sertoli, que sustentam as células germinativas, ou nas células de Leydig, que são responsáveis pela produção de andrógenos (BIZARRO et al., 2003).

OLDEREID et al. (2009), compararam a concentração de cádmio, chumbo e zinco em fígado, rins e órgãos reprodutores, incluindo próstata, vesículas seminais, testículos e epidídimos de homens que tiveram morte natural, concluindo que o cádmio acumulou em maior quantidade nos tecidos estudados em relação ao chumbo. A maior concentração de cádmio nos órgãos reprodutores foi positivamente correlacionada com a maior concentração no fígado.

O estudo da influência dos metais pesados no aparelho reprodutor de machos tem focado principalmente nas gônadas, lugar de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas. Contudo, o espermatozoide não deixa o testículo totalmente maduro (ROBAIRE et al., 2006). Durante o transporte epididimário, os espermatozoides são submetidos a um processo de maturação na cabeça do epidídimo, resultando na aquisição de habilidades para se movimentar e fertilizar o ovócito. Durante este processo, o espermatozoide é submetido a modificações bioquímicas, morfológicas e funcionais estimuladas por proteínas estruturais e enzimáticas e por glicoproteínas sintetizadas por células epiteliais do epidídimo. Espermatozoides tornam-se maduros e capazes de fertilizar o ovócito quando alcançam a parte central do corpo ou a parte proximal da cauda do epidídimo. A cauda do epidídimo fornece armazenamento e viabilização do espermatozoide. Durante a permanência no epidídimo, espermatozoides podem ser afetados por muitas substâncias nocivas, dentre as quais os metais pesados (ROBAIRE et al., 2006).

Partindo do princípio que é crescente a contaminação ambiental por metais pesados, que vários estudos já comprovaram efeitos deletérios desses elementos nos testículos de mamíferos, que há propensão dos epidídimos sofrerem efeitos cumulativos e tóxicos dos metais pesados e finalmente, que são poucos os trabalhos que trazem resultados conclusivos sobre a ação destes metais na maturação e capacitação dos espermatozoides, surge a necessidade de estudarmos os mecanismos de atuação, doses e efeitos dos metais nas alterações morfométricas nestes órgãos. Portanto, o objetivo deste

estudo foi avaliar os efeitos dos tratamentos de cádmio (Cd), chumbo (Pb) e zinco (Zn) em epidídimo de ratos Wistar.

2. Revisão de Literatura

2.1. Metais pesados

Metais pesados são elementos de alta densidade, em comparação a outros elementos comuns, apresentam densidade igual ou superior a 5 g/cm³, e número atômico maior que 20 (SOARES, 2004). Essa expressão "metais pesados", é utilizada na literatura relacionada a metais, semi-metais e não-metais. São utilizados como sinônimos, "metais traço", "elementos traço", "micronutrientes", "microelementos" (DUARTE & PASQUAL, 2000).

Dentre os metais, desempenhando papel importante no organismo, estão os micronutrientes sódio, potássio, manganês, ferro, cobre, zinco e o cálcio. Outros como o arsênio, 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).

Uma vez absorvidos os metais pesados interagem com as proteínas, sendo transportados pelo sangue até os tecidos onde podem ser estocados ou biotransformados (LIU et al. 2008). 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 a combinação com as membranas celulares, o que perturba ou impede completamente o transporte de substâncias essenciais (GOLDHARBER, 2003). Além disso, alguns metais pesados são capazes de imitar os metais essenciais unindo-se a sítios fisiológicos que normalmente seriam ocupados por estes, o que pode contribuir para a bioacumulação de metais tóxicos no organismo (LIU et al., 2008). Além disso, os efeitos tóxicos podem incluir a letalidade e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (LIU et al., 2008; FLORA et al., 2011).

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, se ingeridos em concentrações elevadas, são venenos acumulativos para o organismo (GUILHERME et al., 2005).

Os efeitos adversos dos metais pesados sobre a fertilidade masculina podem ocorrer nos órgãos genitais e/ou no sistema endócrino. Podem incluir alterações no comportamento sexual, na fertilidade, na fecundação, ou modificações em outras funções dependentes da integridade do aparelho reprodutor masculino (GOYER, 1996).

OLIVEIRA (2010), em experimento com ratos e metais pesados (injeção subcutânea com 74 e 100 mg de $PbCl_2$ /kg de peso do animal ou 5 e 10 mg de K_2CrO_4 /kg de peso do animal, respectivamente, durante 4 dias consecutivos ou com 1, 2 e 3 mg de $CdCl_2$ /kg numa única injeção), concluiu que a motilidade dos espermatozoides e a integridade do acrossoma são parâmetros sensíveis à toxicidade de metais. O acrossoma aparenta ser um dos principais alvos da toxicidade dos metais e uma reação acrossômica prematura pode reduzir a capacidade do espermatozoide em fertilizar o ovócito.

2.2 Cádmi

O cádmio (Cd) é o elemento número 48 da tabela periódica, com massa atômica de 112,4 (VARMA, 1986), sendo assim considerado um metal pesado. Embora inicialmente tenha sido descrito como um elemento relativamente raro (VALLE & ULMER, 1972; WOOD, 1974), posteriormente foi constatado que o mesmo se encontra presente no ambiente em baixos níveis (VARMA, 1986). O cádmio existente na atmosfera é precipitado e depositado no solo agrícola na relação aproximada de 3g/hectares/ ano. Rejeitos não ferrosos e artigos que contêm cádmio contribuem significativamente para a poluição ambiental. É obtido como subproduto da refinação do zinco e de outros minérios, como chumbo-zinco e cobre-chumbo-zinco (NAKANO, 2013).

As principais fontes antropogênicas do Cd no ar são as fundições de metais não ferrosos e usos do carvão em combustão. A concentração de Cd no ar depende da população e do grau de urbanização da região: quanto maior a urbanização maior é a concentração de cádmio. Esta concentração foi geralmente estimada como muito baixa e

pode variar de 0,1 a 5,0 ng/m³ nas zonas rurais, 2,0-15,0 ng/m³ em áreas urbanas e 15,0-150,0 ng/m³ em áreas industriais (WHO, 2000; OCDE, 1994). Nas áreas urbanas, o nível de Cd pode estar mais elevado devido às várias atividades de transporte e atividades de combustão.

O Cd é amplamente utilizado para revestimento de materiais, em pigmento de tintas e na indústria plástica, podendo ser adicionado ao solo por meio do lixo urbano ou industrial, lodo de esgoto e fertilizantes fosfatados (DIAS, 2001). Além disso, 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, 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 é particularmente susceptível à exposição ao Cd no período perinatal (PICOLI, 2004).

O Cd não apresenta função essencial ao organismo humano, animal, e ao metabolismo de plantas (AMDUR, 1996). 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. Adicionalmente, o seu caráter persistente e a sua conseqüente acumulação nos organismos conferem-lhe um significado ecológico importante (ALAZEMI et al., 1996). Este risco em potencial suscitou 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 (ALAZEMI et al., 1996).

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 é transportado após a absorção, através do sangue, ligado à albumina na maioria dos animais podendo entrar em células eucarióticas ligado a proteínas

transportadoras de zinco, ZIP, e presumivelmente é transportado para dentro das células endoteliais nos vasos do testículo como carona oportunista pela ZIP8, resultando num aumento da acumulação celular e toxicidade neste órgão (DALTON et al., 2005). Outra forma do Cd entrar nas células é usando um cotransportador de metal bivalente Fe^{2+}/H^+ e transportadores como bombas de fluxo (SU et al., 2011).

Ao chegar ao fígado o Cd induz a síntese de metalotioneína, a qual se liga. A metalotioneína é uma proteína citoplasmática de baixo peso molecular disponível no fígado, rim, intestino e pâncreas rica em resíduos de cisteína. Estes resíduos podem se ligar a metais pesados, especialmente a zinco e cádmio (CYR, 2001), através dos grupos tióis (WONG et al., 2010). Essas proteínas estão localizadas na membrana do aparelho de Golgi e protegem as células da citotoxicidade de metais pesados. Dessa maneira, grande quantidade de Cd 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 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).

Nos testículos, devido ao fato das células germinativas neste órgão estarem em constante processo de divisão e diferenciação, há maior suscetibilidade a substâncias tóxicas (YANO & DOLDER, 2002). A dose mínima de Cd necessária para causar danos em testículos de ratos foi relatada por GUNN et al. (1968), sendo de 0,44 mg/kg de peso do animal. 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) e degeneração de túbulos seminíferos (CUPERTINO, 2012). Estudos *in vitro* demonstram que o cádmio também afeta a viabilidade de células de Leydig, reduzindo a produção de testosterona (YANG et al., 2003).

Embora seja sabido que o Cd causa efeitos adversos nos órgãos reprodutores de ratos machos, poucos estudos têm quantificado alterações causadas pelo uso de suas baixas doses. O que se sabe é que uma dose baixa de 1,1 mg/Kg de peso do animal causa ligeiras alterações morfológicas testiculares (CUPERTINO, 2012) e uma dose mais elevada de 1,8 mg/Kg de peso do animal provoca redução significativa no peso dos testículos e epidídimos, índice gonadossomático e comprimento de túbulos seminíferos após 7 e 56 dias de exposição (CUPERTINO, 2012). O cádmio pode reduzir significativamente o diâmetro dos túbulos seminíferos após 56 dias de tratamento. Após 7 dias, os lumens dos túbulos podem encontrar-se preenchidos com células germinativas degeneradas e multinucleadas, agregados de espermátides, além de vacuolização do epitélio seminífero. Pode ser notada também a diminuição na altura do epitélio seminífero e ausência de espermatozoides. (PREDES, 2010; CUPERTINO, 2012).

HUANG et al. (2005), investigando os efeitos protetores da vitamina E contra o Cd administrado por via subcutânea (2 mg / kg / de CdCl₂, duas vezes por semana durante três meses em ratos), mostraram degenerações de células epiteliais, necrose e apoptose, no ducto do epidídimo, causadas por Cd observando também decréscimo de proporção tubular acompanhado pelo espessamento da altura do epitélio e diminuição do lúmen no ducto.

2.3 Chumbo

O chumbo (Pb), um constituinte natural da crosta terrestre, é um metal maleável e dúctil, que funde aos 327°C (LAUWERYS, 1994). Apresenta cor azul-acinzentada, peso molecular de 207,2 g/mol e densidade de 11,34 g/cm³ aos 20°C. Este metal combina-se com outros elementos originando compostos ou sais de chumbo (ATSDR, 1999), como é o caso do cloreto de chumbo (PbCl₂). Devido à sua resistência à corrosão, o Pb é um dos metais mais estáveis (ATSDR, 1999).

O Pb foi um dos primeiros metais a ser manipulado pelo homem por possuir características como baixo ponto de fusão, durabilidade, ductibilidade e facilidade em formar ligas metálicas (SHEETS, 1998). É encontrado na natureza tanto no estado livre como em associação com outros elementos químicos (PAOLIELLO & CHASIN, 2001; ASTDR, 1999). As maiores fontes naturais de chumbo são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas (WHO, 1995). Dentre as fontes antropogênicas encontram-se as fábricas de baterias de automóveis, as ligas metálicas,

os pigmentos de tinta, as munições, a mineração, e a fundição (ATSDR, 1999; GOYER et al., 2001). Além disso, os sais de chumbo podem aparecer como constituintes de vitrificados, esmaltes e vidros (ATSDR, 1999). Embora os processos naturais e antropogênicos sejam responsáveis pela liberação de Pb no ambiente, a contaminação antropogênica é predominante (ATSDR, 1999).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o Pb como um dos elementos químicos mais perigosos à saúde humana (WHO, 1999). A legislação brasileira, por meio da Norma Regulamentadora NR-7 (Portaria nº 24 de 29/12/94), estabelece que a concentração máxima aceitável de chumbo no sangue (Pb-S) é de até 40µg/dl e o limite de tolerância biológica de 60µg/dl (JACOB et al., 2002).

O Pb pode afetar uma série de sistemas orgânicos cujos efeitos são dependentes do nível e da duração da exposição (WHO, 1995). Este metal é extremamente tóxico para o sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), renal, hematopoiético e trato gastrointestinal. Pode afetar também o sistema cardiovascular, causar alterações endócrinas, imunológicas, danos reprodutivos e causar efeitos carcinogênicos e mutagênicos (WHO, 1995).

A absorção do Pb é determinada por sua espécie química, suas características físico-químicas e pela dose, frequência, duração e via de exposição, podendo ser influenciada por fatores como idade, sexo, estilo de vida, estado fisiológico e nutricional e ainda pela suscetibilidade individual do organismo exposto (WANG et al., 2008). Baixa ingestão de cálcio, ferro, fósforo e proteínas pode provocar aumento na absorção do Pb. Por outro lado, a vitamina C reduz a absorção do Pb, provavelmente por facilitar a absorção do ferro (LIU et al., 2008). Diferenças na absorção intestinal, metabolismo ósseo e o rápido desenvolvimento do sistema nervoso central, predispõem uma absorção do Pb cinco vezes maior nas crianças em relação aos adultos (LOCKITCH, 1993). Os adultos podem absorver de 5 a 15% de uma dose oral de Pb solúvel em água, enquanto crianças absorvem 42% (LIU et al., 2008).

Uma vez absorvido, o chumbo distribui-se no compartimento sanguíneo em duas formas: uma delas, não difusível, ligada aos eritrócitos e outra difusível no plasma. Aproximadamente 95% do metal encontram-se associados aos eritrócitos, seja na superfície externa de suas membranas ou no meio intracelular ligado a proteínas, como a ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) e a hemoglobina (SIMONS, 1993). Os 5% restantes podem ser encontrados no plasma, de forma livre ou associados à albumina, à α_2 globulina e a outros compostos de baixo peso molecular contendo

sulfidrilas (SH) (cisteína, hemocisteína e cisteamina) constituindo a fração potencialmente tóxica do metal, que é capaz de alcançar os órgãos e tecidos-alvo (AL-MODHEFER et al., 1991). A meia vida para o Pb no sangue é em torno de 36 dias (PAOLIELLO & CHASIN, 2001; KOSNET, 2003).

