

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

JANAINA TRINDADE PIAGETTE

**PRÉ-TRATAMENTO COM HIDROLISADO DE CLARA DE OVO PREVINE OS
DANOS REPRODUTORES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO?**

**Uruguiana
2019**

JANAÍNA TRINDADE PIAGETTE

**PRÉ-TRATAMENTO COM HIDROLISADO DE CLARA DE OVO PREVINE OS
DANOS REPRODUTORES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO?**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Giulia A. Wiggers

Co-orientador: Prof. Dr. Franck M. Peçanha

Uruguaiana
2019

Piagette, Janaina Trindade.

PRÉ-TRATAMENTO COM HIDROLISADO DE CLARA DE OVO PREVINE OS DANOS REPRODUTORES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO? / Janaina Trindade Piagette. – 17/12/2019. 69 p.

Orientador: Giulia Alessandra Wiggers

Coorientador: Franck Maciel Peçanha

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, 17/12/2019.

1. Efeito do cádmio sobre o sistema reprodutor....
2. Hidrolisado de Clara de ovo e sistema reprodutor.
3. Efeito protetor do EWH sobre os efeitos do Cádmio no sistema reprodutor de ratos...

JANAINA TRINDADE PIAGETTE

**PRÉ-TRATAMENTO COM HIDROLISADO DE CLARA DE OVO PREVINE OS
DANOS REPRODUTORES INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO?**

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

Dissertação de mestrado defendida e aprovado em: 17 de dezembro de 2019.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Giulia Alessandra Wiggers
Orientadora – PMPGCF / UNIPAMPA

Prof. Dr. Franck Maciel Peçanha
Co-orientador – UNIPAMPA

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

Dr^a. Caroline Silveira Martinez
Université de Angers

*A minha família, meus pais Raul e
Vânia, meus irmãos Raphael, Raul Jr e
Jean, por serem meu porto seguro e a
minha motivação para seguir em
frente. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Bom primeiramente, quero muito agradecer... porque é muito bom ser grato, e hoje concluo mais uma etapa na minha caminhada, e com certeza que sozinha jamais conseguiria estar aqui, defendendo essa dissertação. Então começo agradecendo:

À Deus, nunca me desamparar, por ser minha justiça e minha fortaleza e sempre ser o meu refúgio nas horas de muita escuridão, muita obrigada, Paizinho! Por não ter deixado eu desistir! E ter me abençoado.

Aos meus pais Raul e Vânia, por desde cedo serem exemplos de resiliência e como minha mãe que se dedicou em triplas jornadas diárias entre madrugadas ido para o trabalho, faculdade sendo uma mãe exemplar, hoje agradeço muito a vocês por me ensinarem os princípios, por me mostrarem que devemos ter a consciência e mãos limpas e nunca deixar de sonhar. Obrigada! sempre estiveram ao meu lado me apoiando com cada palavra de carinho e afeto, sem vocês comigo nada teria sentido.

Aos meus irmãos, que sempre me motivaram e colaboraram muito por essa etapa da minha vida que não começou com o mestrado... começou há tempos atrás! que vocês possam trilhar caminhos ainda melhores que os meus e nunca deixe ninguém fale que vocês não podem algo! Levantem a cabeça e foco no horizonte... obrigada! por serem parte também desse sonho que hoje se concluí

Ao companheiro Wagner, por estar comigo segurando minha mão no olho do furacão e ser meu companheiro, apesar de não gostar de acordar cedo mas mesmo assim o fez muitas vezes, obrigada por me ajudar, ser dedicado e me mostrar que o caminho é mais leve quando dividimos o fardo diário com alguém; obrigada por fazer os meus dias mais leve, por me fazer rir de muitas coisas que me fizeram chorar. Te admiro muito, a ti meu sincero amor.

À os meus sogros Sandra Helena e Carlos Alberto, agradeço pela compreensão e estímulo nos bons e maus momentos, obrigada por tudo, obrigada pela compreensão e apoio nessa trajetória, por compreenderem o meu cansaço e me ajudarem muito a seguir em frente, minha gratidão a vocês e isso se estende ao meu cunhado Ewerton.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Giulia Wiggers e ao coorientador Prof. Dr. Franck Peçanha, o meu agradecimento, sem seu estímulo e compreensão nesse momento não teria chegado até aqui, desculpa qualquer coisa nesses longos quase 7 anos, meu muito obrigada por ter me dado a oportunidade e por estar sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos e experiência, pelo apoio e ½ de paciência, muito obrigada pelo apoio, não tenho palavras para

agradecer por tudo mesmo! E ao Prof. Franck meu muito obrigada, bixo! Pelo conhecimento compartilhado que nos prepara para vida e por exemplo de profissional que és! Obrigada.

Ao meu GPFisCar, obrigada pelo apoio e colaboração ao pessoal que vai estar sempre no meu coração, meus colegas de bancadas José meu carinho imenso por tudo, és merecedor pelo grande profissional que és e também pelo colega dedicado, mesmo rabugento e comilão, além de ter me eliminado do reality show, tu és nosso Eudes, José que tens a missão de transformar o espaço que ocupas. Obrigada! Aos meus ICs lindos e que me deixam muito orgulhosa por fazer parte dessa construção, obrigada! Marizabel, Pedro, Eduardo, Marina, Melissa, Sâmia, Camila Herrera, a virginiana nata Camila Moro meu orgulho também e o Leandro por sempre ser prestativo e competente, muito, muito, muito obrigada! Obrigada Edna por vestir a camiseta e entrar no barco comigo. Obrigada também a Carol e Paola em especial a Danize por ser nossa musa inspiradora e agora ser um sucesso.

O meu muito obrigada, em especial a Alyne, minha companheira, colega de bancada, amiga, comadre e paciente nas horas vagas, lembro até hoje que tudo começava 5 da manhã com a nossa playlist no spotfy , obrigada por não deixar a peteca cair, por me levantar muitas vezes , por me incentivar e por nunca ter me abandonado quando todos tinham feito isso. Gratidão por dividirmos os mesmos sonhos, você é luz, você traz luz.

Aos meus amigos que me acompanharam nessa jornada sempre com a nossa sagacidade juvenil Teka, Danize, Patrícia, Sue-elle, Nitinha e Matheus, vocês sem dúvidas fizeram o caminho ficar bem mais leves e engraçados, principalmente com os memes diários no grupo. Em especial a minha amiga-irmã Juliana, minha gratidão, por estar do meu lado, por ser companheira, por ser irmã durona, que fala na cara sem meias verdades, obrigada por me ajudar e fazer parte da construção da minha vida. Obrigada por ser meu apoio, minha segunda família, a irmã que escolhi.

Ao grande chefe Prof. Dr. Dalton, por ser essa fonte de conhecimento, muito obrigada por nos inspirar a sempre buscarmos mais, por nos desafiar a pensar fora da caixa e sermos o diferencial nesse mundo, muito obrigada.

À pesquisadora Marta Miguel e sua equipe do CSIC, por acreditarem em nosso trabalho, investirem e ajudarem na elaboração de nossos experimentos. Obrigada por tudo!

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade no programa e por todo auxílio dado pelos funcionários e professores. Aos meus colegas de pós-graduação, também companheiros nessa caminhada, obrigada por serem ótimos colegas.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

O cádmio (Cd) é um metal pesado cuja exposição humana é crescente pelo consumo de água, alimentos contaminados e fumaça de cigarro. Há evidências do dano causado pelo Cd a vários órgãos e sistemas, no entanto, os mecanismos e possíveis rotas terapêuticas são pouco estudados. Nesse contexto, hidrolisado da clara de ovo (EWH) um alimento funcional com potencial antioxidante, anti-inflamatório, vasodilatador e inibidor da enzima conversora da angiotensina, pode ser benéfico contra os efeitos do Cd nos diversos sistemas orgânicos. Assim, este estudo objetiva investigar se o consumo de EWH é capaz de atuar nos distúrbios no sistema reprodutor induzidos pela exposição ao Cd em ratos. Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em: a) Controle - água de beber por gavagem + salina i.p por 28 dias; b) CdCl₂ - água de beber por gavagem por 28 dias + CdCl₂ 1mg/Kg i.p. nos últimos 14 dias; c) Hidrolisado - EWH - 1g/Kg/dia, via gavagem + salina i.p por 28 dias; d) EWH+CdCl₂ – pré-tratamento por 14 dias com EWH - 1g/Kg/dia, via gavagem + salina ip e mais 14 dias com CdCl₂ - 1mg/Kg i.p. + EWH - 1g/Kg/dia, via gavagem. Foi analisado o peso do animal e dos órgãos reprodutores, produção diária de espermatozóide, contagem espermática, tempo de trânsito no epidídimo, motilidade e morfologia espermática; análise histológica do testículo e do epidídimo e análise da integridade de membrana (IM). Como biomarcadores de estresse oxidativo foram medidos: peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio e níveis de grupos tiol não proteicos, capacidade antioxidante, atividade da SOD, glutathione peroxidase (GPx) e os níveis de catalase (CAT). Os dados foram analisados utilizando-se o análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Bonferroni ($P < 0,05$), quando apropriado teste de Kruskal-Wallis. Os achados demonstram que o pré-tratamento com EWH reduziu os danos de membrana, melhorou a motilidade espermática, manteve os níveis de produção diária de espermatozoides e preveniu as anormalidades morfológicas induzidas, assim como demonstrou efeito antioxidante pela redução dos níveis de peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio induzidas pela exposição ao Cd em testículo e epidídimo. A atividade enzimática da SOD, CAT e GPx foi aumentada nos animais expostos ao Cd e o pré-tratamento com EWH não alterou este parâmetro em testículo, porém em epidídimo a elevação dos níveis de SOD e GPx promovidos pela exposição ao Cd foi revertida pelo pré-tratamento com EWH. Conclusão: O EWH, um alimento funcional, pode ser considerado uma ferramenta terapêutica alternativa útil na proteção contra os danos tóxicos induzidos pelo CdCl₂ no sistema reprodutor masculino de ratos..

Palavras-Chave: Cádmio, Hidrolisado de Clara de Ovo, Estresse Oxidativo, Sistema reprodutor.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a heavy metal and the human exposure is increasing through the consumption of water, contaminated food and cigarette smoke. There is evidence of damage caused by Cd to various organs and systems, however, the mechanisms and possible therapeutic routes are poorly studied in the various systems affected. In this context, egg white hydrolyzate (EWH), a proven antioxidant, anti-inflammatory, vasodilator and angiotensin-converting enzyme inhibitor, may be beneficial against the effects of Cd on various organ systems. Thus, this study aims to investigate whether the consumption of EWH is able to act on reproductive system disorders induced by exposure to Cd in rats. For this, male Wistar rats were divided into: a) Control - drinking water by gavage + distilled water i.p for 28 days; b) CdCl₂ - drinking water by gavage for 28 days + distilled water i.p + CdCl₂ 1mg/kg i.p. in the last 14 days; c) Hydrolyzed - EWH - 1g/kg/day, by gavage + distilled water i.p for 28 days; d) EWH + CdCl₂ - pre-treatment for 14 days with EWH - 1g/Kg/day, by gavage + distilled water ip and 14 days with CdCl₂ - 1mg/kg i.p. + EWH - 1g/Kg/day, by gavage. In the reproductive system, organ weight, daily testicular sperm production, sperm count, epididymis transit time, motility and sperm morphology were performed; histological analysis of the testis and epididymis and analysis of membrane integrity (MI). As oxidative stress biomarkers were measured: lipid peroxidation, reactive oxygen species and non-protein thiol group levels, antioxidant capacity, SOD, CAT activity, and glutathione peroxidase (GPx). Statistical analysis was performed using unpaired t-test and one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post-hoc test ($P < 0.05$), when appropriate Kruskal-Wallis test. Findings demonstrate that pre-treatment with EWH reduced membrane damage, improved sperm motility, mentions daily sperm production levels and prevented induced morphological abnormalities, as well as demonstrated antioxidant effect by reducing lipid peroxidation and species levels. reactive oxygen levels induced by exposure to Cd in the testis and epididymis. The enzymatic activity of SOD, CAT and GPX was increased in animals exposed to Cd and pretreatment with EWH did not change this parameter in testis, but in epididymis the elevation of SOD and GPx levels promoted by exposure to Cd was reversed EWH treated rats. Conclusion: EWH, a functional food, can be considered as a useful alternative therapeutic tool to protect against CdCl₂-induced toxic damage in the male reproductive system of rats.