A partir do sangue o Pb distribui-se para os tecidos moles como cérebro, fígado, rim e testículo onde permanece, predominantemente, ligado a proteínas. Complexos formados pelo Pb e proteínas ácidas denominadas corpos de inclusão intranucleares podem ser observados em células do túbulo contorcido proximal de indivíduos que apresentam nefropatia induzida pelo metal (GONICK, 2008). A meia vida do chumbo nos tecidos moles é em torno de 40 dias (PAOLIELLO & CHASIN, 2001; KOSNET, 2003).

Posteriormente o Pb deposita-se nos ossos onde substitui o cálcio, já que os íons Pb^{2+} e Ca^{2+} são similares em tamanho (BAIRD, 2002). Em adultos contaminados com Pb, os ossos contêm cerca de 90% a 95% do conteúdo corpóreo total de chumbo, enquanto que 80% a 95% são encontrados em crianças (HU, 1998). O tecido ósseo constitui o principal sítio de estocagem de longo prazo, de onde o metal pode ser mobilizado, levando o organismo a uma exposição sistêmica continuada (SMITH et al., 1995; FLORA et al., 2011). A toxicidade do Pb pode ser atribuída, em parte, à sua capacidade para imitar o cálcio e substituí-lo em muitos processos celulares fundamentais dependentes de cálcio (FLORA et al., 2011). A meia vida do Pb nos ossos é em torno de 20 a 30 anos (PAOLIELLO & CHASIN, 2001; KOSNET, 2003).

O chumbo apresenta uma atividade gonadotóxica que pode induzir diferentes graus de alterações histopatológicas no parênquima testicular (SHAFAI et al., 2011; COSTA, 2013). A exposição ao chumbo está associada à diminuição do número de espermatozoides, motilidade e aumento de anormalidades morfológicas dos espermatozoides em animais (SOKOL, 1991) e humanas (ALEXANDER et al., 1996). HSU et al. (1998) demonstraram que a exposição ao chumbo pode diminuir a capacidade de defesa do espermatozoide ao estresse oxidativo e aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio, o que está negativamente associado com a fertilidade. Há crescentes evidências que cátions de metais de chumbo, bem como ferro e alumínio estimulam a formação de radicais livres (EMMERSON, 1973).

O estresse oxidativo induzido pelo Pb pode afetar a reprodução em homens e outros animais. De fato, um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi observado após exposição ao Pb, nos testículos e nos espermatozoides de

ratos (HSU et al., 1997; HSU et al., 1998; BATRA et al., 1998; ACHARYA et al., 2003; MARCHLEWICZ et al., 2007) e de humanos (SOLLIWAY et al., 1996; KASPERCZYK et al., 2008). Estas EROs induzidas pelo Pb foram associadas com a diminuição na contagem de espermatozoides (HSU et al., 1998; ACHARYA et al., 2003; KASPERCZYK et al., 2008), perda da mobilidade espermática (HSU et al., 1997; HSU et al., 1998; KASPERCZYK et al., 2008) e aumento de espermatozoides anormais (ACHARYA et al., 2003). O Pb pode alterar a atividade antioxidante das enzimas pela sua capacidade de se ligar aos grupos sulfidrilos, inibindo assim as suas funções normais (BATRA et al., 1998; HSU & GUO, 2002; SAINATH et al., 2011). Além disso, o Pb pode competir com alguns elementos-traço essenciais presentes nessas enzimas, substituindo-os e alterando sua atividade (HSU & GUO, 2002; FLORA et al., 2008). QUINLAN et al. (1988) observaram que mesmo quando íons de Pb não induzem a peroxidação, eles aceleraram a taxa de peroxidação por íons de ferro.

Disfunções reprodutivas como oligozoospermia e astenozoospermia têm sido descritas em homens expostos ao Pb no local de trabalho. NAHA & CHOWDHURY (2006) verificaram diminuição significativa na contagem de espermatozoides em trabalhadores expostos ao Pb quando comparados com os controles, não sendo encontradas diferenças nas concentrações hormonais, sugerindo um efeito tóxico direto deste metal na produção de espermatozoides ou no seu transporte. RODAMILANS et al. (1988) observaram os efeitos tóxicos do Pb diretamente sob o testículo seguido pelo distúrbio do hipotálamo ou hipófise após um longo período de exposição ao metal. Outros autores relataram hipogonadismo e diminuição nos níveis de testosterona sérica em trabalhadores em indústrias de fundição de chumbo (CULLEN et al., 1983). MCGREGOR et al. (1990), verificaram que o Pb pode causar danos aos túbulos seminíferos em concentrações maiores que 47µg/dl. Amostras de sangue e sêmen foram analisadas em trabalhadores de fábricas de baterias, mostrando relação inversa entre níveis de chumbo no plasma e o volume de sêmen e a concentração de espermatozoides. Outros autores também relataram diminuição da libido e aumento de anomalias no sêmen em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao chumbo (ELLIS & DESJARDINS, 1982).

MARCHLEWICZ et al. (2004), observando tecidos reprodutivos de ratos tratados com Pb, concluíram que o aumento na quimioluminescência causada pelo chumbo ocorre na seguinte ordem crescente dentro dos tecidos estudados: cauda do epidídimo < testículo < *caput* do epidídimo (19%, 39% e 51%, respectivamente).

MARCHLEWICZ et al. (2007), observaram que a peroxidação lipídica em homogenizados de cauda do epidídimo, em ratos controle, foi 35% maior do que na cabeça do epidídimo e 43% maior do que nos testículos e que a diferença da peroxidação lipídica entre os grupos tratados com acetato de chumbo e o grupo controle foi 162% na cabeça do epidídimo, 125% na cauda do epidídimo e 97% no testículo. A intensificação da peroxidação lipídica causada por Pb pode afetar a composição citoplasmática, mitocôndrias e membranas acrossomais. Sabe-se que a caminho da cauda do epidídimo o espermatozoide torna-se mais rico em ácidos graxos insaturados o que os torna mais sujeitos, portanto, aos danos causados em consequência das peroxidações (BATRA et al. 1998; AITKEN et al., 1999).

ALLOUCHE et al. (2009) constataram aumentos significativos nas frequências de espermatozoides anormais, na cabeça e cauda do epidídimo, em ratos tratados com 0,1% de acetato de chumbo em relação ao controle enquanto que anormalidades significativas foram encontradas no corpo do epidídimo, quando os animais foram expostos as maiores dosagens de Pb (0,3%).

Alguns autores mostraram a tendência do Pb em concentrar-se em glândulas sexuais acessórias no aparelho reprodutor do rato e a diminuição na massa da glândula não havendo, no entanto, perturbações perceptíveis no epidídimo em função do número de espermatozoides presentes no lúmen (THOREUX-MANLAY et al., 1995). BATRA et al. (2001) observaram alterações histológicas na membrana basal, desorganização e perda da estrutura do epitélio, vacuolização e hiperplasia de elementos de tecido conjuntivo em ratos após uma exposição de três meses ao chumbo (50mg/Kg de peso corporal).

GRAÇA et al. (2004) observaram os efeitos do cloreto de chumbo na histologia e ultraestrutura testicular e na densidade de espermatozoides na cauda dos epidídimos de ratos sexualmente maduros. Foram observadas a diminuição significativa do peso testicular, do diâmetro dos túbulos seminíferos e da contagem de espermatozoides, três dias depois do tratamento com cloreto de chumbo (74 mg/kg de peso corporal).

SILVA (2007), avaliando diversos parâmetros dos espermatozoides em grupos de ratos expostos ao Pb (150 mg/kg PbCl₂) no período de 6 dias, observou a diminuição significativa da hipoosmolaridade, verificando o aumento da percentagem de espermatozoides com membrana celular danificada.

Na fase inicial da intoxicação de ratos machos adultos por ingestão “ad libitum” de acetato de chumbo nas concentrações de 0,5g/l e 1,0g/l, durante 90 dias não foi

observado por KEMPINAS et al. 1988, alterações no diâmetro dos túbulos seminíferos, na altura do epitélio germinativo, na produção do espermatozoide e também não apresentou qualquer alteração estrutural na cabeça do epidídimo. Por outro lado, a cauda do epidídimo exibiu aumento significativo no diâmetro do duto e diminuição na altura do epitélio.

2.4 Zinco

O zinco (Zn) é um dos elementos mais comuns na Terra e pode ser encontrado no ar, no solo, na água estando naturalmente presente nos alimentos (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

O Zn é um metal de transição interna, apresentando número atômico 30, massa molar 65,392 g/mol, temperatura de fusão de 419,5°C e de ebulição de 907°C e densidade 7,14 g/mL. Além disso, ele apresenta cinco isótopos de ocorrência natural: ^{64}Zn – 48,6%; ^{66}Zn – 27,9%; ^{67}Zn – 4,1%; ^{68}Zn – 18,8%; e ^{70}Zn – 0,6% (MEDEIROS, 2011).

Em 2008, a produção mundial de Zn metálico foi superior a 11,5 milhões de toneladas (NEVES, 2011). Os principais países produtores e consumidores de Zn metálico estão no continente asiático (57,4%), entre eles, China (responsável por 34,9% do consumo mundial), Japão (4,9%), Coreia do Sul (4,5%) e Índia (4,2%). Os Estados Unidos, por exemplo, consumiu apenas 8,6% da produção mundial, e o Brasil, 2,1% (NEVES, 2011).

O Zn é utilizado na metalurgia (fundição e refinação), na produção de óxido de zinco, borrachas, herbicidas e inseticidas, na fabricação de baterias, tintas, cerâmica, cosméticos, fertilizantes, em indústrias gráficas (foto-impressão), no tingimento de tecidos, na preservação de madeiras e na indústria de medicamentos. Grandes quantidades de Zn entram no ambiente como resultado de atividades antropogênicas, como a mineração, purificação do zinco, cádmio e chumbo, produção de aço e queima de carvão e lixo. O lixo de indústrias químicas que utilizam o Zn, os esgotos domésticos e as correntes de água pluvial podem transportar este metal e contaminar o ambiente aquático (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

A aplicação mais importante do Zn (cerca de 50%) no Brasil e no mundo é vinculada à produção do aço – revestimento da superfície deste para a proteção contra a corrosão – particularmente, no preparo de materiais galvanizados tendo a indústria

automobilística e construção civil como as principais consumidoras do produto (ICZ, 2012).

O Zn é essencial no metabolismo subcelular, pois é um componente essencial do sítio catalítico de pelo menos uma enzima em cada uma das seis classificações enzimáticas: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (KIELING, 2002). O Zn é relativamente não tóxico em mamífero, a julgar por sua tolerância em cargas alimentares superiores a 100 vezes o mínimo recomendado de requerimento diário para humanos (CHOUDHURY et al., 2005). Esse elemento geralmente se complexa com aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos e tem afinidade com grupos tióis e hidrogênio (MCCALL et al., 2000).

Os produtos de origem animal são, geralmente, as fontes dietéticas mais importantes de Zn, quanto ao conteúdo e biodisponibilidade (SENA & PEDROSA, 2005). Fatores dietéticos, intraluminais e sistêmicos influenciam a absorção e o transporte celular de zinco (ANTUNES, 2010). Dentre esses fatores são citados a forma química do elemento na dieta, a interação mineral-mineral, taninos, oxalatos, fitatos, catabolismo, hormônios, infecções e estresse (MARCOS, 2008).

A absorção inicial do Zn ocorre no estômago onde, apesar de ser muito reduzida, ocorre de modo relativamente rápido, cerca de 15 minutos após a ingestão (COUSINS & MCMAHONH, 2000). O principal local de absorção é a segunda parte do duodeno, podendo ocorrer por difusão passiva, quando há grandes quantidades no lúmen, ou por processos mediados por carreadores, quando há menor concentração. Uma vez no citosol, o Zn é complexado com metalotioneína citoplasmática possibilitando o seu uso pelo enterócito ou sua passagem para a circulação portal, sendo transportado pela albumina (SALGUEIRO et al., 2000; COZZOLINO, 2005; FISBERG et al., 2008).

Em órgãos como o pâncreas, os rins e o baço, o Zn possui meia-vida de 12,5 dias, enquanto no cérebro e nos ossos a renovação é mais lenta, em torno de 300 dias. Dessa forma, acredita-se que o Zn não é bioacumulado em mamíferos (COZZOLINO, 2005; FISBERG et al., 2008).

A homeostase do Zn em mamíferos é regulada pelo controle da absorção e da perda exógena do Zn no intestino, como também através da excreção pelo pâncreas e pelo fígado (COZZOLINO, 2005). Entretanto em ratos, esse controle é feito via secreção de Zn a partir do intestino e não pela regulação da absorção de Zn (ELINDER & FRIBERG, 1986). A excreção fecal é a via predominante de eliminação de zinco.

Aproximadamente 70-80% da dose ingerida é excretada pelas fezes e somente 1-2% é excretada na urina (WASTNEY et al., 1986).

Embora a albumina seja a principal transportadora de Zn no plasma, algumas proteínas do plasma e aminoácidos livres podem influenciar na sua liberação para as células (YU et al., 2007). A metalotioneína e a CRIP (proteína intestinal rica em cisteína) ligam-se ao Zn no intestino, na função de carreadora intracelular, aumentando a velocidade de absorção (VALLE & FALCHUK, 1993).

O Zn está envolvido na estabilização de membranas celulares e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica (MERRELLS et al., 2009). As propriedades antioxidantes do Zn são justificadas: pelo seu papel na regulação da síntese da metalotioneína, na estrutura da enzima superóxido dismutase e na proteção de grupamentos sulfidríla de proteínas de membranas celulares, onde promove a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio por antagonismo com metais pró-oxidantes, como ferro e cobre (POWELL, 2000; KOURY & DONANGELO, 2003).

Apesar das recomendações de ingestão de Zn estarem bem estabelecidas, ainda existem muitas dificuldades para a investigação do estado nutricional em humanos relativo ao Zn, pois não há um marcador bioquímico específico e sensível para esta avaliação (FISBERG et al., 2008). Os valores de exposição que foram considerados na determinação da dose de referência sugerem que existe o mínimo de Zn para manter a função fisiológica (5,5 mg/dia) e a dose que gera efeitos potencialmente negativos (60 mg/dia) (CANTILLI et al., 1994).

O Zn é um elemento essencial para a fertilidade de machos de mamíferos (MERRELLS et al., 2009), com participação ativa na síntese do DNA, no metabolismo dos ácidos nucléicos e de proteínas. As células em rápido processo de divisão, crescimento ou síntese são particularmente afetadas pela deficiência deste elemento, como ocorre nos processos reprodutivos em mamíferos. Em humanos, o Zn é necessário para a formação e maturação de espermatozoides, na ovulação e para a fertilização. Sabe-se que o Zn em baixas concentrações, participa do processo da espermatogênese, ao ser incorporado no flagelo das espermátides alongadas, se mantendo neste local também nos espermatozoides. No entanto, quando em altas concentrações, o Zn inibe a multiplicação de células germinativas e causa fragmentação da membrana celular e envoltório nuclear (FRANÇA et al., 2005). Com relação ao metabolismo androgênico, o Zn parece ser um modulador da atividade da enzima 5 α redutase, responsável pela conversão da testosterona em diidrotestosterona (OLIVEIRA et al., 2007). FAHIM et al.

(1993) mostraram que o zinco, quando em altas concentrações, inibe a ligação da testosterona a 5 α redutase, acarretando diminuição da concentração do hormônio diidrotestosterona. Para o epidídimo, menor concentração de diidrotestosterona pode representar uma alteração na sua função, já que é um órgão andrógeno-dependente (FRANÇA et al., 2005).

Várias enzimas envolvidas na síntese de DNA são dependentes de Zn, sendo a etapa de duplicação do DNA importante para desenvolvimento das células germinativas, pois nas divisões celulares, tanto as mitóticas, na fase proliferativa, quanto às divisões meióticas, na etapa reducional e equacional dependem de uma duplicação prévia do DNA na interfase (KERR et al., 2006). O zinco apresenta propriedades anti-apoptóticas, primeiramente inibindo as caspases e, depois, suprimindo o cálcio e o magnésio das endonucleases que causariam a fragmentação do DNA (CHIMIANTI et al., 2003). O Zn pode, também, evitar a oxidação dos compostos ligando-se a grupos sulfidríl em proteínas e ocupando sítios de ligação de ferro e cobre em lipídios, proteínas e DNA (ZAGO & OTEIZA, 2001). Deficiências em qualquer um dos micronutrientes essenciais tem impacto em todos os componentes da fertilidade. A deficiência de Zn promove a diminuição da libido e da qualidade do sêmen, enquanto a suplementação evita danos à membrana plasmática do espermatozóide, melhorando assim os parâmetros de fertilidade do sêmen (BLOMFIELD, 2010).

A manutenção do microambiente epididimário pode ser alterada com o excesso de Zn no organismo. SINGH et al. (1996), ao injetarem por via intraperitoneal cloridrato de Zn nas doses de 7,5 e 15mg/kg de peso corporal em camundongos por cinco dias consecutivos, observaram danos ao epitélio epididimário nos animais do tratamento de maior dose. Lesões teciduais podem causar a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem contribuir negativamente com o microambiente epididimário, alterando os processos de maturação espermática, promovendo peroxidação lipídica de seus ácidos graxos de membrana, o que é uma das principais causas de esterilidade masculina (OLIVA et al., 2009).

2.5 Epidídimo

O epidídimo é um tubo único altamente enovelado, que mede de 4 a 6 m de comprimento em homens adultos e que se forma a partir da fusão de 10 a 20 dutos eferentes oriundos da rede testicular. Juntamente com o tecido conjuntivo circunvizinho e vasos sanguíneos, esse duto é normalmente dividido em quatro regiões anatômicas: o

segmento inicial, cabeça (*caput*), corpo e cauda, tal como descrito pela primeira vez por BENOIT (1926).

Em todas as espécies de mamíferos examinadas, todas as regiões do epidídimo são organizadas em lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo. Estes septos servem como suporte interno e proporcionam a separação funcional entre lóbulos (TURNER, 2003). A extensão do epidídimo é um tubo reto, o canal deferente, que está rodeado por uma espessa camada muscular. O canal deferente conecta com a uretra, que desemboca para o lado de fora do corpo.

O epitélio epididimário apresenta seis tipos celulares, células principais, células apicais, células basais, células halo, células claras e células estreitas que apresentam variadas funções (ROBAIRE, 2006). Algumas células estão localizadas ao longo do ducto (por exemplo, células principais), enquanto outras se encontram tanto exclusiva ou principalmente em regiões específicas (por exemplo, células estreitas no segmento inicial e zona intermediária). É formado por um epitélio colunar pseudoestratificado. A superfície das células principais é coberta por longos e ramificados microvilos, chamados estereocílios (ROBAIRE, 2006)

Células principais – É referida como o principal tipo de célula no epidídimo de todos os mamíferos. Estas células aparecem ao longo do ducto inteiro, mas mostram diferenças estruturais em cada região (HAMILTON, 1975). As características mais marcante destas células são a sua capacidade secretória, suas estruturas especializadas em endocitose, e seus núcleos basalmente alinhados. Dependendo do segmento examinado, as células principais compreendem aproximadamente 65% a 80% do total da população de células epiteliais do epidídimo (TRASLER *et al*, 1988). Tanto a sua estrutura e as funções variam drasticamente entre os segmentos diferentes (OLIVA *et al.*, 2009). Alterações morfológicas em células principais sugerem que estas células são particularmente sensíveis a níveis de androgênio, em contraste com os outros tipos de células epiteliais, que parecem ser menos afetadas por orquiectomia (MOORE & BEDFORD, 1979). A função secretora das células principais fica comprometida no estado de privação androgênica.

Células Apicais - São encontradas principalmente no epitélio do segmento inicial e na zona intermédia (SUN & FLICKINGER, 1980; ADAMALI & HERMO, 1996.), embora tenham sido vistas ocasionalmente em outros segmentos de ratos mais velhos (SERRE & ROBAIRE, 1998). Estas células são localizadas apicalmente no epitélio epididimário e possuem núcleo esférico. Elas diferem claramente da célula

estreita e principal na expressão de proteínas (ADAMALI & HERMO, 1996). No entanto, pouco se sabe sobre as funções específicas destas células além da sua capacidade de endocitose de substâncias a partir do lúmen, como revelado pelo exame de β -hexosaminidase A em camundongos (ADAMALI *et al.*, 1999.) e a observação de que eles contêm muitas enzimas proteolíticas (ADAMALI & HERMO, 1996).

Células Estreitas - No epidídimo de ratos adultos, estas células, aparecem no epitélio do segmento inicial e na zona intermédia (SUN & FLICKINGER, 1980; ADAMALI & HERMO, 1996). São mais estreitas do que as células principais, e enviam um fino processo de membrana plasmática para atingir a membrana basal. São caracterizados por localização apical no epitélio epididimário e possuem um formato de taça, possuem inúmeras vesículas que estão envolvidas na endocitose e na função secretora de H^+ para o lúmen a partir da membrana plasmática apical (HERMO & ADAMALI, 2000). Células estreitas são distintas das células apicais nos seu aspecto morfológico, na distribuição relativa, e na expressão de proteínas tais como a glutathione S-transferases e enzimas lisossomais (ADAMALI & HERMO, 1996).

Células Claras - Células claras são grandes, endocíticas, se apresentam na cabeça, corpo, e nas regiões da cauda do epidídimo e são encontrados em muitas espécies, incluindo humanos (ROBAIRE & HERMO 1988). O núcleo se encontra na região basal destas células e seu citoplasma contém uma quantidade variável de gotículas lipídicas. A atividade endocítica dessa célula é muito maior do que nas células adjacentes principais, particularmente na cauda epididimária (HERMO *et al.*, 1988).

Células Basais - As células basais aparecem em todas as espécies estudadas, nas regiões do corpo e cauda do epidídimo na base do epitélio (ROBAIRE & HERMO 1988). A defesa imunológica, fagocitose e produção de antioxidantes para a defesa contra as espécies reativas de oxigênio são realizadas pela célula basal. São células com núcleo alongado ou esférico com cromatina condensada, cujo prolongamento alcança a região apical e é visível apenas em microscópios confocais e eletrônicos (FRANÇA *et al.*, 2005; OLIVA *et al.*, 2009). LEUNG *et al.* 2004, propuseram uma função adicional para células basal, sugerem que estas células possam ter um papel na regulação do transporte de eletrólitos e água para células principais. Este processo é mediado pela formação local de prostaglandinas (PGs) e requer a participação do receptor protéico de potencial transiente (Trp). Este último serve como via transmembrana de influxo de Ca^{2+} , ao passo que a ciclooxigenase-1 (COX-1) é uma enzima chave na formação de PGs. Ambas as proteínas são exclusivamente expressos em células basais.

Células Halo - São pequenas células com uma estreita faixa clara no citoplasma e estão presentes em todo o epitélio do epidídimo (ROBAIRE & HERMO, 1988), apresentam núcleo com cromatina condensada pouco citoplasma com um halo claro. Estas células estão normalmente localizadas na base do epitélio. As células halo foram descritas como linfócitos T auxiliares e citotóxicos (FLICKINGER et al., 1997; SERRE & ROBAIRE, 1999) ou monócitos (HAMILTON, 1972), estes dois tipos de células são difíceis de distinguir por microscopia de luz por causa da sua semelhança em tamanho e morfologia nuclear. Portanto, a função de defesa é realizada também por estas células que são consideradas como células do sistema imune que transitam no epitélio epididimário.

Funções do Epidídimo - As quatro principais funções do epidídimo são transporte de espermatozoides, desenvolvimento da motilidade do espermatozoide, capacitação dos espermatozoides e a criação de um ambiente luminal especializado no processo de maturação, através das atividades de absorção e secreção do epitélio epididimal. Uma vez liberado no lúmen dos túbulos seminíferos, os espermatozoides são transportados através dos dutos eferentes e começam a sua jornada no epidídimo. O tempo mínimo necessário para a passagem dos espermatozoides através dos segmentos do epidídimo, calculado a partir da relação entre as reservas de espermatozoides do epidídimo e a produção espermática testicular (ORGBIN-CRIST, 1962), independentemente do tamanho do animal, da produção de espermatozoides, ou das reservas de espermatozoides do epidídimo, é de aproximadamente 10 dias.

Espermatozoides entram no epidídimo impulsionados pelo fluido testicular e pela movimento dos cílios das células ciliadas nos dutos eferentes e o transporte é efetuado contra um gradiente crescente de pressão hidrostática do testículo para a cauda do epidídimo (JOHNSON & HOWARDS, 1975). Devido ao fato do epidídimo estar rodeado por uma camada de músculo liso de espessura crescente e possuir inervação adrenérgica da região proximal até as regiões mais distais (BAUMGARTEN et al., 1971), o mecanismo responsável por dirigir os conteúdos através do lúmen do epidídimo em repouso tem sido atribuído às contrações rítmicas dessa musculatura que circunda o túbulo epididimal (TALO et al., 1979; JAAKKOLA, 1983) e controlada por atividade elétrica.

A contratilidade do túbulo epididimal é influenciada por diversos fatores hormonais e neuronais. Os andrógenos controlam a contratilidade do túbulo epididimal para assegurar uma taxa ótima de transporte de espermatozoides (SUJARIT &

PHOLPRAMOOL, 1985) enquanto que o estrogênio, por outro lado, acelera drasticamente o transporte de espermatozoides em ratos (MEISTRICH et al., 1975). Peptídeos neuro-hipofisários, tais como a oxitocina e vasopressina, mediados por receptores presentes no epidídimo (WHITTINGTON et al., 2001; FILIPPI et al., 2002;), também aumentam a contratilidade do epidídimo, tanto *in vitro* (HIB, 1974; STUDDARD et al., 2002) e *in vivo* (MELIN, 1970; JAAKKOLA & TALO, 1981). Em várias espécies, incluindo humanos (FILIPPI et al., 2002), isto resulta num aumento do número de espermatozoides ejaculados transportado através do epidídimo (KNIGHT, 1974; KIHLSSTROM e MELIN, 1963; NICHOLSON et al., 1999). O efeito da oxitocina sobre a motilidade do epidídimo é regulado por estrogênios, em parte por uma regulação positiva da expressão proteica do gene do receptor de oxitocina (FILIPPI et al., 2002). Isto pode explicar o transporte acelerado dos espermatozoides induzido por estrogênio (MEISTRICH et al., 1975), e sugere uma interação entre esteroides e hormônios neuro-hipofisários na regulação da contração do epidídimo. A contração do túbulo epididimal também é influenciada por prostaglandinas (PGs) (HIB & OSCAR, 1978; COSENTINO et al., 1984). A prostaglandina F2 (PGF2) aumenta a frequência e amplitude das contrações no epidídimo proximal *in vitro*, ao passo que a PGE2 diminui estas contrações (COSENTINO et al., 1984). Os níveis endógenos de PGs são consistentes com a sua regulação da contratilidade basal do epidídimo proximal (COSENTINO et al., 1984). A remoção cirúrgica do gânglio mesentérico inferior, que fornece inervação simpática para a cauda do epidídimo, é suficiente para diminuir o transporte de espermatozoides através do epidídimo (RICKER & CHANG, 1996), confirmando a regulação neuronal na contratilidade do epidídimo e no transporte dos espermatozoides.

Maturação e capacitação - Nos vertebrados superiores, os espermatozoides tornam-se funcionalmente maduros à medida que passam através do epidídimo. Em todas as espécies examinadas até agora, um gradiente de potencial de fertilização de espermatozoides é observado com a travessia do epidídimo. Os primeiros estudos com coelhos (NISHIKAWA & WAIDE, 1952; ORGEBIN-CRIST, 1967;), ratos (PAZ, et al., 1978), e carneiros (FOURNIER-DELPECH et al., 1979; FOURNIER-DELPECH, et al., 1981) mostraram que espermatozoides ganham a capacidade de fertilizar o ovócito, somente após o trânsito através do epidídimo. Estudos indicam que há uma maturação progressiva na capacidade de fertilização de espermatozoides no epidídimo. Estudos comparando resultados da fertilização de espermatozoides retirados do testículo, do epidídimo e do ejaculado, resultaram em taxas de fertilização significativamente

menores com espermatozoides retirados do testículo (53,4%) do epidídimo (58,5%) ou espermatozoides do ejaculado (64,8%) (VAN STEIRTEGHEM et al., 1998).

Além da capacidade de motilidade progressiva, os espermatozoides do epidídimo desenvolvem a capacidade de sofrer a reação acrossômica como já observado em camundongos (LAKOSKI, 1988), macacos (YEUNG et al., 1996) e humanos (YEUNG et al., 1997), reconhecer e se ligar à zona pelúcida como em camundongos (SALING, 1982), suínos (BURKIN & MILLER, 2000), e finalmente se fundir com a membrana vitelínica.