Keywords: Cadmium, Egg White Hydrolyzate, Oxidative Stress, Reproductive System.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 O metal Cádmio.....	1
1.2 Toxicocinética do Cádmio.....	8
1.3 Toxicidade do Cádmio	11
1.4 Toxicidade do Cd no Sistema Reprodutor	14
2 Alternativas terapêuticas contra os danos promovidos pelo Cd.....	18
2.1 Alimentos funcionais	19
2.2 Hidrolisado da Clara do Ovo	23
3 Justificativa	27
4 Objetivos	29
4.1 Objetivo geral.....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5 Métodos.....	30
6 Resultados	37
7 Discussão	49
8 Conclusão	56
9 Perspectivas Futuras.....	57
10 Referências Bibliográficas.....	58
ANEXO I – Certificado de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos do pré-tratamento do EWH sobre o consumo de água, ração, peso corporal e de órgãos reprodutivos após exposição ao CdCl ₂	32
Tabela 2. Efeito do pré-tratamento com EWH na contagem espermática em testículo e epidídimo, produção diária de espermatozoides e tempo de trânsito espermático após exposição ao CdCl ₂	41
Tabela 3. Os efeitos do pré-tratamento com EWH sobre a morfologia espermática após 14 dias de exposição ao CdCl ₂	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Cádmio, elemento 48.....	1
Figura 02: Minerais naturais fontes de Cádmio.....	2
Figura 03: Ciclo natural, antropogênico e biogeoquímico do Cádmio.....	4
Figura 04: Habitante da região de Toyama com doença de Itai-Itai.....	6
Figura 05: Esquema representativo dos efeitos tóxicos do Cd na saúde humana	9
Figura 06: Esquema ilustrada como Cd induz dano a barreira hematotesticular e degeneração de complexos celulares nas junções no epitélio seminífero	17
Figura 07: Esquema ilustra exemplos de alimentos, componentes e abordagens tecnológicas consideradas como alimentos funcionais e utilizados em seu desenvolvimento.....	20
Figura 08. Corte transversal do ovo e suas estruturas.....	24
Figura 09: Esquema representativo dos grupos experimentais.....	31
Figura 10: Desenho esquemático do processo de obtenção do Hidrolisado da clara do ovo (EWH).....	32
Figura 11: Peso dos animais, consumo de ração e água durante as semanas de tratamento. Linha pontilhada indica início da administração de 7, 14 e 21 dias no mesmo grupo.....	38
Figura 12: Efeitos do EWH sobre a motilidade espermática após a exposição com o Cd.....	42
Figura 13: Efeitos do pré-tratamento com EWH na integridade da membrana espermática de ratos expostos a Cd por 14 dias.....	45
Figura14: Efeitos do pré-tratamento com EWH nos biomarcadores do estresse oxidativo após exposição ao CdCl ₂ . Espécies reativas - EROS (UF) e peroxidação lipídica (TBARS - nmol MDA/mL) em testículos e epidídimo.....	46

Figura 15: Efeitos do pré-tratamento com EWH sobre as defesas antioxidantes após exposição ao CdCl_2 . Capacidade Antioxidante total (FRAP – Trolox – mM/mL), atividade de SOD (UI), atividade de Catalase (Unidades / mg de proteína), em testículos e epidídimo..... 47

Figura 16: Efeitos do pré-tratamento com EWH sobre as defesas antioxidantes após exposição ao CdCl_2 . Atividade de Glutathione Peroxidase (nMol / min / mg de proteína), nível de GSH (nmol GSH / tecido), e grupo tióis não protéicos (NPSH) (nmol GSH / tecido) em testículos e epidídimo. 48

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O metal cádmio

O cádmio (Cd) é um metal descoberto por Stromeyer em 1817 a partir de uma impureza no carbonato de zinco. Ocupa o segundo lugar do grupo IIB na tabela periódica, sua massa e número atômico são 112,411 e 48, respectivamente (TAN, 2000). Possui coloração branco-azulado, é maleável e dúctil, e devido à sua densidade de $8,65 \text{ g/cm}^3$, e ponto de fusão e ebulição de $320,9^\circ \text{ C}$ e 767° C respectivamente é considerado um metal relativamente volátil (NRIAGU, 1980).

A temperatura ambiente não reage com oxigênio atmosférico, porém na presença de umidade ou aquecimento em altas temperaturas é oxidado resultando na liberação de vapores rubro-amarelados de óxido de Cd e hidrogênio. É também facilmente alterado na presença de ácidos como, por exemplo, nos alimentos (ácidos orgânicos) (AGENCY, 2008) e podem reagir fortemente com oxidantes poderosos como enxofre, cério, selênio, telúrio e sulfato de sódio. O Cd e seus compostos (óxidos, carbonatos, hidróxidos, sulfatos) catalisam um grande número de reações, em particular as reações de polimerização. O nitrato de cádmio é um oxidante forte que pode reagir com substâncias orgânicas facilmente combustíveis e produtos redutores (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 2009; KIRK-OTHMER, 2007).



Figura 01: Cádmio, elemento 48. (disponível em:

<https://www.agchemigroup.eu/en/blog/post/cadmium-phosphate-fertilizer-part-1-history>).

O Cd é encontrado na natureza na forma de minerais como a greenockita ou haleyley (as formas hexagonais e cúbicas do sulfeto de cádmio), otavita (carbonato de cádmio); monteponite (óxido de cádmio); cadmoselite (seleneto de cádmio hexagonal); e saukovita (metacinnabar cúbico de cádmio), geralmente ocorre em pequenas quantidades associadas ao minério de zinco, como a esfalerita (ZnS), sendo assim quase todo o Cd é obtido como subproduto no tratamento de minério de zinco, cobre e chumbo (ICDA,2013; MORROW, 2000)

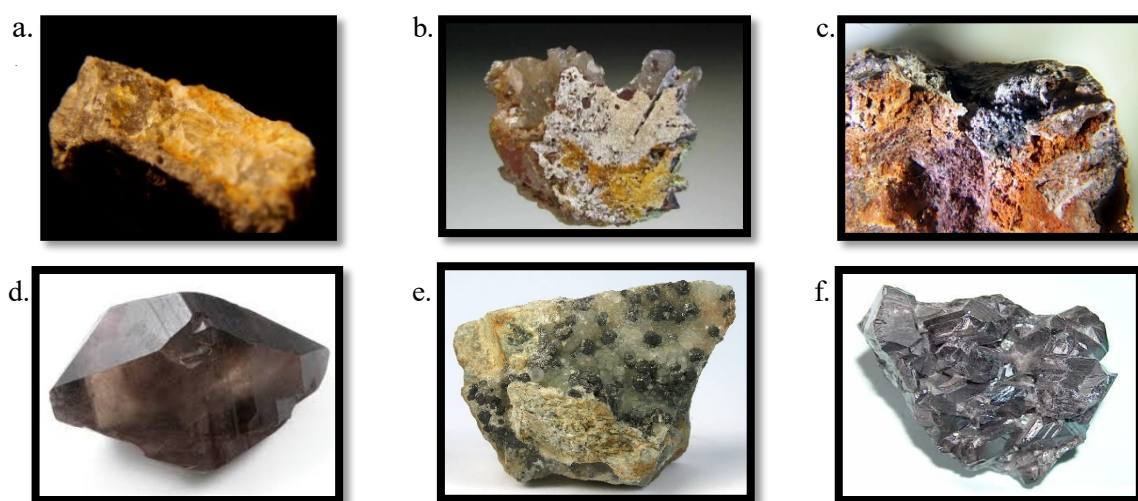


Figura 02: Minerais naturais fontes de Cádmio: a. Greenockita; b. Otavita; c. Monteponite; d. Cadmoselite; e. Saukovita; f. Esfalerita (Fonte: <https://pt.wikipedia.org>).

Em relação às fontes de exposição sabe-se que atividade industrial tem destaque excedendo 10 vezes mais do que o ciclo natural deste metal (SINGH;STEINNES, 1994). As reservas mundiais estão estimadas em 17000 toneladas/ano, sendo a maioria (75%) do Cd utilizado pela indústria é destinado a produção de baterias Ni-Cd ou pilhas elétricas alcalinas, 13% para pigmentos das colorações vermelho escuro e amarelo, 7%, para revestimento (recobrimento de aço e ferro) e 4% para estabilizadores em PVC (CARDOSO et al., 2001). Assim, pelo descarte incorreto destes materiais em especiais baterias, o lixo urbano tem se tornado uma fonte importante de contaminação por este metal (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Além disto, o Cd produzido é comercialmente recuperado como subproduto durante a fundição de minérios de zinco, que é considerado um componente isomórfico, e pequenas quantidades adicionais de Cd são recuperados durante o processamento de ligas metálicas como

chumbo-zinco, zinco-cobre e outros complexos. Outros usos como a fabricação de fotocélulas e células solares (CdSO_3), fungicidas (CdCl_2), aditivos na indústria têxtil, absorvedor de nêutrons em reatores nucleares, amálgamas dentários ($1\text{Cd}:4\text{Hg}$) e barras de controle de reatores são descritos (ATSDR, 2011).

A relação do Cd com a agricultura reside no mau uso do solo e uso inadequados dos agrotóxicos contendo este metal (AZEVEDO; CHASIN, 2003) que resultam na contaminação do solo e água. Esta contaminação eleva a captação do Cd por hortaliças como folha verde e tubérculos (batata, cenoura) e outras leguminosas cultivadas para consumo humano. A ingestão alimentar é uma das principais fontes de exposição ao Cd em indivíduos não fumantes. Altas concentrações deste metal são encontradas em frutos do mar como crustáceos, cereais como arroz e trigo, sementes como cacau e também em baixas concentrações como na carne, leite e ovos (JARUP et al., 2009). As concentrações variam de acordo com o tipo de alimento e o nível de contaminação ambiental.

No ciclo natural do metal a disponibilidade aquática do Cd em sua forma iônica (Cd^{2+}) e sua absorção dependem de fatores ambientais envolvidos como o pH, temperatura, dureza da água e teor da matéria orgânica (WHO, 2008). A biodisponibilidade e a concentração no ambiente que excedem a demanda fisiológica, não apenas adicionam os efeitos tóxicos ao Cd, como também podem entrar na cadeia alimentar e ser biomagnificados representando uma ameaça potencial à saúde humana (SUGIYAMA, 1994), como representado na Figura 03.

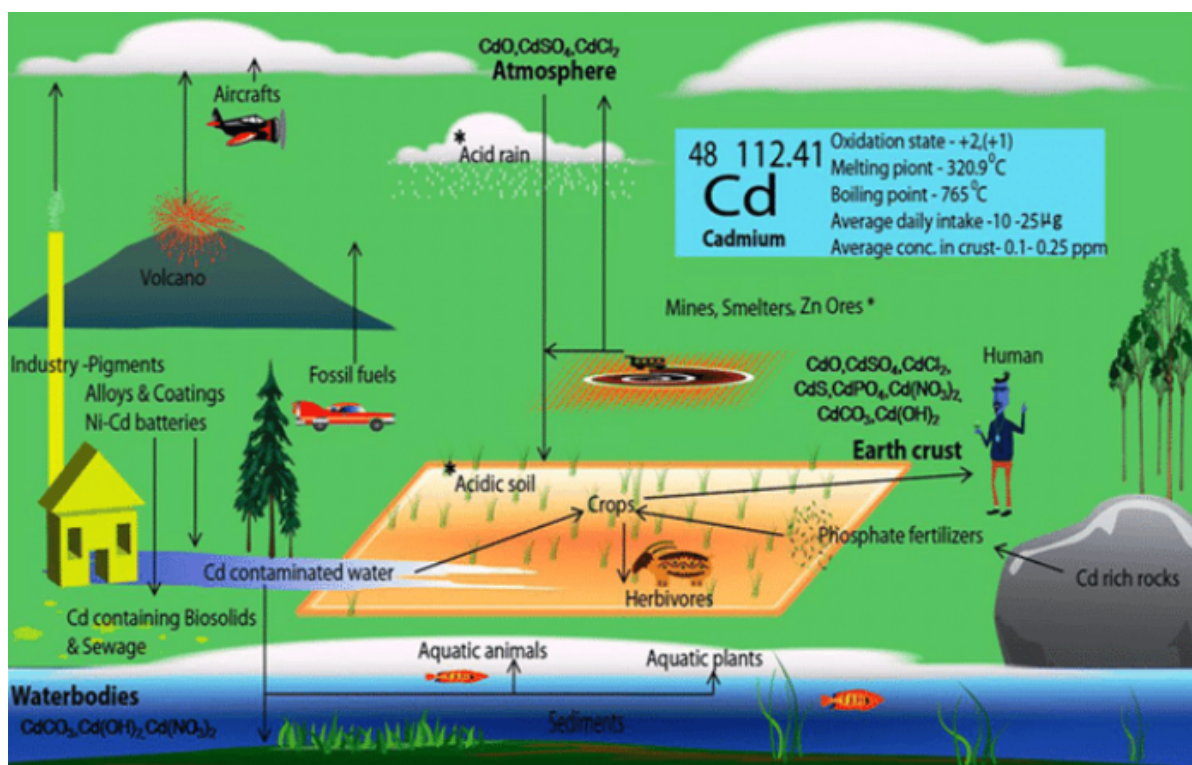


Figura 03: Ciclo natural, antropogênico e biogeoquímico do Cádmio: mostrando o transporte de Cd na atmosfera (Retirado de Sebastian et al., 2014).

A toxicidade do Cd é vinculada a interações competitivas com outros íons, como o cálcio (Ca^{+2}) na concorrência de sítios ativos, ou na diminuição da toxicidade através da complexação com ânions orgânicos ou inorgânicos (MCGEER; NIYOGI; SMITH, 2012).

Estima-se que as concentrações média de Cd na crosta terrestre de fontes naturais sejam de aproximadamente 0.15 mg / Kg - 150 µg / Kg de solo. Outras estimativas de concentração para este metal são: ar 0.01-1.0 ng / m³; água doce 0.01 - 0.07 µg / L; água do mar 0.001 - 0.075 µg / L; água da chuva 0.0001–0.001 µg / L; e cerca de 0.0001- 0.0002 µg / Kg no gelo antártico (NOKES, 2014; KIM, 2005).

A emissão por fontes antropogênicas é proveniente principalmente da atividade industrial, e estima-se que cerca de 4000 a 13000 toneladas por ano de Cd seja emitido no ar. Em países da União Européia em torno de 85 a 90% do Cd emitido no ar 17.5% é proveniente da combustão de petróleo, 15.3% das indústrias de ferro e aço, 13.4% da combustão de carvão e 17.5% da queima de resíduo e lixo urbano (WHO, 2007). No Brasil, não há registros claros destes percentuais de emissão, embora tenhamos uma forte indústria de aço no país.

No entanto, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da norma 357/05, dispõe que 0,04 mg/L como valor máximo permitido de Cd total em águas salinas, já em, águas não salinas, a Norma 357/05 indica valores de máximos de Cd 0,01 mg/L e 0,001 mg/L para afluentes de classe 1 e classe 3, respectivamente. A norma 430/11 do CONAMA complementar à 357/05, delibera que a concentração de 0,2 mg/L de Cd total como a forma que é lançado resíduos para efluentes em corpos hídricos. No caso de águas subterrâneas, a concentração máxima permitida de 0,005mg/L de Cd (CONAMA 420/09), o mesmo que as Portarias do Ministério da Saúde 518/04 e 2914/11 regulamentam o padrão de potabilidade da água para consumo humano.

Estudos relatam a contaminação de Cd sobre água potável em concentrações maiores que chegam a trinta vezes o permitido que em diversos lugares no mundo como no Sri Lanka que é de aproximadamente 0,00029 - 0,0007 mg/L (WASANA et al., 2016), na bacia do rio Laizhou, na China de 0.0008 - 0,628mg/L (XU et al., 2017), no rio Tietê em São Paulo é 14 µg/L e rio Paraná 5 µg/L (ALCANTARA et al, 2004).

Em relação a acidentes ambientais, é importante salientar o crime ambiental como ocorrido em Kamioka às margens do rio Jintsu, no Japão em 1930, onde os despejos industriais de jazida de zinco e chumbo causou a maior contaminação ambiental por Cd que se tem conhecimento. Naquela ocasião agricultores e consumidores de arroz, especialmente mulheres e pescadores foram acometidos de dores reumáticas e mialgias decorrentes da contaminação pelo metal (INABA et al., 2005; PAN et al., 2010).

A doença conhecida como Itai-Itai (*ouch-ouch*) foi caracterizada por fraturas ósseas e dores intensas, proteinúria, osteomalácia severa, osteoporose, disfunção renal, deficiências imunitárias, anemias e deformações ósseas graves como exemplificado na Figura 04 (MAINIER, 2006; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, 2010). Estudos realizados nas populações afetadas demonstraram uma relação dose-resposta entre a presença de Cd na urina e a taxa de mortalidade entre os indivíduos expostos (JARUP, 2002).

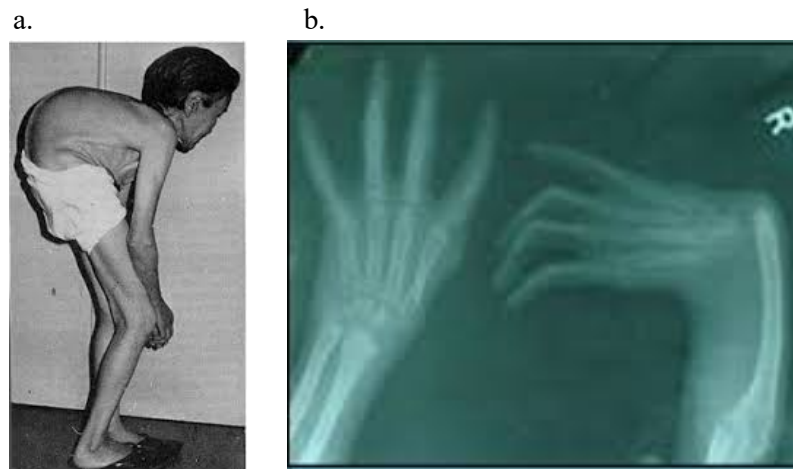


Figura 04: a. Habitante da região de Toyama com doença de Itai-Itai; b. Imagem radiológica de membros superiores de indivíduo acometido com a doença de Itai-Itai apresentando deformidades osseas e processos reumatóides (Fonte: KAJI, 2012 modificado).

No Brasil, em 1996, em Itaguaí (Rio de Janeiro), uma fábrica de baterias foi denunciada por despejar na região mais de 50 milhões de litros de água e lama contendo zinco e cádmio, contaminando manguezais com crustáceos que eram consumidos pelas populações locais e da cidade do Rio de Janeiro (GONÇALVES et al., 1996).

Outro crime ambiental ocorreu no Brasil em 2015 com o rompimento da barragem de rejeitos do Fundão, operada pela mineradora Samarco no município de Mariana, Minas Gerais, liberando cerca de 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração de ferro, causando até então o maior desastre ambiental no Brasil de origem minerária, caracterizando em 40 municípios afetados, nos dois estados, totalizando 663 km de corpos hídricos diretamente impactados, custando 19 vítimas fatais, milhares de famílias desalojadas e 11 toneladas de peixes mortos (IBAMA, 2015; JUSTIÇA GLOBAL, 2015).

Nas análises de contaminação das águas os níveis elevados de Cd nas amostras coletadas em alguns pontos da bacia do Rio Doce constatou-se concentrações de Cd em torno de 0.081 a 0,17mg/L (valor permitido 5µg/L). Em relação ao pescado oriundos destas águas, observou-se níveis de Cd elevado em linguado, peroá e camarão, com valores de 0.10, 0.15 e 0.50 mg/Kg respectivamente. Valores elevados de Cd podem ser associados a diversos efeitos adversos ao

organismo humano e danos imediatos a saúde, assim como a médio e longo prazo (ICMBio, 2016).

Em 2019, novamente por problemas estruturais na barragem de contenção dos rejeitos de uma mineradora localizada em Brumadinho, Minas Gerais causou aproximadamente 300 mortes que incluem moradores vizinhos a mineradora e funcionários locais da empresa. O desconhecimento da população sobre o conteúdo da lama que resultou em um crescente número de indivíduos expostos aos metais pesados. Além disso, os efeitos agudos da exposição ao Cd e também a outros metais como Al, Hg, Mg e Fe (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2019) estão relacionados a sintomas como tontura, diarreia, náusea e vômito devido o impacto ao sistema nervoso central, e adicionalmente, há probabilidade de ocorrência de epidemias como febre amarela e dengue, leptospirose e esquistossomose.

Conforme a WHO, o limite tolerável de ingesta mensal de Cd é de 0,25 mg/kg de peso corporal (WHO, 2010) e a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) é de 0,7 mg/ kg de peso corpóreo / semana, aplicável tanto para adultos como para bebês e crianças (WHO, 2007).

Além da exposição por acidentes, a ingestão de alimentos contaminados, representa mais de 90% da carga corporal individual de Cd na população de baixo espectro de contaminação (não fumantes), pois os níveis de Cd nos alimentos são especialmente elevados em ostras, mariscos e hortaliças advindas de solos contaminados podendo atingir valores entre os 0,1 e os 1 mg/ Kg. A carne, o peixe e os frutos podem conter entre 1 a 50 µg/ Kg, enquanto as sementes entre 0,01 a 0,15 mg/ Kg de Cd (REEVES; CHANEY, 2008). A água potável é outra fonte de Cd e estima-se que 2% a 4% do total da ingestão média diária sejam provenientes desta fonte (ATSDR, 2012).

Outros tipos de exposição podem ser ocupacional, a quantidade exposta depende do tamanho da partícula, da forma química e da solubilidade, além da quantidade do metal que é acumulado e o processo de depuração. Concentrações de Cd no sangue de trabalhadores expostos estão geralmente compreendidas entre 0,005 - 0,05 mg/L, mas já foram relatadas exposições em níveis entre 0,1 e 0,3 mg/L que foram associadas a problemas respiratórios (ROELS et al., 1983; HASSLER; LIND; PISCATOR, 1983).

No entanto, a principal causa de contaminação humana é relacionada à inalação da fumaça do cigarro (REBELO; CALDAS, 2016; BERNHOFT, 2013; UENO et al., 2010; AFRID et al., 2010; SATARUG et al., 2006; ABU-HAYYEH et al., 2001) que é considerado

um grave problema de saúde pública visto que mais de um bilhão de pessoas no mundo são fumantes e estima-se que esse total poderá chegar a dois bilhões em 2030 (WÜNSCH FILHO et al., 2010). No tabagismo, as folhas de tabaco podem acumular uma quantidade significativa de Cd.

Um cigarro pode conter de 0,001 a 0,002 mg de Cd, dependendo do tipo e da marca, onde cerca de 10% do teor de Cd é inalado e aproximadamente 50% desta substância chega aos pulmões. Estudos indicam que um indivíduo que fuma 20 cigarros por dia pode absorver até 0,001- 0,003 mg de Cd, sendo esta uma ingesta adicional, o que faz com que fumantes crônicos tenham mais que o dobro da carga corporal do metal comparado a pessoas não fumantes (WILLERS; GERHARDSSON; LUNDH, 2005; ARORA et al., 2008; MCELROY et al., 2007).

Dentre os efeitos tóxicos causados pelo Cd nos órgãos, os efeitos nos pulmões estão entre os mais danosos com alterações funcionais em células humorais (ASVADI et al., 1977; NATH, 1984; HIRANO; TSUKAMOTO; SUZUKI, 1990; HIRANO; YAMAGUCHI; KASAI, 1997), aumento na incidência de pneumonites e enfisema pulmonar em humanos (AMANUMA et al., 1987), alterações morfológicas e tumores pulmonares (NOGAWA, 2015).

1.2 Toxicocinética do Cádmio

O Cd apresenta três formas de absorção: respiratória, gastrointestinal e dérmica (Figura 05). A via respiratória se dá principalmente quando há exposição a fumaças e vapores contaminados com o metal, e dessa maneira, o pulmão é o local de deposição e dano tecidual. As concentrações e a quantidade inalada interferem diretamente na absorção por essa via (SCHWARTZ, 1994). Dessa forma, a absorção por inalação do Cd é variável, podendo ser de 10 a 30 % pelo pó de óxido de Cd e de 25 a 50 % nos casos de vapores de óxido de cádmio (ANDUJAR; BENEFÉ-COLAS; DESCATHA, 2010). E na via dérmica, é considerada não relevante (WESTER et al., 1992).