Juntamente com estas alterações funcionais, os espermatozoides sofrem também alterações estruturais durante o trânsito epididimário: migração da gota citoplasmática ao longo do flagelo, modificações no acrossoma, mudanças na cromatina e algumas organelas na cauda, e ainda mudanças na membrana plasmática (BEDFORD, 1973; BEDFORD, 2004). Coletivamente, estas alterações sustentam a maturação funcional e subsequente armazenamento de espermatozoides no epidídimo.

Enquanto algumas alterações maturacionais, como a motilidade, podem ser intrínsecas ao espermatozoide e se desenvolvem ao longo do tempo, outras, como a capacidade de interagir com o óvulo, são dependentes do ambiente epididimal, pois após hipofisectomia ou castração, a maturação dos espermatozoides ocorreram apenas quando androgênios foram administrados *in vivo* ou incluído no meio de cultura (DYSON & ORGEBIN-CRIST, 1973; ORGEBIN-CRIST, 1973) comprovando que a maturação é condicionada por androgênios testiculares no ambiente epididimal.

Em hamsters, ratos e humanos, cocultura de espermatozoides imaturos da cabeça e corpo do epidídimo com células da cauda não só aumentaram a sua motilidade (ORGEBIN-CRIST, 1973; MOORE & HARTMAN, 1986;), como aumentaram também a sua capacidade de se ligar a zona pelúcida (ORGEBIN-CRIST, 1973) para fertilizar (MOORE & HARTMAN, 1986; BONGSO & TROUNSON, 1996) e para suportar o desenvolvimento de embriões (BONGSO & TROUNSON, 1996). Estas mudanças maturacionais são promovidas por fatores androgênico-dependentes de células principais do epidídimo porque coculturas mantidas na ausência de androgênios não conseguem induzir a maturação (MOORE et al., 1992; BONGSO & TROUNSON, 1996;). A evidência esmagadora de todos estes estudos experimentais, tanto *in vivo* como *in vitro*, é que a fase final do processo de maturação do espermatozoide, em todas as espécies de mamíferos estudadas, incluindo humanos, depende do epidídimo.

O principal local de armazenamento de espermatozoides em mamíferos é a cauda epididimária. Os espermatozoides podem ser armazenados neste local, por períodos que se estendem além de 30 dias (ORGEBIN-CRIST, 1975). Espermatozoides de morcegos podem ser armazenados durante muitos meses e manterem a sua função (GOPALAKRISHNA & BHATIA, 1980). Com base em estudos em diversas espécies de mamíferos, notou-se que 50 a 80% de espermatozoides presentes nas vias condutoras foram encontrados na cauda epididimária e que aproximadamente 50% desses espermatozoides estavam disponíveis para a ejaculação (AMANN, 1981).

Muitas diferenças têm sido descritas na composição luminal de íons, moléculas orgânicas pequenas, proteínas e glicoproteínas entre a cauda e o resto do epidídimo. As condições especiais que permitem o armazenamento de espermatozoides em um estado de repouso por longos períodos neste local não foram ainda elucidadas, embora as alterações do pH (CARR, 1985) em várias espécies e presença de imobilina no rato e hamster (USSELMAN & CONE, 1983; CARR, 1985) têm sido propostos como fatores importantes.

Embora esteja claro que a função principal dos segmentos distais do epidídimo seja armazenar espermatozoides maduros e vivos, outras funções têm sido atribuídas a este local. Espermatozoides mortos ou de aparência anormal têm sido muitas vezes vistos na cauda epididimária (COOPER & HAMILTON, 1977; WEISSENBERG et al., 1995). A capacidade de reconhecer esses espermatozoides e, em seguida, desenvolver um mecanismo para neutralizá-los ou destruí-los, foi proposta recentemente (WEISSENBERG et al., 1995).

Além de depender da presença da circulação de andrógenos, o epidídimo também depende da presença de fatores do fluido luminal originários dos testículos e do próprio epidídimo. Sem fatores do fluido luminal testicular, muitas células do segmento inicial entram em apoptose em 24 horas (NICANDER et al., 1993; FAN & ROBAIRE, 1998; TURNER & RILEY, 1999;). Assim, foi postulado que um fator ou fatores provenientes do testículo são responsáveis por manter a integridade e sobrevivência das células no segmento inicial e que a regulação parácrina pode ocorrer, não só entre o testículo e epidídimo, mas entre as regiões do epidídimo, incluindo os vasos deferentes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

No presente estudo pretendeu-se avaliar os efeitos crônicos de diferentes doses de metais pesados (cádmio, chumbo e zinco) na morfometria nos diferentes segmentos do epidídimo.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Analisar o diâmetro tubular (DT), diâmetro luminal (DL) e altura de epitélio (EP) de cada segmento do epidídimo sob o efeito das diferentes dosagens de chumbo, cádmio e zinco.

3.2.2 Analisar a proporção volumétrica do epitélio (E), tecido conjuntivo (TC), lúmen com espermatozoide (LcE), lúmen sem espermatozoide (LsE), de cada segmento do epidídimo sob o efeito das diferentes dosagens de chumbo, cádmio e zinco.

1. Referências Bibliográficas

ACHARYA, U. R.; RATHORE, R. M.; MISHRA, M. Role of vitamin C on lead acetate induced spermatogenesis in Swiss mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, p. 9-14, 2003.

ADAMALI, H. I.; HERMO, L. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J. Androl.* 17, p. 208-222, 1996.

ADAMALI, H. I.; SOMANI, I. H.; HUANG, J. Q.; MAHURAN, D.; GRAVEL, R. A.; TRASLER, J. M.; HERMO, L. I. Abnormalities in cells of the testis, efferent ducts, and epididymis in juvenile and adult mice with beta-hexosaminidase A and B deficiency. *J. Androl.* 20, p. 779-802, 1999.

AITKEN, R. J.; WEST, K. M. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on percoll gradients. *J. Androl.*, 13, p. 433-451, 1990.

ALAZEMI, B.M.; LEWIS, J.W.; ANDREWS, E. B. Gill Damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environ. Technol.* 17, p. 225-238, 1996.

ALEXANDER B. H.; CHECKOWAY H.; VAN NETTEN C.; MULLER C. H.; EWERS T.; KAUFMAN J. D.; MUELLER B. A.; VAUGHAN T. L.; FAUSTMAN E.

M. Semen quality of men employed at a lead smelter. *J. Occup. Environ. Med.* 53, p. 411–6, 1996.

ALLOUCHE, L.; HAMADOUCHE, M.; TOUABTI, A. Chronic effects of low lead levels on sperm quality, gonadotropins and testosterone in albino rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61 p. 503–510, 2009

AL-MODHEFER, A. J. A.; BRADBURY, M. W. B.; SIMMONS, T. J. B. Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. *Clin. Sci.* 81, p. 823-829, 1991.

AMANN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.* 2, p. 37–58, 1981.

AMDUR, M.O.; KLAANEN, J. C. D. Casarett and Doll's Toxicology: the basic science of poison, Pergamon Press, New York, 4 ed. 1996.

ANTUNES, M. F. R. Interação competitiva do zinco e ferro após a administração oral e venosa de zinco em crianças autróficas. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). UFV, Viçosa, 2010.

APOSTOLI, P.; CATALANI, S. Metal ions affecting reproduction and development. *Met. Ions Life Sci.* 8, p. 263-303, 2011.

ATSDR. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Dep. de Saúde e Serviços Humanos, 1999.

AZEVEDO, F. A; CHASIN, A. A. M. Metais: gerenciamento da toxicidade. Atheneu, 1, p. 7, 2003.

BAIRD, C. Metais pesados tóxicos. In: *Química Ambiental*. São Paulo: Bookman, p. 403-439, 2002.

BATRA, N.; NEHRU, B.; BANSAL, M. P.. The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. *Reprod. Toxicol.* 12, p. 535-540, 1998.

BATRA, N.; NEHRU, B.; BANSAL, M. P. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'. *J. Appl. Toxicol.* 21, p. 507-512, 2001.

BAUMGARTEN, H. G.; HOLSTEIN, A. F.; ROSENGREN, E. Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli

efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 120, p. 37–79, 1971.

BEDFORD, J. M. Components of sperm maturation in the human epididymis. *Adv. Biosci.* 10, p. 145–155, 1973.

BEDFORD, J. M. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol. Rev.* 79, p. 429–460, 2004.

BENOIT, J. Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* (Strasb). 5, p. 173–412. 1926.

BEVERIDGE, T.J.; HUGLES, M.N.; LEE, H.; LEUNG, K.T.; POOLE, R.K.; SAVIVAIDIS, I.; SILVER, S., TREVORS, J.T. Metal microbe interactions: contemporary approaches. *Adv. Microbiol. Phy.* 38, p. 177-243, 1997.

BIZARRO, P.; ACEVEDO, S.; NIÑO-CABRERA, G.; MUSSALI-GALANTE, P.; PASOS, F.; AVILA-COSTA, M. R.; FORTOUL, T. I. Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reprod. Toxicol.* 17, p. 561-566, 2003.

BLOMFIELD, J.A. Evaluation of dietary supplementation with antioxidants on fertility parameters in stallions. Thesis (Master of Science in Biological Science). The University Waikato, 2010.

BONGSO, A.; TROUNSON, A. Evaluation of motility, fertilizing ability and embryonic development of murine epididymal sperm after coculture with epididymal epithelium. *Hum. Reprod.* 11, p. 1451–1456, 1996.

BURATINI, V. B.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. 2006. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. Rima São Carlos,, p. 478, .2006

BURKIN, H., MILLER, D. J. Zona pellucida protein binding ability of porcine sperm during epididymal maturation and the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 222, p. 99–109, 2000.

CANTILLI, R.; ABERNATHY, C. O.; DONOHUE, J. Derivation of the reference dose for zinc. In: Mertz, W., Abernaty, C. O. Olin, S. Eds *Risk assessment of essential elements* Washington DC: ILSI Press, p. 113-125, 1994.

CARR, D. W. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Reprod. Biol.* 33, p. 588–595, 1985.

CHIMIANTI F.; AOUFFEN, M.; FAVIER; SEVE, M. Zinc homeostasis regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Curr. Drug Targets* 4, p. 323-338, 2003.

CHOUHDURY, H.; STEDEORD, D.; DONOHUE, J.; INGERMAN, L.; OSIER, M.; FRANSEN, M.; MaC

COOPER, T. G., HAMILTON, D. W. Observations on destruction of spermatozoa in the caudaepididymidis and proximal vas deferens of non-seasonal male mammals. *Am. J. Anat.* 149, p. 93–110, 1977.

COOPER, R. L.; KAVLOCK R. J. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of evidence overview. *J. Endocrinol.* 152, p. 159-166, 1997.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Cinética da Espermatogênese de catetos (*Tayassutajacu*). *Ceres*, 53, p. 515-522, 2006

COSENTINO, M. J.; TAKIHARA, H.; BURHOP, J. W.; COCKETT, A. T. K. Regulation of rat caput epididymis contractility by prostaglandins. *J. Androl.* 5, p. 216–222, 1984.

COUSINS, R. J.; MCMAHONH, R. J. Zinc and Health: Current Status and Future Directions Integrative Aspects of Zinc Transporters. *Am. Soc. Nut Sci*, p. 1384-1387, 2000.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidades de Nutrientes. Barueri: Manole, 2005.

CULLEN, M. R.; ROBINS J. M; ESKENAZI, B. Adult organic lead intoxication: presentation of 31 new cases and review of the recent advances in literature. *Medicine* 62, p. 221-247, 1983.

CUPERTINO, M. C. Danos Oxidativos e Histológicos Crônicos Causados pelo Cádmio no Fígado e na Espermatogênese de Ratos. *Dissertação Biologia Animal, UFV.* 2012.

DALTON, T.P.; HE, L.; WANG, B., MILLER, M.L.; JIN, L.; STRINGER, K.F.; CHANG, X.; BAXTER C.S.; NEBERT, D.W. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Nat Acad Sci U S A* 102, p. 3401-3406, 2005.

- DIAS, N. M. P. Cadmium *adsorption* isotherms in acricoxisols. Rev. Bras. Eng. Agr. Amb. n. 5 .v. 2. maio/ago, 2001.
- DUARTE, R.P.S.; PASQUAL, A. Avaliação do Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) em Solos, Plantas e Cabelos Humanos. Energia na Agricultura, Botucatu, v. 15, n. 1, 2000.
- DYSON, A. L. M. B.; ORGEBIN-CRIST, M-C. Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. Endocrinology. 93, p. 391–402, 1973.
- ELINDER, C. G.; FRIBERG, I. Cobalt. In: Handbook on the toxicology of metals. 2 ed Amsterdam Elsevier. 9, p. 68-78, 1986.
- ELLIS, G.; DESJARDINS, C. Male rats secrete luteinizing hormone and testosterone episodically. Endocrinology. 110, p. 1618-1627, 1982.
- EMMERSON B. T. Chronic lead nephropathy. Kidney Int..4, p. 1–5, 1973.
- FAHIM, M.S.; WANG, M.; SUTCU, M.F.; FAHIM, Z. Zinc arginine, a 5 α reductase inhibitor, reduces rat ventral prostate weight and DNA without affecting testicular functions. Andrologia,.25, p. 369-75, 1993.
- FAN, X. P.; ROBAIRE, B. Orchiectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. Endocrinology. 139, p. 2128–2136, 1998.
- FILIPPI, S.; VANNELLI, G. B.; GRANCHI, S., LUCONI, M.; CRESCIOLI, C.; MANCINA, R.; NATALI, A.; BROCCHI, S.; VIGNOZZI, L.; BENCINI, E.; NOCI, I.; LEDDA, F.; FORTI, G.; MAGGI, M. Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. Mol. Cell. Endocrinology. 193, p. 89–100, 2002.
- FLORA, S. J. S.; MITTAL, M.; MEHTA, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. Indian J. Med. Res. 128, p. 501-523, 2008.
- FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V.; SAXENA, G. Arsenic, cadmium and lead. In: Gupta, R. C. (Ed.). Reproductive and developmental toxicology. Academic Press, Londo. , p. 416-438, 2011
- FISBERG, M.; BARRERO, M. J. L.; CASTILLO- DURAN, C.; MARTINEZ, F. E.; SCHWARTZMAN, J. S.; BRAGA, J. A. P.; MARTINI, L. A.; ALBUQUERQUE, M.