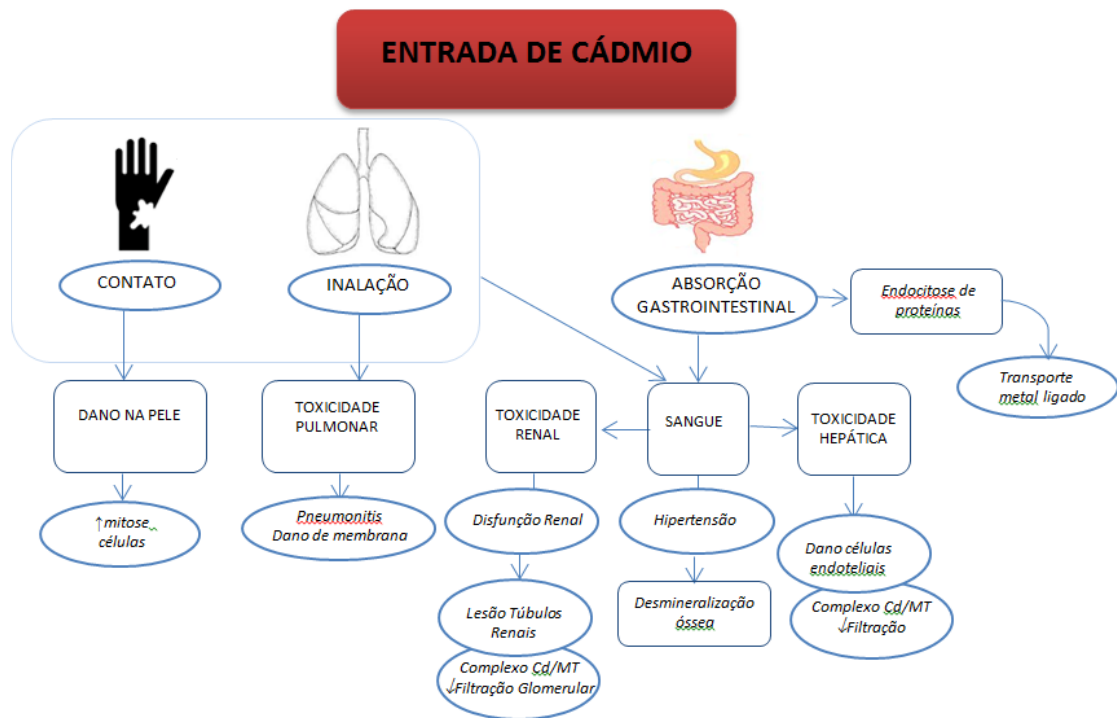


Figura 05: Esquema representativo dos efeitos tóxicos do Cd na saúde humana (Adaptado de HUANG et al. *Food Funct.*, 2017, 8, 1373 por Giulia Wiggers).

A absorção via trato gastrointestinal (TGI) pode variar entre os 5% e 8% e ser potencializada por uma dieta carente em cálcio, ferro ou proteína (ANDERSEN; NIELSEN; NORDBERG, 2004). O Cd quando carregado pela circulação sistêmica, é absorvido ligado à albumina que é degradada ou circula de forma livre e leva a indução de síntese de metalotioneínas (MT). A formação de complexos como Cd-metalotionina (Cd-MT) após a exposição ao Cd podem conter grupos tióis e, por conseguinte, bioacumulam-se em órgãos alvos, dando-lhes maior estabilidade e prolongando a meia-vida que pode chegar a 20 a 30 anos (KLAASSEN; LIU; DIWAN, 2009; KADE, 2012).

Nesse processo de absorção intestinal o Cd livre presente no lúmen é em parte carregado pela membrana basolateral dos enterócitos e entra na circulação sanguínea. O metal é transportado ligado a MT ou livre na albumina e eritrócitos. Por outro lado, no fígado, a captação de Cd pelos enterócitos é caracterizada pela ligação intercelular à membrana plasmática conjugada juntamente com GSH e difusão mediada por transportador de membrana

(DMT1) que desempenha uma ação importante na captação hepatocelular de Cd da circulação portal e sistêmica sob condições fisiológicas (TANDY et al., 2000; TRINDER et al., 2000); na segunda fase do processo de captação de Cd, as moléculas de Cd livres tem acesso intracelular através dos canais de Ca^{+} que atuam como homólogos iônicos facilitando a entrada do Cd e aumentando a captação do mesmo na membrana sinusoidal (DELRASO et al., 2003; BLAZKA; SHAIKH, 1991).

Para baixas doses, o Cd em uma maior quantidade de metal fica sequestrado na mucosa intestinal, principalmente complexado a MT, a eliminação do Cd resulta na descamação da mucosa que passa por um processo de renovação contínua. Embora em altas doses de Cd, quando a MT se encontra saturada, o Cd livre é carregado ao fígado, assim o metal atravessa a mucosa intestinal induzindo a síntese de MT utilizando o zinco e prevenindo a interação dos íons com macromoléculas funcionais essenciais para organismo (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994; NORDBERG, 2009).

A porção de Cd não absorvida é eliminada pelo TGI pelas fezes. Por sua vez, também pode eliminar Cd absorvido, que no caso dessa excreção biliar total e da proporção ligada à glutathione (GSH), que acabam sendo reduzidas na exposição em longo prazo quando uma grande parte de Cd no fígado se liga às MTs (NORDBERG, 2009) e após secreção de conjugados hepáticos de Cd pela biliar (ATSDR, 2009). Desta forma, pode ocorrer a eliminação através de cabelos e leite materno (HONDA et al., 2003; MENKE et al., 2009). O suor e a saliva são outras vias de excreção, porém, de menor relevância.

No entanto, a maior parte da excreção do Cd absorvido ocorre através da via urinária onde ocorre a liberação do metal quando complexado com a MT que a partir da quebra desta ligação, o metal gera um dano renal, lesando os túbulos proximais renais e estimulando a síntese de novas moléculas de MT em um ciclo de retroalimentação. Se a capacidade de produção de MT é ultrapassada ocorre, então, o aumento da excreção urinária do metal (IARC, 1993; ATSDR, 2009).

Relativamente, o tempo de excreção do Cd aumenta com a idade, contribuindo para o longo tempo de meia-vida no organismo deste metal e seus efeitos tóxicos se perpetuam mesmo com a redução parcial ou total da exposição (ATSDR, 2009; TORRES et al., 2018).

A bioacumulação de Cd nos órgãos ocorre principalmente em testículos, baço, coração, ossos, timo, glândulas salivares, epidídimo e próstata em exposição crônica

(KLAASSEN et al., 2009; JOSEPH, 2009). Possivelmente isso se deva, em grande parte, a alta concentração de MTs nesses órgãos porém é desconhecido mecanismo pelo qual ocorre este depósito, não se sabe se existe uma conversão metabólica direta como a oxidação, redução ou alquilação (OHRVIK, 2010). No entanto, quando o conteúdo de Cd excede a capacidade produção e ligação de MT, ocorre aumento da concentração de Cd livre e conseqüentemente causa efeitos deletérios sobre diversos tecidos (FRIBERG et al., 1986).

1.3 Toxicidade do Cádmio

O Cd não possui nenhuma função biológica, tem uma longa meia-vida de cerca de 10 a 38 anos (TAVARES; CARVALHO, 1992; OGA; DE SIQUEIRA, 1996; WHO, 2011) e baixa taxa de excreção (1 - 2 µg / dia) (GOERING; WAALKES; KLAASSEN et al., 1995; WHO, 2010).

Sua alta capacidade cumulativa nos tecidos orgânicos e seus efeitos são descritos em órgãos como fígado, rins, coração, vasos, ossos, cérebro, testículos. Os diferentes mecanismos de toxicidade estão relacionados em parte ao aumento do estresse oxidativo e diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (KOIZUMI; LI, 1992; MARETTOVÁ; MARETTA; LEGÁTH et al., 2015).

O fígado configura um dos órgãos mais suscetíveis aos efeitos deste metal. A hepatotoxicidade em células humanas e de ratos parece estar relacionada ao estresse oxidativo levando a apoptose celular, porém os mecanismos exatos pelos quais o Cd induz a hepatotoxicidade não são totalmente compreendidos (HUANG et al., 2017).

Após a ingestão, o Cd é transferido para o fígado, onde é absorvido pelos hepatócitos e desencadeia a síntese da MT. Considera-se que existem duas vias envolvidas na hepatotoxicidade aguda por Cd. São elas: a) relacionada à lesão primária é iniciada pela ligação de íons Cd a grupos sulfidril em moléculas na mitocôndria provocando aumento da permeabilidade da membrana e resultando como via final apoptose, e b) que é causada pela ativação das células de *Kupffer* liberando mediadores inflamatórios e citotóxicos que estimulam o transporte de aglomerados de monócitos e neutrófilos no fígado (NORDBERG, et al., 2000; HUANG et al., 2017).

Desta forma, evidencia-se a ação dos mediadores envolvidos na captação de Cd associados ao hepatoma em humanos e camundongos, inclusive as interações dos grupos

sulfidrilas com canais de Ca^{+} contribuíram para o acúmulo nos hepatócitos (DE SOUZA PREDES; DIAMANTE; DOLDER, 1997; FOTAKIS et al., 2006; MARTELLI et al., 2006; ZHANG et al., 2009). Em modelos de ratos expostos a Cd de forma aguda e crônica observa-se grande bioacumulação do metal no fígado, com evidente dano hepático relacionados ao aumento do estresse e infiltração de mediadores inflamatórios (MITRA et al., 2012; GO et al., 2015).

Assim como no fígado, os rins sofrem com os danos principalmente após a formação do complexo Cd-MT no fígado. Este complexo chega aos rins por meio da circulação sanguínea onde é reabsorvido nas células tubulares causando danos às células tubulares e reduzindo sua capacidade de reabsorção. Quando reabsorvido, o Cd é separado e complexa-se novamente a MTs em um processo contínuo de catabolismo de Cd-MT nas células tubulares. Os íons Cd livres se tornam mais tóxicos e o primeiro sinal de toxicidade é a diminuição na reabsorção de proteína de baixo peso molecular, como proteína de ligação ao retinol, β 2-microglobulina e enzimas como N-acetil- β -D-glucosaminidase (NORDBERG, 1983; NORDBERG; NORDBERG, 2000). A exposição crônica ao Cd também pode causar dano glomerular, albuminúria, depleção progressiva da taxa de filtração glomerular e insuficiência renal (KIPPLER et al., 2009; MIN et al., 2008).

Estudo em animais e em humanos, à longo prazo com altas doses de Cd resultou em fibrose renal que podem estar relacionadas com o potencial carcinogênico do Cd (SATARUG et al., 2010). Estudos *in vitro* demonstram que o aumento da diferenciação celular induzida após exposição ao Cd em células renais, como observado *in vivo*, provocou aumento da expressão gênica e de fatores de crescimento tumorais após a exposição ao Cd em ratos (KAMATA; HIRATA, 1999; WÄTJEN; BEYERSMANN, 2004).

Este metal também tem reconhecido efeito sobre os ossos, com mecanismos diretos e indiretos, aumentando a reabsorção óssea ou diminuindo a formação óssea, o que leva à perda óssea. Por outro lado, um mecanismo indireto produz um efeito secundário nos ossos por danos causados por Cd nos rins ou órgãos gastrointestinais, além da inibição da ativação da vitamina D3 nos rins, tem efeito crítico na absorção de íons Ca^{+2} no intestino (JIN et al., 2016). Associa-se o Cd à estimulação do fator de crescimento de fibroblastos que induz a fosfatúria levando a osteomalácia. Nos osteoblastos o Cd é tóxico, porém por mecanismos desconhecidos estimula os osteoclastos, induzindo assim a osteoporose (KIDO et al., 1991).

Como já mencionado anteriormente, na década de 1940, a doença Itai-Itai, descreveu a toxicidade do Cd pela presença de dor óssea intensa nos indivíduos afetados, com redução da mineralização óssea com alta incidência de múltiplas fraturas ósseas (OGAWA, 2004) além das deformações osséas e osteoporose. Aparentemente, esses fatores se combinam para induzir a calciúria (LIZOTTE et al., 2012), aumentar a reabsorção óssea e diminuir a densidade mineral óssea em crianças expostas ao Cd (SUGHIS et al., 2011). De mesma forma, em ratos foi observada a diminuição dos níveis séricos de osteocalcina em ratos expostos ao Cd (CHEN et al., 2012).