P.; AMANCIO, O. M. S. O papel dos nutrientes e desenvolvimento infantil. São Paulo: Sarvier. p. 65-80, 2008

FOURNIER-DELPECH, S.; COLAS, G.; COUROT, M.; ORTAVANT, R.; BRICE, G. Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 19, p. 597–605, 1979.

FOURNIER-DELPECH, S.; COLAS, G.; COUROT, M. Observations sur les premiers clivages des oeufs intratubaires de brebis après fécondation avec des spermatozoïdes epididymaires ou ejaculés [ovins]. *C. R. Séances Acad. Sci. (D) (Paris)* 292, p. 515–517, 1981.

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63, p. 300-318, 2005.

GOLDHABER, S.B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *RegTox Phar*, 38, p. 232–242, 2003

GONICK, H. C. Nephrotoxicity of cadmium & lead. *Indian J. Med. Res.* 128, p. 335-352, 2008

GOPALAKRISHNA, A.; BHATIA, D. Storage of spermatozoa in the epididymis of the bat, *Hipposideros speoris* (Schneider). *Cur.Sci.* 49, p. 951–953, 1980.

GOYER, R. A. Toxic Effects of Metals. *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*, p. 691-736, 1996.

GRAÇA, A.; RAMALHO, J. S.; PEREIRA, M. L. Effect of lead chloride on spermatogenesis and sperm parameters in mice. *Asian J. Androl.* 6, p. 237-241, 2004.

GUILHERME, L.R.G.; MARQUES, J.J.; PIERANGELI, M.A.P.; ZULIANI, D.Q.; CAMPOS, M.L.; MARCHI, G. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos da Ciência do Solo*, 4, p. 345-390, 2005.

GUNN, S.A.; GOULD, T.C.; ANDERSON, W.A.D. Mechanisms of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium induced vascular injury to mouse testis. *J.Reprod.Fertil.*, 1968.

- HAMILTON, D. W. The mammalian epididymis. *Reproductive Biology*. p. 268–337, 1972.
- HAMILTON, D. W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. *Handbook of Physiology*. Sec. 7, v. 5, p. 259–301, 1975.
- HERMO, L.; ADAMALI, H. I.; ANDONIAN, S. Immunolocalization of CA II and H⁺-V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J. Androl.* 21, p. 376–391, 2000.
- HIB, J. The in vitro effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the mouse caudaepididymidis. *Reprod. Biol.* 11, p.436–439, 1974.
- HIB, J.; OSCAR, P. Effects of prostaglandins and indomethacin on rat epididymal responses to norepinephrine and acetylcholine. *Arch. Androl.* 1, p. 43–47, 1978.
- HU, H. Bone lead as a new biologic marker of lead dose: recent findings and implications for public health. *Environ. Health Perspect.* 106, p.961-967, 1998.
- HSU P. C.; LIU M. Y.; HSU C. C.; LEON GUO Y. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology.* 122, p. 133-143, 1997.
- HSU, P. C.; HSU, C. C.; LIU, M. Y.; CHEN, L. Y.; GUO, Y. L.. Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A*, 55, p. 45-64, 1998.
- HSU, P. C.; GUO, Y. L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology.* 180, p. 33-44, 2002.
- HUANG, D.; OU B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, v. 6, p. 1841- 56, 2005.
- JAAKKOLA, U.-M. Regional variations in transport of the luminal contents of the rat epididymis in vivo. *J. Reprod. Fertil.* 68, p. 465–470, 1983.
- JAAKKOLA, U.-M.; TALO, A. Effects of oxytocin and vasopressin on electrical and mechanical activity of the rat epididymis in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 63, p. 47–51, 1981.
- JACOB, L. C. B.; ALVARENGA, K. F.; MORATA, T. C. The effects of occupational lead exposure on the auditory system. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 68, p. 564-9, 2002.

JOHNSON, A. L.; HOWARDS, S. S. Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. *Am. J. Physiol.* 228, p. 556–564, 1975.

KASPERCZYK, A.; KASPERCZYK, S.; HORAK, S.; OSTALOWSKA, A.; GRUCKA-MAMCZAR, E.; ROMUK, E. Assesment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicology.Applied.Pharmacology.* 228 p. 378-384 2008

KEMPINAS, W. G; LAMANO, T.; PETENUSCI, S. O; LOPES, R. A; AZOUBEL, R. Análise morfológica do testículo e epidídimo do rato na fase inicial da intoxicação pelo chumbo. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.* 1, p. 36-38, 1988.

KERR, J. B.; LOVELAND, K. L.; KRETZER, D. M. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Neill, J. D. Knobil and Neill Physiology of Reproduction, p. 827-947, 2006.

KIELING D.D. Enzimas Aspectos Gerais. Centro Tecnológico - UFSC, 2002.

KIHLSTROM, J. M.; MELIN, P. The influence of oxytocin upon some seminal characteristics in the rabbit. *Acta Physiol. Scand.* 59, p. 363–369, 1963.

KNIGHT, T. W. A qualitative study of factors affecting the contractions of the epididymis and ductus deferens of the ram. *J. Reprod. Fertil.* 40, p. 19–29, 1974.

KOSNETT, M. J. Intoxicação por metais pesados e quelantes. In: Katzung, B. G. *Farmacologia e Clínica.* 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 867-870, 2003.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição,* 16, p. 433-441, 2003.

LAKOSKI, K. A., CARRON, C. P., CABOT, C. L., SALING, P. M. Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zonalpallidum develops coincident with modification of M42 antigen. *Reprod.Biol.* 38, p. 221–233, 1988.

LARSON, K. A. WEINCEK, J. M., Mercury removal from aqueous streams utilizing micro emulsion liquid membranes. *Environ. Progress.* 13, n.4, p. 253 – 262, 1994.

LAUWERYS, R. R. Toxicologie Industrielle ET Intoxications Professionnelles. *Msdon,* p. 652 -658, 1994.

LEITE, C. M. B.; BERNARDES, R. S. O.; SEBASTIÃO, A. Método Walkley-Black na determinação da matéria orgânica em solos contaminados por chorume. *Rev. Bras. de Eng. Agr. Amb.* 8, p. 111-5, 2004.

LEUNG, G. P. H.; CHEUNG, K. H.; LEUNG, T.; TSABG, M. W.; WONG, P. Y. D. Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol. Cell. Endocrinol.* 216, p. 5–13, 2004.

LIU, J.; GOYER, R. A.; WAALKES, M. P. 2008. Toxic effects of metals. *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons.* 7 ed, p. 931-979, 2008.

LIU, J.; QU, W.; KADIISKA, M.B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 238, p. 209-214, 2009.

LOCKITCH, G. Perspectives on lead toxicity. *Clin. Biochem.* 26, p. 371-381, 1993.

MARCHLEWICZ, M.; MICHALSKA, T.; WISZNIEWSKA, B.; Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. *Chemosphere,* 2004.

MARCHLEWICZ, M.; WISZNIEWSKA, B.; GONET, B.; BARANOWSKA-BASIOCKA, I.; SAFRANOW, K.; KOLASA, A.; GLABOWSKI, W.; KURZAWA, R.; AKUBOWSKA, K.; RAC, M. E. Increased lipid peroxidation and ascorbic acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals*20,p. 13-19, 2007.

MCCALL, K. A.; HUANG, C. C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr.*; 130 p. 37-46. 2000.

McGREGOR, A. J.; MASON, M. J. Chronic occupational lead exposure and testicular endocrine function. *Hum. Exp. Toxicol.* 9, p. 371-376, 1990.

MARCOS, E. N. F. Estado nutricional e níveis plasmáticos de zinco de crianças com deficiência mental, de uma Instituição de Educação especial do Sul do Brasil. *Dissertação (Mestrado em Nutrição) Universidade Federal de Santa Catarina,* 2008.

MEDEIROS, M. A. Zinco. *Química na Escola.* 34, 3 p. 159-160, 2012

MEISTRICH, M. L.; HUGHES, T. H.; BRUCE, W. R. Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by estrogen and testosterone. *Nature* 258, p. 145–147, 1975.

MELIN, P. Effects in vivo of neurohypophysial hormones on the contractile activity of accessory sex organs in male rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 22, p. 283–292, 1970.

MERRELLS, K. J.; BLEWETT, H.; JAMIESON, J. A.; TAYLOR, C. G.; SUH, M. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. *Brit. J. Nut.* 102, p. 226-232, 2009.

MIRANDA, C. E. S. 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, p. 89, 1993.

MOORE, H. D. M.; BEDFORD, J. M. Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec.* 193, p. 293–311, 1979.

MOORE, H. D. M.; HARTMAN, T. D. In-vitro development of the fertilizing ability of hamster epididymal spermatozoa after co-culture with epithelium from the proximal tail of the epididymidis. *J. Reprod. Fertil.* 78, p. 347–352, 1986.

MOORE, H. D. M.; CURRY, M. R.; PENFOLD, L. M.; PRYOR, J. P. The culture of human epididymal epithelium and in vitro maturation of epididymal spermatozoa. *Fertil. Steril.* 58, p. 776–783, 1992.

NAHA, N.; CHOWDHURY, A. R. Inorganic lead exposure in battery and paint factory: effect on human sperm structure and functional activity. *J. UOEH.* 28, p. 157-171, 2006.

NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M. J. Os perigos nos tóxicos POPs e metais pesados e suas conseqüências para o meio ambiente e a saúde. *Econews*, outubro 2009.

NEVES, C..A. R. Zinco. Disponível em: https://sistemas.dnpm.gov.br/publicação/mostra_imagem.asp?Banco_Arquivo=3985. Acesso em: 04 fev. 2011.

NICANDER, L.; OSMAN, D. I.; PLOEN, L.; BUGGE, H. P.; and KVISGAARD, K. N. Early effects of efferent ductile ligation on the proximal segment of the rat epididymis. *Int. J. Androl.* 6, p. 91–102, 1983.

NICHOLSON, H. D.; PARKINSON, T. J.; LAPWOOD, K. R. Effects of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 117, p. 299–305, 1999.

NISHIKAWA, Y.; WAIDE, Y. Studies on the maturation of spermatozoa. I. Mechanism and speed of transition of spermatozoa in the epididymis and their functional changes. Bull. Natl. Inst. Agr.Sci. (G)3, p. 69–81, 1952.

OCDE. Risk reduction monograph No. 5: Cadmium. OECD Environmental Monograph Series No. 104. OECD Environment Directorate, Paris, France, 1994.

OLDEREID, N. B.; OLAISEN, B.; PURVIS, K ; THOMASSEN Y.; ATTRAMADAL, A.; . Concentrations of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. Al Ame en J Med S c i 2 Spcial3, p. 7-4 2 , 2009.

OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. O Mundo da Saúde, 33, 4, p. 419-425, 2009.

OLIVEIRA, M. R.; HORN, A. H. Comparação da concentração de metais pesados nas águas do Rio São Francisco em Três Marias . Geonomos 14 (1,2), p. 55-63, 2006.

OLIVEIRA, E.C.S.; MOURA, M.R.; SILVA JR., V.A.; PEIXOTO, C.A.; SARAIVA, K.L.A.; SÁ, M.J.C.; DOUGLAS, R.H.; MARQUES JR., A.P. Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. Theriogenology. 68, p. 137-145, 2007.

OLIVEIRA, H. C. C. Avaliação do efeito de metais pesados na fertilidade do ratinho. Tese de Doutorado. Ria – Repositorio Institucional da Universidade de Aveiro. 2010.

OLIVEIRA, M. F. Efeito da exposição crônica ao níquel no testículo de ratos Wistar adultos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 68 p. 2010.

OMS – Organização Mundial de Saude. Elementos Traço na Nutrição e Saude Humanas. São Paulo. Editora Roca, , p. 361, 1998.

ORGBIN-CRIST, M.-C. Recherches expérimentale sur l'adurée de passage des spermatozoïde dans l'épididyme dutaureau. Ann. Anim. Biol. Biochem. Biophys.2, p. 51–108, 1962.

ORGBIN-CRIST, M.-C. Sperm maturation in rabbit epididymis. Nature216, p. 816–818, 1967.

ORGBIN-CRIST, M.-C. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: effect of castration and testosterone replacement. J. Exp. Zool.185, p. 301–309, 1973.

ORGBIN-CRIST, M-C.; DANZO, B. J.; DAVIES, J. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Handbook of Physiology. R. O. Greep and E. B. Astwood, 7, 5, p. 319–338. AmPhysiolSoc, Wash, DC, 1975.

OTEIZA, P. I.; OLIN, K.L. ; FRAGA, C. G.; KEEN, C. L. Oxidative defense system in testes from zinc deficient rats. Proc.Soc. Exp.Biol.Med. 213, p. 85-91, 1997.

PAOLIELLO, M. M. B.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. Centro de Recursos Ambientais (BA), p. 150, 2001.

PAZ, G.; KAPLAN, R.; YEDWAB, G.; HOMONNAI, Z. T.; KRAICER, P. F. The effect of caffeine on rat epididymal spermatozoa: motility, metabolism and fertilizing capacity. Int. J. Androl. 1, p. 145–152, 1978.

PEROTTONE, J. Avaliação dos efeitos promovidos pelo chumbo, selênio e/ou sacarose em parâmetros oxidativos em roedores. Tese de Doutorado. UFSM-RS, 2006.

PICOLI, L. C. Efeito do cádmio no soalho da boca de ratos durante a lactação. Braz. Oral Rev. 18, 2, p. 105-109, 2004.

PREDES, F. S.; DIAMANTE, M. A. S.; DOLDER, H.; Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats.. Int. J. Exp. Pathol. 91, p. 125–131, 2010.

POWELL, S. R. The antioxidant properties of zinc. J. of Nutr. 130 p. 1447-54, 2000.

QUINLAN, G. J.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P.; GUTTERIDGE J. M. Action of lead(II) and aluminium (III) ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. Biochim . Biophys. Acta. 962(2), p. 196-200, 1988.

RICKER, D. D.; CHANG, T. S. K. Neuronal input from the inferior mesenteric ganglion (IMG) affects sperm transport within the rat cauda epididymis. Int. J. Androl. 19, p. 371–376, 1996.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. The Physiology of Reproduction. p. 999–1080, 1988.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGBIN-CRIST, MC. Knobil and Neill's Physiology of reproduction 3 ed, 22, p. 1071-1148, 2006.