Uma vez que a principal via de exposição e absorção do Cd é a inalatória, via fumaça de cigarro ou exposição ocupacional, os pulmões são alvo deste metal. O tabagismo contribui com 40% a 60% do Cd absorvido nos pulmões humanos (ELINDER et al., 1976; GODT et al., 2006), devido a isto os fumantes de cinquenta anos de idade têm uma carga corporal de 30 mg de Cd, enquanto um não-fumante mostra um valor de 15 mg (WHO, 2010; UNEP, 2010). Os níveis séricos de Cd em fumantes habituais são normalmente 4-5 vezes maiores do que os de não fumantes (AZEVEDO; CHASIN, 2003). A exposição aguda por inalação ao Cd em concentrações acima de 5 mg/m³ podem resultar na degeneração das células epiteliais pulmonares e por conseguinte causar doenças pulmonares graves (ADAMS; HARRISON; SCOTT, 1969).

Em humanos e animais, a exposição crônica à inalação de Cd causa danos à função olfativa e ao epitélio nasal. Consequentemente, o desenvolvimento, a progressão e a exacerbação de doenças pulmonares estão relacionados com a inflamação induzida pelo Cd influenciados pela síntese e liberação de sinalizadores como leucotrienos / prostaglandinas, moléculas de adesão e citocinas (CHEN, 2012). O Cd promove a proliferação de células pulmonares por meio de uma rede imunossupressora que envolve a superexpressão da COX-2, que por outro lado, a interação da IL-6 com seus receptores ativam a STAT 3, que induz várias proteínas apoptóticas para promover a proliferação celular (KUNDU et al., 2009).

In vivo, após a inalação de 1h com exposição de baixa dose de Cd, mostrou o desequilíbrio dos sistemas de defesa antioxidantes com aumento da glutathiona reduzida, mediadora do sistema não enzimático, na secreção broncoalveolar que foi balanceada com o aumento da glutathiona peroxidase. Em animais expostos cronicamente (35 semanas) por 1h de inalação de Cd observou-se a degeneração alveolar similar a pacientes com DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) (KIRSCHVINK et al., 2006).

Ainda há relatos de efeitos do Cd em outros sistemas como: sistema endócrino (JIMENEZ-ORTEGA et al., 2012); sistema cardiovascular (MESSER; SHRIVER, 2009); sistema hematopoético (HORIGUCHI, 2012). No entanto, a seguir será dada ênfase ao sistema reprodutor que é o foco deste estudo para melhor entendimento dos resultados apresentados.

1.4 Toxicidade do Cd no Sistema Reprodutor

O Cd apresenta uma meia vida longa e com o decorrer do tempo acumula-se no organismo, essa tendência acumulativa é destacada nos testículos (OTEIZA; ADONAYLO; KEEN, 1999). Esta sensibilidade se deve especialmente pela vascularização morfológicamente peculiar similar a uma barreira entre o sangue e os testículos (barreira hematotesticular) (THOMPSON; BANNIGAN, 2008). Desta forma, a inclinação dos testículos para a bioacumulação mostra-se um relevante modelo experimental, aplicado não somente a estudos referentes à fertilidade em humanos, mas também à nível sistêmico (SIU et al., 2009).

Em modelos *in vivo* demonstraram que mesmo em doses ambientalmente reais, ou seja, a que somos expostos cotidianamente são capazes de alterar o status antioxidante em testículos. Adicionalmente, observa-se o aumento do estresse oxidativo e também pode resultar em peroxidação dos lipídios da membrana, redução da fosforilação de proteínas axonemais e / ou níveis de trifosfato de adenosina que podem afetar a motilidade espermática (ARULDHAS et al., 2005; CHEN et al., 2002; JÄRUP, 2002).

Mesmo, em baixas doses de Cd já se evidencia danos testiculares (DE SOUZA PREDES,; DIAMANTE; DOLDER, 2010). Em relação, altas doses de Cd foram observadas necrose testicular, influência sobre a viabilidade das células de Levdig e secreção dos níveis de testosterona, além do aumento dos parâmetros de estresse oxidativo e bioquímicos e alterações histológica como degeneração das células germinativas, e danos ao DNA das células de Sertoli, ativando a cascata apoptótica e alterações na morfologia celular com a proliferação e migração devido a danos às proteínas citoesqueléticas, como actina e tubulina (OTEIZA et al., 1997).

O alvo primário da toxicidade do Cd no sistema reprodutor masculino é a degradação e interrupção da barreira hematotesticular que decorre em hemorragia de microvasos sobre o tecido intersticial, degeneração dos tubulos seminíferos (WANG, 2016). Apesar de a barreira hematotesticular ser funcional como malha de proteção sanguínea, ela é vulnerável para os danos induzidos pelo Cd em comparação a outras barreiras sanguíneas (CHEN et al., 2002; SETCHELL; WAITES, 1970).

Desta maneira, SIU et al., (2009) explicam que o mecanismo de ação do Cd sobre o testículo é visualizado em três fases: após o rompimento da barreira hematotesticular a degeneração das células de junção no epitélio dos tubulos seminíferos por ativação de vias de transdução de sinais específicas. Na fase I, que é caracterizada pela permeação dos os íons do Cd as células de Sertoli por distintos mecanismos: um por difusão, através de canais de Ca^+ ou pelo uso do transportador $\text{Ca}^{+2}/\text{Zn}^{+2}$, onde é induzido pelo Cd a liberação de citocinas, que interagem com alguns receptores , levando ao um estresse pela indução da via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos p38 (MAPK). Esse estresse pode provocar prejuízos a barreira hematotesticular como representado na Figura 06.

Na fase II, com o rompimento da barreira hematotesticular pela degradação das proteases (membrana integrais) e/ou endocitose mediada por clatrina das junções oclusivas e as proteínas do compartimento basal do epitélio seminífero. Já na Fase III, a fim conter a proteólise indesejada e evitar a dissolução de todo o epitélio seminífero no testículo, há uma ativação da via de sinalização da c-Jun N-terminal kinase (c-JNK), a qual, por sua vez, estimula a produção de inibidores de proteases dando início a recuperação do epitélio seminífero, como ilustra a Figura 06. Cd pode afetar indiretamente a espermatogênese, possivelmente pela competição de elementos essenciais (por exemplo, Mg, Fe, Zn, Se e Cu) para o seu funcionamento normal e diminuir sua concentração nos tecidos.

Os efeitos tóxicos do Cd no testículo pode ser relacionados também ao dano do endotélio vascular, as células de Leydig e Sertoli que são fontes de andrógeno que afetam diretamente na manutenção funcional da espermatogênese, além o Cd adicionalmente induz o estresse oxidativo, prejudicando os mecanismos de defesa antioxidante e aumentando a resposta inflamatória, o que resulta em alterações morfológicas e funcionais como inibição da síntese de testosterona e comprometimento da espermatogênese (BENOFF et al., 2009; TAHA et al., 2013).

Deste modo, o Cd age principalmente nas junções intracelulares de adesão dependentes de Ca^{2+} que demonstram interações de competição do Ca^{2+} com os sítios de ligação do Ca^{2+} em moléculas de adesão celular (PROZIALECK; EDWARDS, 2007), resultando em uma interrupção a caderina E nas junções endoteliais, demonstrando que a caderina E é alvo direto da toxicidade do Cd (PROZIALECK et al., 1999).

Estudos demonstram que além induzir ao dano na qualidade espermática, diminuir o trânsito espermático fazendo as espermátides permanecem incorporadas dentro do epitélio seminífero, o Cd é capaz de interromper a ligação sertoli-espermátide, que é importante para o transporte de espermátides

em todo o epitélio durante o ciclo do epitélio seminífero (MRUK; CHENG, 2004; SIU et al., 2009). Diante disso, estudos relataram que o Cd induz apoptose através da via de sinalização ROS / c-jun N-terminal cinase *in vitro* células Leydig de camundongo (YANG et al., 2003).

Estudo epidemiológico relatara que uma concentração elevada de Cd na urina está associada com menor contagem de espermatozoides móveis (ZHOU et al., 1999), e com aumento dos níveis séricos de hormônios reprodutivos e diminuição da concentração espermática (CHIA et al., 1994) e da motilidade espermática progressiva, motilidade total (TELISMAN et al., 2000; WANG et al., 2006) e viabilidade (JENG, 2017). A função da próstata é afetada após exposição crônica de Cd, alterando atividade hormonal e fertilidade masculina (SARKAR; RAVINDRAN; KRISHNAMURTHY, 2013).

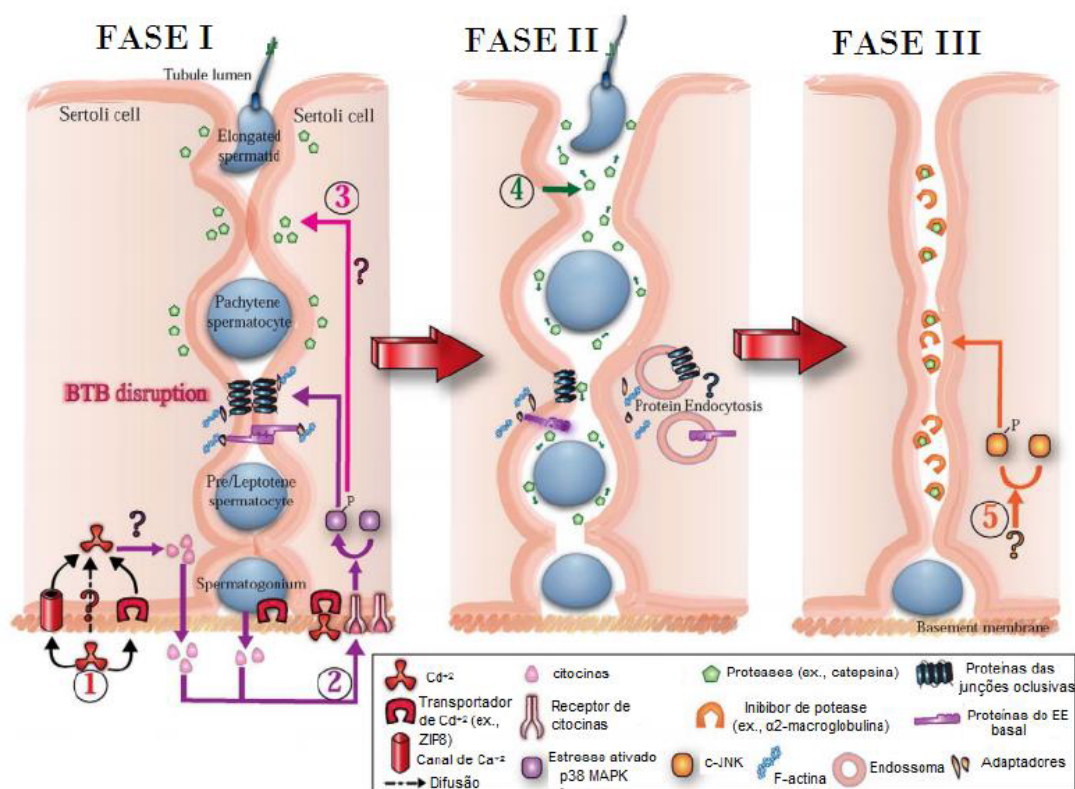


Figura 06: Esquema ilustrada como Cd induz dano a barreira hematotesticular e degeneração de complexos celulares nas junções no epitélio seminífero. 1 e 2 Penetração dos íons de Cd^{2+} nas células de Sertoli por diferentes mecanismos. 3 Indução da produção de proteases. 4 Ruptura da barreira hematotesticular e das junções da célula de Sertoli que levam à perda das células germinativas. 5 Ativação da via de sinalização responsável pela produção de inibidores de proteases. Fonte: (SIU et al., 2009)

2 Alternativas terapêuticas contra os danos promovidos pelo Cd

O uso terapêutico de quelantes vem sendo uma das alternativas há mais de 40 anos para casos de intoxicação por metais pesados (FLORA et al., 1993) que exercem efeitos tóxicos como chumbo, mercúrio, arsênio e o cádmio (KLAASEN, 1996). Os quelantes atuam aumentando a excreção e reduzindo a toxicidade dos metais por impossibilitar a ligação destes as células alvo (APOSHEAN, 1995) tanto por exposição aguda como em condições acidentais (alimentares ou ocupacionais) ou crônicas.

O Cd por ser um dos metais pesados mais explorados na indústria é também clinicamente de grande interesse, uma vez que as intoxicações por Cd são difíceis de serem tratadas (JONES et al., 1990). Além dos efeitos do metal também interferem diretamente na atividade de enzimas no organismo e podendo ligar-se a grupos sulfidrílicos (-SH) e/ou substituir metais essenciais de algumas enzimas alterando suas atividades catalíticas (CASALINO et al, 2000). De maneira que os sistemas enzimáticos essenciais, como a enzima sulfidrílica d-aminolevulinato desidratase (d-ALA-D), podem ter suas atividades inibidas pela ação de diversos metais, tais como o mercúrio (ROCHA et al., 1995), o chumbo (GOERING, 1993), e o cádmio (SANTOS et al., 2004, 2005).

A produção de espécies reativas induzida por metais pesados resulta no enfraquecimento das barreiras celulares antioxidantes resultando em desbalanço entre as cascatas pró-oxidantes e antioxidantes sistêmicas. Dessa forma, é importante investigar fontes alimentares com efeitos antioxidantes (exógenos) que funcionem como uma estratégia terapêutica para elevar a capacidade antioxidante celular pelo sequestro de espécies reativas induzidas pelo Cd. Na literatura, já foram descritas algumas fontes alimentares com efeito antioxidante como as vitaminas C e E, ácido α -lipóico, quercetina e, taurina, por exemplo (FLORA; PACHAURI, 2010).

As investigações de estratégias terapêuticas apresentam o uso de quelantes e suplementos antioxidantes quer seja com uso isolado ou combinado com outros agentes para conter ou minimizar os efeitos deletérios advindos dos metais pesados. Há descrito na literatura estratégias de uso agentes quelantes como DMSA e também DMPS (MISHRA; MEHTA; FLORA, 2008), combinação de terapia com dois agentes quelantes mono DMSA e DMSA e Taurina (FLORA et al., 2002; BHADARIA; FLORA, 2007; FLORA; SAXENA, 2004), agente quelante junto a micronutrientes Quercetina (MODI; FLORA, 2007) e agente quelante junto a extratos de plantas *Moringa oleifera* juntamente com DMSA (MISHRA et al., 2008; FLORA; MEHTA; GUPTA, 2009).

Há relatos de uso de alimentos para a redução da absorção ou a reabsorção de metais tóxicos e

apoiar vias de desintoxicação de forma natural como amendoim (*Arachis hypogaea*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), feijão-da-china (*Vigna mungo*) e milho (*Zea mays*), que se mostraram eficazes também como fitoremediadores com capacidade de absorver ou neutralizar partículas de Cd na água (NAND et al., 2012) e apresentarm ação antioxidante em modelo *in vivo* após exposição com Cd (BOLKENT et al., 2007).

Desta forma, a OMS recomenda que a exemplo de outros agentes naturais, os alimentos funcionais também podem configurar como uma alternativa acessível e eficiente na redução de efeitos deletérios causados por metais como o Cd. E segue uma revisão sobre alimentos funcionais com peptídeos ativos de reconhecido valor protetor aos efeitos dos metais pesados.

2.1 Alimentos funcionais

O *Functional Food Center* redefiniu o conceito de alimentos funcionais como “*alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos conhecidos ou desconhecidos, que em quantidades definidas não apresentam toxicidade e apresentam benefício clinicamente comprovado e documentado para a prevenção, manejo ou tratamento de doenças crônicas*” (DIPLOCK et al., 1998).

Esses alimentos que apresentam componentes biologicamente ativos são denominados alimentos funcionais (ABUAJAH et al., 2015; STEIN, 2008). De acordo com a ANVISA (Resolução nº 18/99), alimentos ou ingredientes com propriedades funcionais são aqueles que, além de ter funções nutricionais básicas, podem promover efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, sendo cientificamente comprovados e devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

Os alimentos funcionais (Figura 07) que mostra como podem ser classificados em alimentos convencionais contendo substâncias bioativas, também os gêneros alimentícios modificados através da eliminação, adição, substituição ou incremento da biodisponibilidade e/ou estabilidade de certos componentes e ingredientes alimentares sintetizados ou combinados (HENRY, 2010). Alguns componentes alimentares como as proteínas são importantes fontes na obtenção de alimentos funcionais, por sua essencialidade e valor nutricional atuam diretamente nos mecanismos biológicos em nosso organismo (ABUAJAH et al., 2015).

As pesquisas em torno dos alimentos funcionais como as proteínas estão concentradas na obtenção de peptídeos bioativos, uma vez que numerosos estudos científicos têm comprovado que seus componentes podem ser de grande interesse para a saúde já que muitos deles são biologicamente ativos e capazes de exercer funções benéficas quando no interior do organismo (KORHONEN et al., 2002; GARCÉS-RAMÓN et al., 2016).



Figura 07: Esquema ilustra exemplos de alimentos, componentes e abordagens tecnológicas consideradas como alimentos funcionais e utilizados em seu desenvolvimento.
Fonte: (GRANADO-LORENCIO et al., 2016)

Desta forma, os peptídeos bioativos são definidos como moléculas inativas de origem protéica em que sua ação e função biológica é facilitada a partir da hidrólise *in vitro* ou *in vivo*. Esses peptídeos bioativos são liberados de sua proteína precursora por hidrólise parcial ou total, graças ao uso de enzimas. *In vivo*, durante a digestão gastrointestinal, essas moléculas são liberadas de duas vias principais: pela hidrólise das proteínas por meio de enzimas digestivas, ou pela atividade de enzimas não-digestivas ou da microbiota no intestino grosso (BOUGLÉ; BOUHALLABB, 2015). Além disso, *in vitro* os peptídeos bioativos são obtidos durante o processamento industrial de alimentos. Este processo é realizado através da hidrólise enzimática extra-corpórea de proteínas alimentares (KORHONEN; PIHLANTO-LEPALLA, 2002).

Nesse processo, a enzima utilizada, bem como as condições de hidrólise (pH, temperatura e tempo) e a proteína precursora utilizada, são fatores determinantes para produzir os peptídeos de interesse (ECKERT et al., 2013). A proteína utilizada para a hidrólise e na obtenção dos peptídeos pode ser proveniente de diferentes fontes: como cereais, soro de leite e ovo, podendo ser obtido por processos industriais ou digestão gastrointestinal de alimentos, exercendo um importante papel na regulação e modulação metabólica (SHAHIDI et al., 2008).

É sabido que os peptídeos produzidos *in vitro* a partir da hidrólise com proteases apresentaram bioatividades específicas, diferindo daqueles obtidos por outras hidrólises como, por exemplo, a hidrólise química (ZHONG et al., 2007). Em relação a hidrólise enzimática, a clivagem de ligações peptídicas pode ocorrer por diversas proteases, tais como tripsina, pepsina, subtilisina, quimotripsina, termolisina, proteinase K, papaína e plasmina, além das combinações enzimáticas de proteases – incluindo alcalase, pancreatina, e enzimas provenientes de bactérias e fungos (KORHONEN, 2009; WANG, 2014). A hidrólise enzimática pode diminuir a massa molecular, aumentando a reatividade e melhorando as propriedades funcionais das proteínas (SMACCHI; GOBBETTI, 1999).

Dentre esses componentes biologicamente ativos incluem-se os compostos fitoquímicos derivados de plantas, verduras, legumes, frutas e cereais, os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ômega-3, -6 e -9 encontrados em peixes, os compostos probióticos de produtos lácteos fermentados e os peptídeos bioativos encontrados em proteínas de origem vegetal e animal (SRIVIDYA et al., 2010; ABUAJAH et al., 2015).

Outro exemplo desses compostos são flavonóides, componentes bioativos de alimentos à base de plantas. O resveratrol é um flavonóide extraído principalmente do vinho tinto e demonstrou ter atividades hipoglicêmicas, anti-inflamatórias, cardioprotetoras e antitrombóticas, entre outras (BROWN et al., 2015).

Diversas fontes proteicas de origem animal e vegetal como amendoim (WANG et al., 2014), farelo de arroz (REVILLA et al., 2008), folha de alface (XIE et al., 2008), milho (LI et al., 2008), pele de rã (QIAN et al., 2008), ovo (MIGUEL et al., 2004), leite (LIU et al., 2005), caseína (MIGUEL et al., 2010) e animais marinhos (FENG et al., 2015) demonstraram propriedades antioxidantes.

Peptídeos bioativos derivados da hidrólise de proteínas alimentares demonstraram efeitos benéficos ao organismo através de atividades anti-hipertensivas, antioxidantes,

imunomoduladoras, anticancerígenas, antimicrobianas e hipolipemiantes, opióides, etc. (BROWN et al., 2015; RIZZETTI et al., 2017; MIGUEL, et al., 2006; DAVÁLOS et al., 2004; MOUGHAN et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que, além de suas propriedades nutricionais, algumas proteínas alimentares também podem exercer atividade biológica liberando peptídeos bioativos durante o processo de digestão (MAJUMDER et al., 2009; LIU et al., 2017) nesse processo há promoção da hidrólise aumentando consequentemente as sequências peptídicas biologicamente ativas.

Os peptídeos bioativos com seqüências específicas de aminoácidos com atividade similar a um fármaco ou hormônio, que eventualmente modulam a função fisiológica ao se ligarem a receptores específicos da célula alvo (LIAO et al., 2018) além do potencial antioxidante estar associado a sua composição, estrutura e hidrofobicidade (CHEN et al., 1998). Os aminoácidos Tyr, Trp, Met, Lys, Cys presente em distintas seqüências peptídicas, são exemplos de componentes peptídicos que conferem a atividade antioxidante (WANG et al., 2014), também na doação de prótons a radicais deficientes de elétrons associam os aminoácidos com resíduos aromáticos a essa propriedade, da mesma forma seus peptídeos constituintes boa propriedade de neutralização de radicais livres (RAJAPAKSE et al., 2005).

Em relação ao aminoácido His observa-se a atividade antioxidante dos peptídeos relacionando-o à doação de hidrogênio, à neutralização de radicais peroxil e à capacidade quelante de metal pelo grupo imidazol (CHAN; DECKER, 1994). Por outro lado, o grupo SH do aminoácido Cys tem uma ação antioxidante independentemente devido a sua interação direta com radicais livres (QIAN et al., 2008; SARMADIA; ISMAILA, 2010).

Entretanto, enquanto a grande maioria dos estudos realizados nas últimas décadas se concentrou no isolamento de seqüências de peptídeos específicos liberadas após o processo de hidrólise. Recentemente, verificou-se que a administração de hidrolisados pode ter maior relevância no nível fisiológico em comparação a administração peptídeos isolados por serem considerados como produtos mais interessantes para o desenvolvimento de alimentos funcionais do ponto de vista funcional e organoléptico (LIU et al., 2017).

Neste contexto, a ingestão de alimentos naturais representa uma importante estratégia terapêutica visando a prevenção e tratamento de inúmeras comorbidades, e os estudos sobre terapias alternativas como os alimentos funcionais estão ocupando espaço e importância na comunidade científica, principalmente por serem de baixo custo e de consumo seguro,

praticamente isentos de efeitos adversos (BOONLA et al., 2015; GARCÉS-RAMÓN et al., 2016).

2.2 Hidrolisado da clara do ovo

O ovo de galinha é um dos alimentos mais consumidos, devido ao seu fácil acesso, baixo preço, alta versatilidade nas aplicações culinárias e também porque supõe uma fonte mais equilibrada de nutrientes de grande qualidade como na sua composição para 100 g podemos obter 10.9 de proteína, 362.11 mg de de minerais essenciais e 52 kcal de energia e além da alta biodisponibilidade (Instituto de Estudos do Ovo, 2009; CAMPOS ZANI et al., 2018; LIAO et al., 2018). Desta forma, o ovo tornou-se um alimento muito interessante para a obtenção de peptídeos bioativos (MAJUMDER et al., 2015; NIMALARATNE et al. 2015; SUN et al, 2016; LIU et al., 2017).

Em 1995 foi documentada a primeira identificação do isolamento do primeiro peptídeo bioativo derivado de clara de ovo (FUJITA et al., 1995), desde então muitas pesquisas foram produzidas e, assim, o desenvolvimento de peptídeos bioativos em torno desta fonte alimentar teve um avanço exponencial. Especificamente a partir do ano de 2010, estudos e pesquisas sobre a produção de peptídeos bioativos derivados de ovo começaram a ser mais relevantes. Nesse sentido, existem hidrolisados obtidos a partir da gema e da clara do ovo (Figura 08), as quais incluem proteínas em sua composição, como clara de ovo (albumina), gema e a membrana interna da casca (membrana vitelínica) (JAIN; ANAL, 2017).