RODAMILANS, M.; OSABA, M. J. M.; TO-FIGUERAS, J.; RIVERA FILLAT, E.; MARQUES, J.; PÉREZ, P.; CORBELLA, J. Lead toxicity on endocrine testicular function in an occupational exposed population. *Hum. Exp. Toxicol.* 7, p. 125-128, 1988.

SAINATH, S. B.; MEENA, R.; SUPRIYA, C.; PRATAP REDDY K.; SREENIVASULA REDDY, P. Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, p. 146-154, 2011.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; SARABIA, M. I.; CARO, R., DE PAOLI, T.; HAGER, A.; WEILL, R.; BOCCIO, J. Zinc as essential micronutrient: a review. *Nutrition Research*, 20, p.737-755, 2000.

SALING, P. M. Development of the ability to bind to zonae pellucidae during epididymal maturation: reversible immobilization of mouse spermatozoa by lanthanum. *Biol. Reprod.* 26, p. 429–436, 1982.

SENA, K. C. M.; PEDROSA, L. F. S. Zinc supplementation and its effects on growth, immune system, and diabetes. *Rev. Nut.* 15 (1) p. 80-82, 2005.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Segment specific morphological changes in the aging brown Norway rat epididymis. *Biol. Reprod.* 58, p. 497–513, 1998.

SHAFAI, A. E.; ZOHDY, N.; MULLA, K. E.; HASSAN, M.; MORAD, N. Light and electron microscopic study of the toxic effect of prolonged lead exposure on the seminiferous tubules of albino rats and the possible protective effect of ascorbic acid. *Food Chem. Toxicol.* 49, p. 734-743, 2011.

SHEETS, R. W. Release of heavy metals from European and Asian porcelain dinnerware. *Sci. Total Environ.* 212 (2-3), p. 107-113, 1998.

SILVA, T. A. Avaliação do Efeito do Chumbo na Qualidade espermática de humanos e de Ratinhos. Dissertação de Mestrado – Faculdade de ciências da Universidade do Porto – Portugal, 2007.

SIMONS, T. J. B. Lead transport and binding by human erythrocytes in vitro. *Pfugers Arch.* 423, p. 307-313, 1993.

SIEWIT, C.L.; GENGLER, B.; VEGAS, E.; PUCKETT, R.; LOUIE, M.C. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER α and c-Jun. *Molecular Endocrinology* 24, p.981-992, 2010.

SINGH, G.; BAY, B.H.; SIT, K.H. Effect of zinc on the epithelial lining of mice epididymis – a light microscopy study. *Okajimas Folia Anatomy Japanese*. v. 73, p. 129-132, 1996.

SMITH, C. M.; WANG, X.; HU, H.; KELSEY, K. T. A polymorphism in the δ -aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ. Health Perspect.* 103, p. 248-253, 1995.

SOARES, M. R. Coeficiente de Distribuição (Kd) de Metais Pesados em Solos do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

SOKOL, R. Z. The effect of duration of exposure on the expression of lead toxicity on the male reproductive axis. *J.Androl*, 11,p. 521-526, 1990.

SOLLIWAY, B. M.; SCHAFFER, A.; PRATT, H.; YANNAI, S. Effects of treatment to lead on selected biochemical and hematological variables. *Pharmacol.Toxicol.* 78, p. 18-22, 1996.

SU, L.; MRUK, D. D.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. Drug transporters and blood-testis barrier function. *J. Endocrinol* 209, p. 337-351, 2011.

SUJARIT, S.; PHOLPRAMOOL, C. Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. *J. Reprod. Fertil.* 74, p. 497–502, 1985.

SUN, E. L.; FLICKINGER, C. J. Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Anat. Rec.* 196, p. 285–293, 1980.

STUDDARD, P. W.; STEIN, J. L.; COSENTINO, M. J. The effects of oxytocin and arginine vasopressin in vitro on epididymal contractility in the rat. *Int. J. Androl.* 25, p. 65–71, 2002.

TALO, A.; JAAKKOLA, U.-M.; MARKKULA-VIITANEN, M. Spontaneous electrical activity of the rat epididymis in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 57, p.423–429, 1983.

TEMPLETON, D.M.; LIU, Y. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chemical Biological Interact* 188, p. 267-275, 2010.

- THOREUX-MANLAY, A.; LE GOASCOGNE, C.; SEGRETAINE, D.; JÉGOU, B.; PINON-LATAILLADE, G. Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells in vivo and in vitro. *Toxicology*.103, p. 53-62, 1995.
- TRASLER, J. M., HERMO, L., AND ROBAIRE, B. Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. *Biol. Reprod.* 38, p. 463–479, 1988.
- TURNER, T. T.; RILEY, T. A. p53 independent, region-specific epithelial apoptosis is induced in the rat epididymis by deprivation of luminal factors. *Mol. Reprod. Dev.* 53, p. 188–197, 1999.
- TURNER, T. T., BOMGARDNER, D., JACOBS, J. P., and NGUYEN, Q. A. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*.125, p. 871–878, 2003.
- USSELMAN, M. C.; CONE, R. A. Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by “immobilin,” a high molecular weight glycoprotein. *Reprod. Biol.*29, p. 1241–1253, 1983.
- VALLE, B.L.; ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.*41, p.91-128, 1972.
- VALLE, B.L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, 73, p. 79-118, 1993.
- VAN STEIRTEGHEM, A.; NAGY, P.; JORIS, H.; JANSSENSWILLEN, C.; STAESSEN, C.; VERHEYEN, G.; CAMUS, M.; TOURNAYE, H.; DEVROEY, P. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13, p. 134–142, 1998.
- VARMA, A. Handbook of atomic absorption analysis. 3.ed. Boca Raton: CRC Press.2, p.73-184, 1986.
- WAALKES, M. P.; COOGAN, T.P.; BARTER, R. A. 1992. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit Rev Toxicol* 22, p.175-201, 1992.
- WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research* 533, p. 107-120, 2003.

- WASTNEY, M. E.; AAMODT, R. L.; RUMBLE, W. F.; HENKIN, R. I. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *Am. J. Physiol.* 251, p. 398-408, 1986.
- WEISSENBERG, R.; YOSSEFI, S.; OSCHRY, Y.; MADGAR, I., LEWIN, L. M. Investigation of epididymal sperm maturation in the golden hamster. *Int. J. Androl.* p.18, 55, 1995.
- WHITTINGTON, K.; ASSINDER, S. J.; PARKINSON, T.; LAPWOOD, K. R.; NICHOLSON, H. D. Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction* 122, p. 317–325, 2001.
- WHO – (World Health Organization). Lead – environmental aspects. Geneva. *Envir Health Criteria*, p. 85, 1995.
- WHO (World Health Organization). *Guidelines for Air Quality*. Geneva, 1999.
- WHO (World Health Organization). 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 > 2000.
- WOOD, J. M. Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science*, 183, p. 1049-1052, 1974.
- WANG, L.; XUN, P.; ZHAO, Y.; WANG, X.; QIAN, L.; CHEN, F. Effects of lead exposure on sperm concentrations and testes weight in male rats: a meta-regression analysis. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, 71, p. 454-463, 2008.
- WONG, E.W.; YAN, H. H.; LI, M. W.; LIE, P. P.; MRUK, D. D.; CHENG, C.Y. 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, p. 167-188, 2010.
- YANG, J. M. Cadmium- induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reprod.Toxicol.* 17, p. 553-560, 2003.
- YANO, C. L.; DOLDER, H. Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment. *Contraception.* 66, p. 463-467, 2002.

YEUNG, C. H.; COOPER, T. G.; WEINBAUER, G. F. Maturation of monkey spermatozoa in the epididymis with respect to their ability to undergo the acrosome reaction. *J. Androl.* 17, p. 427–432, 1996.

YEUNG, C. H.; PEREZ-SANCHEZ, F.; SOLER, C., POSER, D., KLIESCH, S.; COOPER, T. G. Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Hum. Reprod. Update* 3, p. 205–213, 1997.

YU, X.; FILARDO, E. J.; SHAIKH, Z. A. The membrane estrogen receptor GPR30 mediates cadmium-induced proliferation of breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, p. 83-90, 2007.

ZAGO, M. P.; OTEIZA, P. I. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 31 p. 266-274, 2001.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETT, E. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution, Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações.* Rima, São Carlos. p. 478, 2006.

ARTIGO

Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epidídimo de ratos Wistar

1. Introdução

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 consequente demanda por bens de consumo, o homem tem produzido quantidades significativas destes resíduos, possibilitando o aparecimento de enfermidades relacionadas com os diversos metais tóxicos (LIU et al., 2008).

Desde a década de 1970, vários autores têm reafirmado uma possível queda na qualidade espermática e, conseqüentemente, um aumento das taxas de infertilidade no sexo masculino (NELSON & BUNGE, 1974; PASQUALOTTO et al., 2003). As causas do aumento da infertilidade permanecem controversas (PASQUALOTTO et al., 2003), sugerem que muitas substâncias a que os homens estão expostos, podem afetar sua fertilidade (LERDA & REZZI, 1991; PETRELLI et al., 2000). Acredita-se que o desenvolvimento agrícola no século XX esteja envolvido nesse processo, pois favoreceu o manuseio e exposição a várias substâncias que são nocivas aos seres humanos, algumas delas afetando o aparelho reprodutor, tais como herbicidas (COX, 1996; COOPER & KAVLOCK, 1997; PASQUALOTTO et al., 2003). Conseqüentemente, há um crescente interesse no papel da exposição ocupacional e ambiental a poluentes tóxicos, como os metais pesados, pois se entende ser esta uma das causas de declínio da concentração espermática na população humana (APOSTOLI & CATALANI, 2011).

Metais pesados são elementos de alta densidade, em comparação a outros elementos comuns, apresentam densidade igual ou superior a 5 g/cm³, e número atômico maior que 20 (SOARES, 2004). Uma vez absorvidos, interagem com as proteínas sendo transportados pelo sangue até os tecidos onde podem ser estocados ou biotransformados (LIU et al., 2008). A toxicidade causada por estes 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 a combinação com as membranas celulares, o que perturba ou impede completamente o transporte de substâncias essenciais (GOLDHABER, 2003). Além disso, alguns metais pesados são capazes de imitar os metais essenciais unindo-se a sítios fisiológicos que normalmente seriam ocupados por estes, o que pode contribuir para a

bioacumulação de metais tóxicos no organismo (LIU et al., 2008). Os efeitos tóxicos exercidos por esses metais podem incluir a letalidade e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (LIU et al., 2008; FLORA et al., 2011).

O estudo da influência dos metais pesados no aparelho reprodutor de machos tem focado principalmente nas gônadas, lugar de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas. Contudo, o espermatozoide não deixa o testículo totalmente maduro. Durante o transporte epididimário, os espermatozoides são submetidos ao processo de maturação na cabeça do epidídimo, o qual resulta na aquisição de habilidades para se movimentar e fertilizar o ovócito (ROBAIRE et al., 2006). Durante este processo o espermatozoide é submetido a modificações bioquímicas, morfológicas e funcionais. Espermatozoides tornam-se maduros e com habilidade fecundante quando alcançam a parte central do corpo ou a parte proximal da cauda do epidídimo. Durante a permanência no epidídimo, os espermatozoides podem ser afetados por muitas substâncias nocivas, das quais, inclusive os metais pesados (ROBAIRE et al., 2006).

Sabendo-se que é crescente a contaminação ambiental por metais pesados, que vários estudos já comprovaram efeitos deletérios desses metais nos testículos, que há propensão dos epidídimos aos efeitos acumulativos e tóxicos dos metais pesados e finalmente, que são poucos trabalhos que trazem resultados conclusivos sobre a ação destes metais na maturação e capacitação dos espermatozoides, surge a necessidade de estudarmos o seu mecanismo de atuação, doses e efeitos na morfologia e fisiologia destes órgãos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes doses de cádmio (Cd), chumbo (Pb) e zinco (Zn) na morfometria do epidídimo de ratos Wistar.

2. Material e Métodos

Para a realização deste experimento foram utilizados procedimentos experimentais que seguiram estritamente as indicações das normas para o uso de animais em ensino, pesquisa e extensão da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA; Protocolos: Zinco=001/11; Cádmio=30/2009; Chumbo=69/2010). Os animais foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, pesados e mantidos

em gaiolas individuais em condições de temperatura média de 21°C e fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro.

2.1 Experimento com o cádmio

Foram usados 30 Ratos Wistar (280 – 300g) em idade reprodutiva (90 dias) distribuídos em 5 grupos experimentais (n=6 animais/ grupo). Animais do grupo controle (GCd1) receberam solução salina, enquanto que os animais de GCd2, GCd3 e GCd4 receberam, respectivamente, 1,1, 1,4 e 1,8 mg/kg de cloreto de cádmio (CdCl₂). O cloreto de cádmio e a salina foram administrados intraperitonealmente (IP) em dose única. Os animais de cada grupo foram eutanasiados no 56º dia.

2.2 Experimento com o zinco

Foram utilizados 28 ratos Wistar (280 – 300g) em idade reprodutiva (90 dias). Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais (n=7 animais/ grupo). O zinco (ZnSO₄. 7H₂O) foi administrado aos grupos GZn2, GZn3 e GZn4 na água de beber uma vez ao dia nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/dia/Kg de peso corporal de zinco, enquanto que os animais do GZn1 (controle) receberam apenas água de beber. O experimento teve a duração de 56 dias, quando os animais foram eutanasiados.

2.3 Experimento com o chumbo

Foram utilizados 25 ratos Wistar adultos (280 – 300g) em idade reprodutiva (90 dias). Estes animais foram distribuídos em 5 grupos experimentais de 5 animais cada: os animais do grupo controle (GPb1) receberam água destilada e nos quatro grupos tratados (GPb2, GPb3, GPb4 e GPb5), os animais receberam chumbo nas concentrações de 16, 32, 64, 128 mg/dia/ kg de peso corporal, respectivamente, na forma de acetato de chumbo [(C₂H₃O₂)₂Pb. 3H₂O)] (Sigma-Aldrich). Os tratamentos foram administrados uma vez ao dia, por gavagem, durante 30 dias consecutivos. Para impedir a precipitação do acetato de chumbo, foi adicionado 1 ml de HCl 5N para cada litro de água destilada (ALLOUCHE et al., 2009).

2.4 Processamentos histológicos do epidídimo

Ao término de cada período experimental, os animais foram eutanasiados através de inalação de CO₂. Em seguida, foi removido o aparelho reprodutor masculino e

separado os epidídimos. Os epidídimos foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) por 24 horas.

Nas três coletas o epidídimo direito de cada animal foi dividido em segmento inicial, cabeça e cauda, após o período de fixação. Os fragmentos de cada segmento foram destinados ao estudo em microscopia de luz, sendo desidratados por imersão em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e absoluto), permanecendo por um período de 30 minutos em cada solução. A seguir, foram feitas pré-inclusão e inclusão em hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica).

Utilizando-se micrótomo rotativo (Reichert-Jung) e navalha de vidro, foram feitos cortes histológicos de 3µm de espessura. As preparações foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1% e montadas com Entellan® (Merck). Imagens (100X) do parênquima epididimário foram obtidas em microscópio Olympus BX-40 e analisadas utilizando-se o programa Image Pro-Plus 4 (Media Cybernetics).

2.5 Morfometria do epidídimo

Foram realizadas as seguintes análises em todos os epidídimos coletados: diâmetro tubular (DT), diâmetro luminal (DL) e altura de epitélio (EP), excluindo estereocílios. A análise dos diâmetros tubulares, luminal e a alturas de epitélio foram realizadas em 20 túbulos epididimários, em cortes transversais, para cada segmento de cada animal. As secções escolhidas foram as mais circulares possíveis. O diâmetro luminal (DT) foi tomado como a média entre as medidas de duas bordas perpendiculares, enquanto que o diâmetro luminal (DL) como a média entre as medidas de duas regiões basais perpendiculares entre si. A altura do epitélio (EP) foi tomada como a diferença das médias do diâmetro tubular e o diâmetro luminal.

2.6 Proporções volumétricas no epidídimo

A proporção volumétrica do epitélio (E), tecido conjuntivo (TC), lúmen com espermatozoide (Les) e lúmen sem espermatozoide (Lss) dos segmentos inicial, cabeça e cauda foram realizadas usando um sistema de grade contando 266 pontos por campo, sendo 10 campos por segmento de cada animal. O percentual relativo (%) foi calculado após a contagem dos pontos que coincidiram com cada um dos compartimentos dos tecidos.

2.7 Análise Estatística

Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls foi usada para comparar médias e desvio-padrão entre as dosagens de cada grupo experimental ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Cádmio

Nas tabelas 1, 2 e 3 encontram-se os resultados da ação do cádmio no epidídimo. No segmento inicial, os animais que receberam maior dose de cádmio apresentaram aumento na proporção de lúmen sem espermatozoides (Tabela 1).

Houve aumento da altura do epitélio na cabeça do epidídimo dos animais tratados com cádmio em relação aos animais controle (Tabela 2). Observou-se, ainda na região da cabeça, a redução da proporção de epitélio nos animais dos grupos 2 e 3 e a redução da proporção de lúmen com espermatozoides no grupo 4. Por outro lado, nos animais dos grupos 3 e 4 foi registrada menor quantidade de lúmen sem espermatozoides.

Na cauda do epidídimo (Tabela 3) observou-se aumento significativo dos diâmetros tubular e luminal nos animais dos grupos 2 e 3. Por outro lado, animais do grupo 3 apresentaram redução na proporção de epitélio, enquanto animais do grupo 4 mostraram aumento na proporção de lúmen sem espermatozoides.

Tabela 1 – Parâmetros morfométricos do segmento inicial epididimário de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de cloreto de cádmio administradas intraperitonealmente em dose única.

	GCd1	GCd2	GCd3	GCd4
EP(μm)	59,74 \pm 1,48 ^a	84,83 \pm 25,63 ^a	75,58 \pm 21,83 ^a	69,04 \pm 26,02 ^a
DL(μm)	101,8 \pm 2,66 ^a	111,81 \pm 15,72 ^a	97,72 \pm 32,51 ^a	112,62 \pm 49,33 ^a
DT(μm)	161,48 \pm 4,1 ^a	189,51 \pm 40,75 ^a	160,46 \pm 64,04 ^a	181,67 \pm 67,91 ^a
E%	38,47 \pm 2,64 ^a	39,49 \pm 40,75 ^a	30,86 \pm 4,24 ^a	34,26 \pm 9,13 ^a
LcE%	19,15 \pm 2,56 ^a	19,68 \pm 8,55 ^a	10,94 \pm 7,48 ^a	13,27 \pm 9,86 ^a
LsE%	5,49 \pm 1,32 ^a	5,01 \pm 2,76 ^a	11,52 \pm 7,55 ^{ab}	14,03 \pm 8,73 ^b
Tc%	36,87 \pm 1,44 ^a	35,86 \pm 4,26 ^a	46,66 \pm 10,65 ^a	38,42 \pm 11,05 ^a

Média \pm DP; ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si ($p < 0,05$). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GCd1=controle; GCd2=CdCl₂ 1,1mg/Kg de peso corporal; GCd3=CdCl₂ 1,4mg/Kg de peso corporal; GCd4=CdCl₂ 1,8 mg/Kg de peso corporal.

Tabela 2 - Parâmetros morfométricos da cabeça do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de cloreto de cádmio administradas intraperitonealmente em dose única.

	GCd1	GCd2	GCd3	GCd4
EP (µm)	47,86 ±1,52 ^a	66,01±5,56 ^b	61,68±4,54 ^b	61,29±17,65 ^b
DL(µm)	237,62 ±17,50 ^a	329,04±21,96 ^a	291,24±79,06 ^a	236,32±115,61 ^a
DT (µm)	290,72 ±19,10 ^a	395,06±18,99 ^a	352,92±76,55 ^a	297,62±106,98 ^a
E%	28,62 ±1,81 ^a	22,34±2,85 ^b	21,23±2,83 ^b	27,01±7,32 ^a
LcE%	44,99 ±3,62 ^a	48,58±6,33 ^a	33,43±19,25 ^{ab}	20,81±17,6 ^b
LsE%	5,80 ±1,56 ^a	14,04±3,64 ^{ab}	19,02±5,02 ^b	24,20±15,66 ^b
Tc%	20,57 ±1,96 ^a	15,01±2,11 ^a	26,30±13,39 ^a	27,96±18,45 ^a

Média±DP; ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p<0,05). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GCd1=controle; GCd2=CdCl₂ 1,1mg/Kg de peso corporal; GCd3=CdCl₂ 1,4mg/Kg de peso corporal; GCd4=CdCl₂ 1,8 mg/Kg de peso corporal.

Tabela 3 - Parâmetros morfométricos da cauda do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de cloreto de cádmio administradas intraperitonealmente em dose única

	GCd1	GCd2	GCd3	GCd4
EP (µm)	49,94 ±1,87 ^a	55,28±10,02 ^a	50,84±5,39 ^a	46,89±13,34 ^a
DL(µm)	242,73 ±25,60 ^a	367,25±38,52 ^b	367,78±77,71 ^b	337,47±110,42 ^{ab}
DT (µm)	309,55 ±12,41 ^a	422,53±31,09 ^b	418,62±73,84 ^b	384,37±89,29 ^{ab}
E%	24,31 ±4,41 ^a	20,01±4,07 ^{ab}	16,48±2,29 ^b	19,36±4,30 ^{ab}
LcE%	50,17 ±6,02 ^a	58,49±5,52 ^a	44,83±26,23 ^a	42,78±24,59 ^a
LsE%	3,16 ±2,07 ^a	3,44±3,22 ^a	9,30±6,92 ^{ab}	13,08±9,19 ^b
Tc%	22,34 ±5,09 ^a	18,04±4,76 ^a	29,37±16,22 ^a	24,76±13,29 ^a

Média±DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p<0,05). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GCd1=controle; GCd2=CdCl₂ 1,1mg/Kg de peso corporal; GCd3=CdCl₂ 1,4mg/Kg de peso corporal; GCd4=CdCl₂ 1,8 mg/Kg de peso corporal.

3.2 Chumbo

Os parâmetros morfométricos epididimários do segmento inicial, cabeça e cauda do epidídimo de animais tratados com acetato de chumbo encontram-se nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

No segmento inicial não foram observadas alterações significativas quanto aos parâmetros avaliados (Tabela 4).

Houve redução da altura do epitélio da cabeça do epidídimo nos animais do grupo 5, em relação aos animais controle (Tabela 5). Observou-se ainda, na região da cabeça, a redução significativa da proporção do epitélio nos grupos 3, 4 e 5.

Na cauda observou-se em todos os tratamentos (G2, G3, G4 e G5) a redução significativa no diâmetro do túbulo e diâmetro luminal (Tabela 6).

Tabela 4- Parâmetros morfométricos do segmento inicial do epidídimo de ratos Wistar tratados com diferentes concentrações de acetato de chumbo diariamente.

	GPb1	GPb2	GPb3	GPb4	GPb5
EP (µm)	42,50 ± 9,45 ^a	35,42 ± 5,11 ^a	33,33 ± 7,94 ^a	35,81 ± 2,95 ^a	35,77 ± 9,96 ^a
DL(µm)	128,34 ± 19,01 ^a	123,55 ± 30,18 ^a	128,50 ± 35,05 ^a	126,26 ± 6,46 ^a	121,72 ± 9,72 ^a
DT (µm)	200,44 ± 15,68 ^a	189,49 ± 20,60 ^a	193,80 ± 53,04 ^a	189,63 ± 2,91 ^a	174,71 ± 41,05 ^a
E%	44,77±7,52 ^a	38,49±5,44 ^a	39,55±0,95 ^a	37,03±2,43 ^a	39,98±4,39 ^a
LcE%	14,59±7,52 ^a	22,10±9,33 ^a	25,08±4,47 ^a	22,38±5,27 ^a	17,48±3,02 ^a
LsE%	6,80±4,91 ^a	5,20±2,76 ^a	3,24±0,65 ^a	4,42±1,94 ^a	6,69±2,14 ^a
Tc%	33,82±7,05 ^a	34,19±7,21 ^a	32,12±4,20 ^a	36,16±3,86 ^a	35,84±6,09 ^a

Média±DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p<0,05). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GPb1=salina; GPb2=acetato de chumbo 16mg/Kg de peso corporal; GPb3=acetato de chumbo 32mg/Kg de peso corporal; GPb4=acetato de chumbo 64mg/Kg de peso corporal; GPb5=acetato de chumbo 128mg/Kg de peso corporal.

Tabela 5 - Parâmetros morfométricos da cabeça do epidídimo de ratos Wistar com diferentes concentrações de acetato de chumbo diariamente.

	GPb1	GPb2	GPb3	GPb4	GPb5
EP(µm)	30,50±2,51 ^a	29,86±0,77 ^a	28,76±1,84 ^a	28,52±0,99 ^a	26,85±1,82 ^b
DL(µm)	361,62±39,77 ^a	353,09±23,26 ^a	335,60±25,28 ^a	339,17±39,23 ^a	354,49±52,04 ^a
DT (µm)	392,12±37,40 ^a	382,95±23,20 ^a	364,37±25,65 ^a	367,70±38,74 ^a	381,35±52,27 ^a
E%	30,01±3,51 ^a	30,85±2,3 ^a	26,45±1,25 ^b	25,05±2,93 ^b	25,13±2,16 ^b
LcE%	46,49±5,13 ^a	41,57±14,64 ^a	49,42±3,66 ^a	51,49±10,10 ^a	54,78±4,75 ^a
LsE%	6,99±2,48 ^a	5,03±3,01 ^a	4,57±3,54 ^a	9,38±5,24 ^a	2,67±1,29 ^a
Tc%	16,49±2,9 ^a	22,53±13,20 ^a	19,54±4,89 ^a	16,97±3,82 ^a	17,40±3,08 ^a

Média±DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p<0,05). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GPb1=salina;

GPb2=acetato de chumbo 16mg/Kg de peso corporal; GPb3=acetato de chumbo 32mg/Kg de peso corporal; GPb4=acetato de chumbo 64mg/Kg de peso corporal; GPb5=acetato de chumbo 128mg/Kg de peso corporal.

Tabela 6- Parâmetros morfométricos da cauda do epidídimo de ratos Wistar com diferentes concentrações de acetato de chumbo diariamente.

	GPb1	GPb2	GPb3	GPb4	GPb5
EP μ m)	20,53 \pm 3,02 ^a	19,36 \pm 3,9 ^a	20,44 \pm 3,66 ^a	19,45 \pm 2,95 ^a	17,35 \pm 1,63 ^a
DL(μ m)	522,70 \pm 10,31 ^a	452,24 \pm 53,82 ^b	454,47 \pm 67,24 ^b	437,07 \pm 53,81 ^b	441,69 \pm 37,12 ^b
DT μ m)	543,23 \pm 12,90 ^a	471,61 \pm 50,50 ^b	474,91 \pm 64,03 ^b	456,52 \pm 50,94 ^b	459,05 \pm 35,83 ^b
E%	11,31 \pm 1,47 ^a	13,97 \pm 3,42 ^a	16,22 \pm 6,15 ^a	15,36 \pm 4,69 ^a	16,84 \pm 6,07 ^a
LcE%	61,84 \pm 3,27 ^a	57,33 \pm 5,11 ^a	57,89 \pm 7,00 ^a	58,15 \pm 4,02 ^a	59,00 \pm 4,82 ^a
LsE%	7,70 \pm 4,08 ^a	4,84 \pm 2,70 ^a	3,81 \pm 1,16 ^a	5,98 \pm 2,5 ^a	7,02 \pm 3,12 ^a
Tc%	19,13 \pm 6,91 ^a	23,84 \pm 3,60 ^a	22,06 \pm 5,7 ^a	20,49 \pm 6,37 ^a	17,13 \pm 3,21 ^a

Média \pm DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p<0,05). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GPb1=salina; GPb2=acetato de chumbo 16mg/Kg de peso corporal; GPb3=acetato de chumbo 32mg/Kg de peso corporal; GPb4=acetato de chumbo 64mg/Kg de peso corporal; GPb5=acetato de chumbo 128mg/Kg de peso corporal.

3.3 Zinco

Os resultados da morfometria e das proporções dos constituintes epididimários do segmento inicial, cabeça e cauda de animais tratados com sulfato de zinco podem ser vistos nas Tabelas 7, 8 e 9.