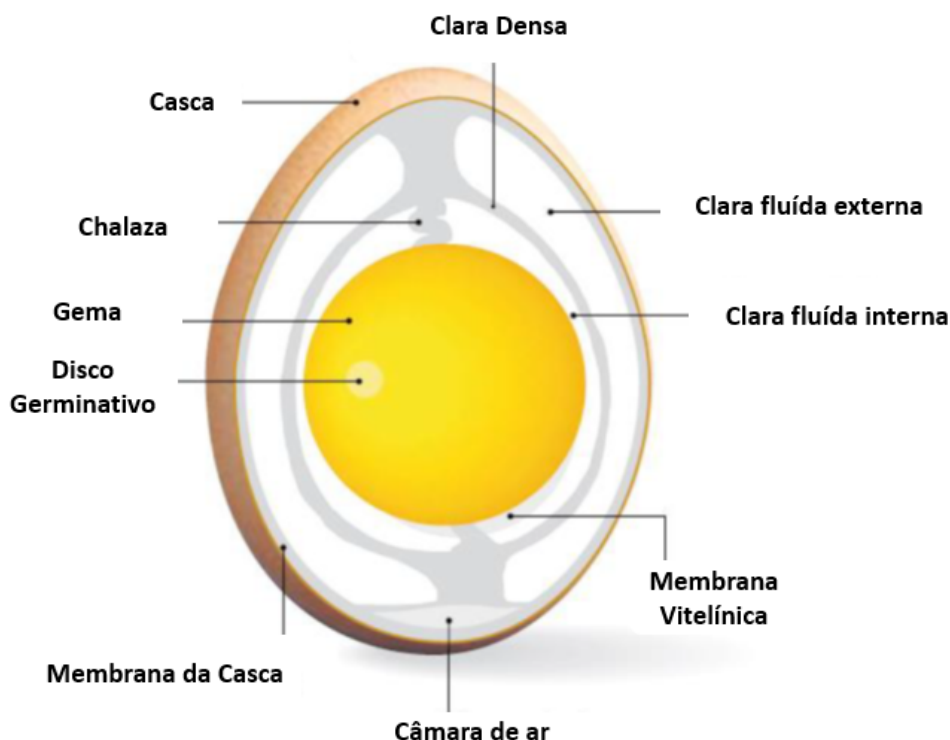


Figura 08. Corte transversal do ovo e suas estruturas. Fonte: [Instituto de Estudos do Ovo, 2009, modificado](#)

Dos hidrolisados de ovo (HCO), o obtido a partir da clara é o mais conhecido devido ao alto teor de proteínas que possui (MIGUEL; ALEIXENDRE, 2006; GARCÉS-RIMÓN et al., 2016; JOVANOVIĆ et al., 2016).

A clara do ovo representa cerca de 58% do peso total do ovo de galinha e é quase exclusivamente composta por água (88-90%) e proteínas (10-12%). A riqueza e o equilíbrio nos aminoácidos essenciais da proteína da clara do ovo fazem dela um alimento de valor biológico muito alto e a albumina é usada como uma proteína de referência para avaliar a qualidade de outras proteínas alimentares (Instituto de Estudos do Ovo, 2009, YU et al., 2011, GARCÉS-RIMÓN et al., 2016, LIAO et al., 2018).

Além disso, graças a sua alta capacidade de saciedade, a clara do ovo é uma fonte de proteína de grande interesse na produção de dietas hipocalóricas para pacientes com excesso de peso (DU et al., 2017). As proteínas derivadas da clara de ovo, principalmente a ovoalbumina, demonstraram possuir ação antioxidante e funções benéficas para a saúde humana (SUN et al., 2016; RIZZETTI et al., 2016a; RIZZETTI et al., 2016b; RIZZETTI et al., 2017b; RIZZETTI et al., 2017c).

Previamente, um estudo desenvolvido por Miguel et al. (2004) demonstrou que a hidrólise de proteínas de clara de ovo com pepsina por 3 horas gera um hidrolisado com capacidades biológicas anti-hipertensivas e antioxidantes *in vitro*. Deste hidrolisado foram isolados e identificados vários peptídeos que mostraram atividade sobre a inibição da enzima conversora de angiotensina - ECA (MIGUEL et al., 2004) e/ou uma potente atividade antioxidante (DÁVALOS et al., 2004). É importante notar que vários fatores podem condicionar a atividade desses peptídeos quando administrados oralmente, entre esses fatores é importante destacar os fatores fisiológicos com Ph, incluindo resistência a enzimas gastrointestinais e (absorção, transporte e capacidade para alcançar seus locais de ação) (LIAO et al., 2018, SANTOS-HERNANDEZ et al., 2018). Alguns estudos relatam a ação protetora do HCO de forma diferenciada de acordo com o tratamento de hidrólise utilizado.

O HCO utilizado neste estudo, obtido pela hidrólise enzimática com pepsina por 8 horas demonstrou várias atividades biológicas que podem ser empregadas para melhorar a saúde humana como atividade antioxidante (MIGUEL et al., 2004; DÁVALOS et al., 2004). Posteriormente, foi demonstrado que este HCO poderia ser ainda mais promissor, devido a sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo e inflamação como observado no modelo de animais obesos (ratos Zucker), além de reduzir a esteatose hepática deste modelo animal (GARCÉS-RIMÓN et al., 2016), e também mostrou atividade moduladora da microbiota intestinal, por reversão da disbiose produzida no intestino dos ratos obesos Zucker (REQUENA et al., 2017).

Ação protetora do HCO foi observada com a presença de peptídeos com resíduos de Tyr na região N-terminal da sequência de aminoácidos está relacionada à capacidade desses peptídeos atravessarem a barreira hematoencefálica (TESCHEMACHER, 2003), este poderia ser um mecanismo pelo qual o HCO é capaz de exercer um efeito antioxidante no SNC na qualidade de um composto quelante, pois em relatos anteriores, observou que após administração de HCO houve a redução da concentração de Hg em serricas e cérebro, demonstrando o possível potencial quelante de metais pesados (KLAASSEN et al., 2016). A eficácia do composto quelante é devido à composição de enxofre, que têm grande afinidade por metais pesados, aumentando e melhorando a sua excreção (SEARS, 2013).

Também é descrito na literatura que hidrolisados compostos de peptídeos com resíduos de aminoácidos Tyr e Phe tem atividade quelante, conseqüentemente, confirmando o potencial antioxidante ao hidrolisado (TORRES-FUENTES et al., 2014). De maneira que, os principais componentes dos peptídeos do HCO são os resíduos de aminoácidos Tyr, His, Pro, Phe e Leu, pode-se sugerir que o efeito antioxidante do HCO sobre o estresse oxidativo promovido pela

ação neutralizadora de radicais livres (RIZZETTI et al., 2016; LIU et al., 2014).

Recentemente, foi demonstrada a capacidade do HCO de neutralizar os efeitos tóxicos sistêmicos induzidos pelos metais. O HCO parece atuar como um scavenger de espécies reativas sobre o estresse oxidativo e depletor inflamatório induzidos pela exposição em longo prazo a contaminantes (RIZZETTI et al., 2016a; RIZZETTI et al., 2019; MARTINEZ et al., 2019). No entanto, a literatura ainda carece de informações a respeito dos seus efeitos preventivos como antioxidante e quelantes sobre as desordens induzidas por contaminantes ambientais como Cd.

3 JUSTIFICATIVA

Embora existam limites estabelecidos de exposição de Cd aos seres humanos, a produção industrial tem tornado o metal cada vez mais presente no contato com a população (BERNHOF, 2013). Assim, o presente estudo se justifica pela necessidade de pesquisas realizadas de forma controlada que demonstrem os efeitos da exposição a altas doses e que apontem alternativas nutricionais de baixo custo que possam combater os danos causados pelo Cd no sistema reprodutor de ratos.

Além disso, uma das principais formas de exposição ao Cd é a inalação da fumaça do cigarro (REBELO et al., 2016; BERNHOF, 2013; UENO et al., 2010; SATARUG et al., 2006; ABU-HAYYEH et al., 2001). Visto como um problema de saúde pública onde mais de um bilhão de pessoas no mundo são fumantes. Ainda se estima que esse total poderá chegar a dois bilhões em 2030.

Os acidentes ambientais em Mariana/MG e Brumadinho/MG que resultaram na contaminação de metais pesados como Cd de 200 vezes mais que o permitido segundo os relatórios do CONAMA, são fatores que determinarão um alto índice de exposição ao Cd relacionando com aumento de doenças provocadas por esse metal.

Em contraste com elevado nível de exposição à população, nas últimas décadas estratégias nutricionais têm sido exploradas para a prevenção de doenças através dos chamados “alimentos funcionais” (LOBO et al., 2010). Por serem consideradas mais seguras que os agentes farmacológicos tradicionais (MANSO et al., 2008; GARCIA-MORA et al., 2015) os compostos biológicos com peptídeos bioativos mostraram efeitos antioxidante, anti-hipertensivo, imunomodulador, anticâncer, antimicrobiana, hipocolesterolêmica, antidiabética, vasodilatadora e outras (KORHONEN, 2009; MEISEL, 2004; MIGUEL, 2004; GARCÉS-RIMÓN, 2016; WANG; GONZALEZ DE MEJIA, 2005) além de atenuar ou combater os danos do estresse oxidativo causado pela exposição dos metais pesados.

Nesse contexto, alguns estudos demonstram que o hidrolisado de clara de ovo (EWH), e seus peptídeos identificados mostraram ser uma fonte rica em proteínas com uma relevante capacidade funcional para atenuar os danos causados por metais. O EWH demonstrou *in vitro* e *in vivo* a redução da atividade de radicais livres, inibição da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) (MIGUEL et al., 2004; DÁVALOS et al., 2004; GARCIA-REDONDO et al., 2010; GARCÉS-RIMÓN et al., 2016) e assim como a reversão dos danos causados pela

exposição ao mercúrio nos sistemas reprodutor, cardiovascular, nervoso periférico e na memória de ratos (RIZZETTI et al., 2017; RIZZETTI et al., 2017b).

O conhecimento científico com a comprovação dos efeitos protetores de um alimento funcional como o hidrolisado da clara do ovo, são importantes na prevenção e tratamento de efeitos adversos promovidos pela exposição a metais pesados como o Cd cada vez mais crescente. Haja vista a necessidade de estratégias terapêuticas viáveis contra a exposição a metais pesados, o presente estudo se propõe avançar no desenvolvimento de uma estratégia alimentar funcional de grande benefício a saúde animal e humana. Além disso, o estudo favorecerá a elucidação de mais mecanismos de ação do metal *in vivo* para a concentração em questão e assim, o despertar por novas estratégias preventivas de intervenção pela comunidade científica para as exposições a metais pesados como o Cd. De maneira inédita o estudo propõe que a ingestão do hidrolisado prévia a exposição ao metal possa proteger ou impedir os danos causados por este.

Sendo assim, os resultados desse estudo são importantes para verificar a existência de benefícios proporcionados pelo consumo do EWH por populações expostas a metais pesados e por consequência determinar se o EWH de maneira preventiva poderá figurar como uma alternativa terapêutica para efeitos danosos pela exposição ao Cd.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar se o pré-tratamento com hidrolisados da clara de ovo é capaz de prevenir ou atenuar os danos induzidos pela exposição ao cloreto de cádmio no sistema reprodutor de ratos.

4.2 Objetivos específicos

Investigar se o pré-tratamento com EWH influencia/previne:

- Danos causados no sistema reprodutor pela exposição ao CdCl_2 , assim como parâmetros espermáticos de ratos expostos;
- Atividade oxidante e antioxidante de órgãos reprodutores de animais expostos ao metal.

5 MÉTODOS

5.1 Amostra

Ratos Wistar machos (3 meses de idade; 290-330 g) foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria – RS/Brasil. Os animais foram alojados em caixas plásticas especiais forradas com maravalha autoclavada, com capacidade para 4 animais, em condições controladas de luz (ciclo claro/escuro 12 horas: luz a partir das 7 horas e escuro a partir das 19 horas), temperatura (21 a 23°C) e umidade ($50 \pm 10\%$), recebendo água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório” (NIH publicação nº 80-23, revisada em 1996) e com o CONCEA (art. 5º, incisos I e IV, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) sendo aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa (protocolo 012/2019, ANEXO 1).