Dos parâmetros morfométricos epididimário avaliados no segmento inicial (Tabela 7), apenas a altura do epitélio nos animais do grupo 4 reduziu significativamente em relação ao controle.

Na cabeça do epidídimo observou-se, no grupo 3, redução significativa na altura do epitélio em relação ao controle. A proporção de epitélio dos grupos 3 e 4 também sofreu redução significativa em relação ao controle. Houve aumento na proporção de tecido conjuntivo nos três grupos tratados (Tabela 8).

Na cauda do epidídimo, apenas os animais do grupo 2 apresentaram alterações significativas com a redução da altura do epitélio e dos diâmetros tubular e luminal se comparados ao grupo controle (Tabela 9).

Tabela 7 - Parâmetros morfométricos do segmento inicial do epidídimo ratos Wistar com diferentes concentrações de sulfato de zinco diariamente.

	GZn1	GZn2	GZn3	GZn4
EP (µm)	37,69±2,80 ^a	35,9±4,65 ^{ab}	35,42±2,16 ^{ab}	32,66±1,10 ^b
DL (µm)	158,09±7,98 ^a	182,33±28,90 ^a	173,10±24,24 ^a	165,75±24,67 ^a
DT (µm)	195,79±8,76 ^a	218,24±27,29 ^a	208,52±22,23 ^a	198,42±24,88 ^a
E%	42,17±3,56 ^a	42,19±8,44 ^a	39,34±25,0 ^a	41,85±1,03 ^a
LcE%	19,48±3,72 ^a	22,91±13,96 ^a	20,69±2,28 ^a	24,07±1,86 ^a
LsE%	7,64±3,08 ^a	9,02±3,49 ^a	8,72±1,79 ^a	7,92±2,32 ^a
Tc%	30,69±6,61 ^a	25,87±5,95 ^a	31,23±1,86 ^a	26,14±2,29 ^a

Média±DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p<0,05). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GZn1=controle; GZn2=sulfato de zinco 5mg/Kg de peso corporal; GZn3=sulfato de zinco 10mg/Kg de peso corporal; GZn4=sulfato de zinco 20mg/Kg de peso corporal.

Tabela 8 - Parâmetros morfométricos da cabeça do epidídimo ratos Wistar com diferentes concentrações de sulfato de zinco diariamente.

	GZn1	GZn2	GZn3	GZn4
EP (µm)	32,18±2,68 ^a	30,16±1,85 ^a	25,81±23,11 ^b	30,84±4,07 ^a
DL (µm)	316,90±34,85 ^a	293,16±30,24 ^a	319,98±17,16 ^a	278,31±49,05 ^a
DT (µm)	349,089±35,66 ^a	323,32±30,73 ^a	345,80±19,11 ^a	309,16±47,34 ^a
E%	30,60±0,39 ^a	29,33±3,13 ^{ab}	26,77±3,13 ^b	26,83±2,76 ^b
LcE%	46,71±3,92 ^a	42,32±8,44 ^a	46,48±4,42 ^a	42,08±7,11 ^a
LsE%	14,56±3,11 ^a	14,79±5,36 ^a	14,62±3,9 ^a	17,61±4,28 ^a
Tc%	8,11±2,76 ^a	13,55±2,99 ^b	12,10±1,98 ^b	13,45±4,45 ^b

Média±DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p<0,05). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GZn1=controle; GZn2=sulfato de zinco 5mg/Kg de peso corporal; ; GZn3=sulfato de zinco 10mg/Kg de peso corporal; GZn4=sulfato de zinco 20mg/Kg de peso corporal.

Tabela 9- Parâmetros morfométricos da cauda do epidídimo ratos Wistar com diferentes concentrações de sulfato de zinco diariamente.

	GZn1	GZn2	GZn3	GZn4
EP (µm)	27,21±2,21 ^a	24,01±1,50 ^b	25,24±2,22 ^{ab}	25,70±2,45 ^{ab}
DL(µm)	311,61±35,37 ^a	379,21±30,32 ^b	351,90±78,16 ^{ab}	306,32±17,92 ^a
DT (µm)	338,83±33,63 ^a	403,23±29,12 ^b	377,14±76,64 ^{ab}	332,02±19,01 ^a
E%	25,79±2,75 ^a	23,24±5,09 ^a	22,73±3,49 ^a	22,40±2,97 ^a
LcE%	62,75±4,88 ^a	65,32±4,46 ^a	65,06±2,20 ^a	65,50±2,79 ^a
LsE%	1,39±0,70 ^a	1,22±0,18 ^a	1,35±0,33 ^a	1,14±0,93 ^a
Tc%	10,07±3,70 ^a	10,22±1,18 ^a	10,86±2,33 ^a	10,96±0,93 ^a

Média±DP. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha são diferentes entre si (p<0,05). EP=altura de epitélio; DL=diâmetro luminal; DT=diâmetro tubular; E=epitélio; Tc=tecido conjuntivo; LcE=lúmen com espermatozoide; LsE=lúmen sem espermatozoide. GZn1=controle; GZn2=sulfato de zinco 5mg/Kg de peso corporal ; GZn3=sulfato de zinco 10mg/Kg de peso corporal; GZn4=sulfato de zinco 20mg/Kg de peso corporal.

4. Discussão

Os resultados obtidos mostraram que os três metais avaliados provocaram alterações morfométricas no segmento inicial, cabeça e cauda do epidídimo. A cauda foi a região que mais sofreu alterações em parâmetros morfométricos, como diâmetro tubular, diâmetro luminal, altura de epitélio e percentual de lúmen sem espermatozoides. De acordo com CYR et al. (2001), pesquisando a expressão das metalotioneínas no epidídimo, a maior susceptibilidade da região da cauda a danos por metais se deve à grande expressão da metalotioneína do tipo II. Esta proteína está presente na membrana do aparelho de Golgi e está envolvida na minimização dos efeitos tóxicos dos metais no organismo, ao se ligar a eles através dos grupos tiois dos resíduos de cisteína que compõem sua molécula (WONG et al., 2010). Essa proteína também é expressa nas regiões da cabeça e do segmento inicial, porém em menor quantidade (CYR et al., 2001). Dessa maneira, exposição prolongada a grande quantidade de metais podem ultrapassar a capacidade de ligação das metalotioneínas, causando assim lesões celulares até degeneração tecidual (WONG et al., 2010).

Com relação ao cádmio, observou-se que os diâmetros tubular e luminal na região da cauda aumentaram significativamente quando administrado 1,1 e 1,4mg/Kg de peso corporal do sal, em relação ao controle. Este resultado se deve provavelmente à desestabilização das membranas das células principais do epitélio, gerando redução da atividade celular e incapacidade de reabsorção do fluido luminal, o que pode ter causado

a redução do percentual de epitélio e o aumento dos referidos diâmetros. Sabe-se que a região da cauda apresenta grande quantidade de aquaporinas do tipo 9, responsáveis pela reabsorção de água necessária para aumentar a concentração de espermatozoides no lúmen (HERMO & SMITH, 2011). ILKES et al. (2004) descreveram que uma das ações tóxicas do cádmio é o aumento dos radicais livres, que geram danos oxidativos em DNA, lipídios de membranas e proteínas, o que, por sua vez, pode causar desestabilização na integridade das membranas celulares provocando disfunções destas células.

O maior percentual de lúmen sem espermatozoides nas três regiões dos epidídimos dos animais tratados com cádmio, na maior dosagem, pode ser justificado a partir dos resultados obtidos na análise testicular feita por CUPERTINO (2012), nos mesmos animais experimentais. Neste estudo, observaram-se alterações histopatológicas severas, como descamação e necrose do epitélio germinativo, que prejudicaram a produção espermática. PARIZEK (1957) observou que a administração subcutânea de cloreto de cádmio em ratos machos levou à destruição do epitélio seminífero e do tecido intersticial. Como a presença de espermatozoides no epidídimo é totalmente dependente da produção espermática no testículo, houve redução significativa da quantidade de espermatozoides no lúmen de todo o duto epididimário.

Em relação ao chumbo, animais tratados apresentaram redução nos diâmetros, tubular e luminal, da cauda e redução da altura do epitélio nas regiões da cabeça e cauda, em relação ao controle. COSTA (2013), analisando testículos dos animais tratados com chumbo e usados no presente experimento, observou redução na produção de testosterona, na altura e no percentual de epitélio seminífero, aumento no percentual de lúmen tubular e no diâmetro tubular, redução na população de células germinativas, bem como redução na produção espermática diária por testículo e por grama de testículo. Sabe-se que o peso do epidídimo e os diâmetros do seu duto são regulados pela manutenção da produção de testosterona e pela presença de espermatozoides no lúmen (ROBAIRE et al., 1998). Portanto, as alterações testiculares justificam os achados epididimários nestes animais.

Para o zinco, os resultados morfométricos no presente trabalho, como redução da altura do epitélio no segmento inicial em animais tratados com 20mg/Kg de peso corporal de sulfato de zinco, na região da cabeça dos animais tratados com 10mg/Kg de peso corporal, e na cauda, nos animais tratados 5mg/Kg de peso corporal do sal, assim como a redução dos diâmetros tubular e luminal nos animais tratados 20mg/kg de peso

corporal, são controversos ao considerar seu papel importante para a função epididimária. O zinco é um elemento essencial para a fertilidade de machos de mamíferos (MERRELLS et al., 2009), com participação ativa na síntese do DNA, no metabolismo dos ácidos nucleicos e de proteínas. MAFRA et al. (2004) e SENA & PEDROSA (2005) citam que células em rápido processo de divisão, crescimento ou síntese são particularmente afetadas pela deficiência deste elemento. Em humanos, o zinco é necessário para a formação e maturação de espermatozoides, na ovulação e para a fertilização. Sabe-se que o zinco, em baixas concentrações, participa do processo da espermatogênese, ao ser incorporado no flagelo das espermátides alongadas, se mantendo neste local também nos espermatozoides. No entanto, quando em altas concentrações, ele inibe a multiplicação de células germinativas e causa fragmentação da membrana celular e nuclear (FRANÇA et al., 2005).

SILVA (2011), avaliando os testículos dos animais tratados com zinco nas mesmas condições do presente trabalho, não observou alterações nos parâmetros morfométricos gonadais, o que corrobora para a ausência de alterações na maior parte dos parâmetros epididimários analisados.

5. Conclusões

A região da cauda foi mais susceptível aos metais administrados, seguido da região da cabeça e do segmento inicial.

O cádmio foi o metal que causou mais alterações no epidídimo o que refletiu negativamente na morfometria epididimária.

O chumbo atingiu principalmente a cauda, reduzindo altura epitelial e seus diâmetros, causando também diminuição da altura e proporção do epitélio na região da cabeça.

O zinco não alterou a maioria dos parâmetros morfométricos avaliados, causando pequenas alterações na altura do epitélio das regiões analisadas, bem como redução nos diâmetros na região da cauda.

6. Referências Bibliográficas

APOSTOLI, P.; CATALANI, S. Metal ions affecting reproduction and development. *Met. Ions Life Sci.* 8, p. 263-303, 2011.

- COX, C. Masculinity at risk. *J. Pestic. Reform.* 16, p. 2-7, 1996.
- COSTA, K. L. C. Danos testiculares em ratos submetidos a diferentes doses de chumbo. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.
- COOPER R. L.; KAVLOCK R. J. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of evidence overview. *J. Endocrinol.* 152, p. 159-166, 1997.
- CUPERTINO, M.C. Danos Oxidativos e Histológicos Crônicos Causados pelo Cádmio no Fígado e na Espermatogênese de Ratos. Dissertação Biologia Animal, UFV. 2012.
- CYR, D. G.; DUFRESNE. J.; PILLET, P. S.; ALFIERI, J.; HERMO, H. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. *J. Androl.* 22, 2001.
- FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V.; SAXENA, G. Arsenic, cadmium and lead. In: Gupta, R. C. (Ed.). *Reproductive and developmental toxicology.* Academic Press, London. p. 416-438, 2011.
- FRANÇA, L. R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology.* 63, p. 300-318, 2005.
- GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38 p. 232–242, 2003.
- HERMO, L.; SMITH, C. E. Thirsty Business: Cell, Region, and Review Membrane Specificity of Aquaporins in the Testis, Efferent Ducts, and Epididymis and Factors Regulating Their Expression. *J Androl.* 32, p. 565–575, 2011.
- ILKES, A.; SUZEN, H. S.; AYDIN, A.; KARAGAYA, A. The oxidative DNA base damage in testes of rats after intraperitoneal cadmium injections. *Biometals* 17, p. 371-377, 2004.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, p. 137-1, 1965.
- LERDA, D.; REZZI, R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Mutat. Res.* 262, p. 47-50. 1991.
- LIU, J.; GOYER, R. A.; WAALKES, M. P. Toxic effects of metals. *Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons.* p. 931-979, 2008.

- MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. The importance of zinc in human nutrition. *Rev. Nutr.* 17, p. 79-87, 2004.
- MERRELLS, K. J. BLEWETT, H., JAMIESON, J. A., TAYLOR C. G., SUH, M. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats. *Brit. J. Nutr.* 102, p. 226-232, 2009.
- NELSON, C.; BUNGE, R. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil. Steril.* 25, p. 503-507, 1974.
- PASQUALOTTO, F. F.; LOCAMBO, C. V.; ATHAYDE, K. S.; ARAP, S. Measuring male infertility: epidemiological aspects. *Rev. Hosp. Clín.* 58, p. 173-178, 2003.
- PARIZEK, J., ZAHOR, Z. Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 177 p. 1036-1037, 1956.
- PETRELLI, G.; MUSTI, M.; FIGA-TALAMANCA, I. Exposure to pesticides in greenhouses and male fertility. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* 22, p. 291-295. 2000.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, MC. *Knobil and Neill's Physiology of reproduction* 3 ed, 22, p. 1071-1148, 2006.
- SENA, K. C. M. ; PEDROSA, L. F. S. Zinc supplementation and its effects on growth, immune system, and diabetes. *Rev. Nut.* 15 (1) p. 80-82, 2005.
- SOARES M. R. Coeficiente de Distribuição (Kd) de Metais Pesados em Solos do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004 .
- SILVA, A. T. C. Efeito do Zinco Isolado ou Associado à Vitamina E sobre Testículos de Ratos Wistar Adultos Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- WONG, E.W., CHENG, C.Y. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* 32 p. 290-299, 2010.