Os animais foram divididos aleatoriamente em (Figura 09):

- a) **Controle** - Ct - água de beber por gavagem + água destilada i.p por 28 dias;
- b) **CdCl₂** - água de beber por gavagem + água destilada i.p por 28 dias + CdCl₂ 1mg / Kg i.p. nos últimos 14 dias de acordo com protocolo de Balaraman et al., (1989);
- c) Hidrolisado - **EWH** - 1g/ Kg/ dia, via gavagem de acordo com Rizzetti et al., (2016) + água destilada i.p por 28 dias;
- d) **EWH + CdCl₂** – pré-tratamento por 14 dias com EWH - 1g/ Kg/ dia, via gavagem + água destilada ip + 14 dias com CdCl₂ - 1mg / Kg i.p. + EWH - 1g/ Kg/ dia, via gavagem.

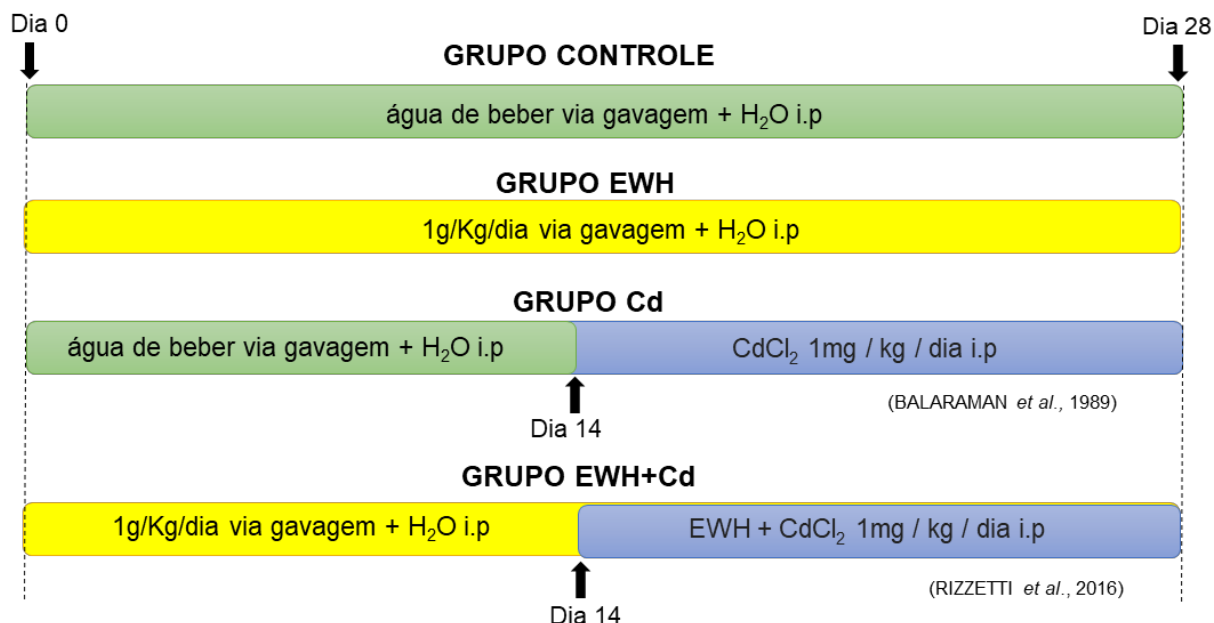


Figura 09: Esquema representativo dos grupos experimentais.

O peso corporal, o consumo de água e ração foram monitorados semanalmente. Ao final dos tratamentos, os animais foram anestesiados com cetamina i.p., 80 mg/Kg e xylasina 10 mg/Kg e puncionada a artéria aorta abdominal para coleta de sangue seguido de decapitação e retirada dos órgãos reprodutores. Foram determinados o peso dos testículos, epidídimo, próstata ventral, ducto deferente e vesícula seminal (vazia, sem glândula de coagulação). O testículo direito, epidídimo e o canal deferente esquerdo foram utilizados para a análise espermática. Testículo e epidídimo esquerdo foram utilizados para ensaios bioquímicos. Para isto, estes tecidos foram rapidamente homogeneizados em Tris HCl 50 mM, pH 7.4 (5/10, p / v), centrifugadas a 2400g por 10 min a 4° C e a fração resultante do sobrenadante foi congelada a -80° C para os ensaios posteriores.

5.2 Preparação do Hidrolisado da clara do ovo (Egg White Hydrolysate/EWH)

O hidrolisado de clara de ovo com pepsina foi obtido seguindo o protocolo previamente estabelecido por Garcés-Rimón *et al.* (2016). Foi utilizado como substrato pasteurizado da clara de ovo de origem comercial (Guillén, Espanha). A hidrólise foi realizada com pepsina de qualidade alimentar do estômago de porco (BC Pepsin 1: 3000; Biocatalysts, Reino Unido). As condições ideais de hidrólise foram

selecionadas com base nas especificações do fabricante. Primeiro, o pH da clara do ovo foi reduzido para 2, usando HCl a 37% de qualidade alimentar (Panreac, Espanha). Subsequentemente, a enzima foi adicionada numa concentração de 2: 100 (p / p). A hidrólise foi realizada em banho termostático a 37° C, com agitação constante, por 8 horas. A inativação foi alcançada elevando o pH para 7 com NaOH 10 M de qualidade alimentar (Panreac). O hidrolisado inativado foi centrifugado a 5000 G por 15 minutos. O sobrenadante resultante foi coletado e armazenado congelado e o hidrolisado foi liofilizado, armazenado a vácuo. Para o tratamento, a EWH foi ressuspensa em água de beber e administrada por gavagem na dose de 1mg/ Kg/ dia conforme descrito por Rizzetti et al., (2016) e representado na figura abaixo (Figura 10).

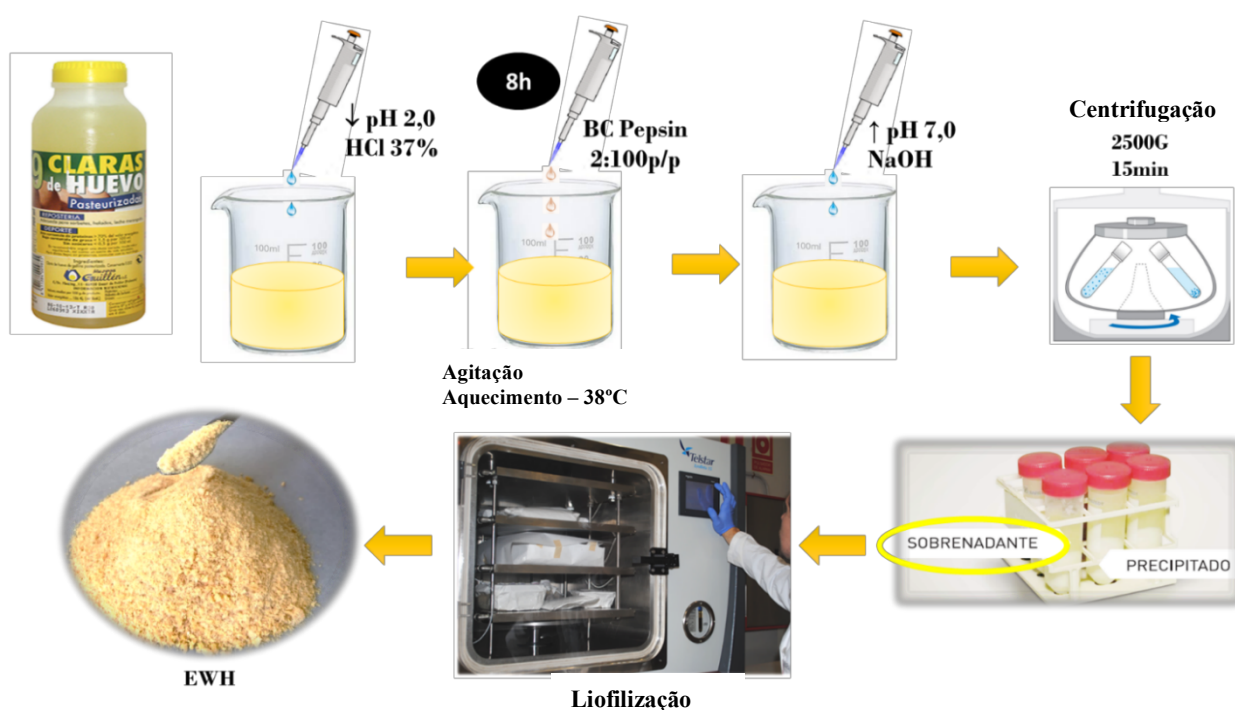


Figura 10: Desenho esquemático do processo de obtenção do Hidrolisado da clara do ovo (EWH). Fonte: GPFisCar

5.3 Análises espermáticas

5.3.1 Motilidade espermática

A motilidade espermática foi analisada de acordo com Martinez et al. 2014. O espermatozoide foi removido do ducto deferente e misturado com 1 mL de tampão fosfato salino modificado por Dulbecco (DMPBS, Nutricell, São Paulo, Brasil) pré-aquecido em placa aquecida a 34° C (37° C), alíquota de

10 µL transferida para uma lâmina e analisada sob microscopia óptica, com um aumento de 400X (Binocular, Olympus CX31, Tóquio, Japão). Foi utilizada a classificação descrita por Perobelli et al. (2010) para a motilidade dos espermatozóides analisados em: móvel com movimento progressivo, móvel sem movimento progressivo e imóvel.

5.3.2 Morfologia espermática

Os espermatozóides (100 µL) obtidos do ducto deferente 1 mL de tampão fosfato salino modificado por Dulbecco (DMPBS, Nutricell, São Paulo, Brasil) foram diluídos em a 900µL de solução formal salina a 10% e, para análise, foram preparadas lâminas histológicas e 200 espermatozóides por animal foram avaliados por microscópio óptico sob aumento de 400X (Binocular, Olympus CX31). As anormalidades morfológicas foram classificadas em morfologia da cabeça (amorfa, banana e cabeça destacada) e da cauda (cauda dobrada e quebrada) de acordo com critérios de Filler (1993).

5.3.3 Teste de integridade da membrana

A integridade funcional da membrana foi determinada pelo teste hipo-osmótico (HOS). Este ensaio foi realizado misturando espermatozóides com solução hipo-osmótica (1: 5) e incubando a mistura a 37° C por 45 min. 100 células foram analisadas por animal através de microscópio óptico sob aumento de 400x. Caudas sem alterações ou caudas retas foram consideradas positivas para danos à membrana, como descrito por Lomeo & Giambersio (1991).

5.3.4 Produção diária de espermatozóides por testículo, número de espermatozóides e tempo de trânsito no epidídimo.

Os espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermiogênese) e espermatozóides no epidídimo caput / corpus e epidídimo da cauda foram contados como descrito por Robb et al. (1978). Para calcular a produção diária de espermatozóides, o número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6,1, que é o número de dias em que esses espermátides estão presentes no epitélio seminífero. O tempo de trânsito de espermatozóides através do epidídimo foi determinado dividindo o número de espermatozóides em cada porção pela produção diária de espermatozóides.

5.4 Análises bioquímicas em testículos e epidídimos

5.4.1 Peroxidação lipídica (TBARS)

Foi analisada pelos níveis de malondialdeído (MDA) usando o método colorimétrico, conforme descrito anteriormente por Ohkawa et al. (1979). Os tecidos foram incubados com ácido tiobarbitúrico (0,8% TBA), ácido fosfórico (H_3PO_4) e dodecilsulfato de sódio (0,8% SDS) por 60 minutos e os resultados foram expressos em nanomoles de MDA por mg de proteína. A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976).

5.4.2 Níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Determinados pelo método espectrofluorométrico descrito por Loetchutinat et al. (2005), com modificações (MARTINEZ et al., 2017). Os níveis de ROS foram expressos como unidades de fluorescência. A amostra foi diluída (1: 10) em TrisHCl 50 mM (pH 7.4) e foi adicionado diacetato de 2,7-diclorofluorescina (DCFH-DA, 1 mM). A emissão da intensidade de fluorescência do DCF foi registrada para a detecção de ERO intracelular a 520 nm (excitação a 480 nm) (SpectraMax M5 Molecular Devices, CA, EUA) por 60 minutos a intervalos de 15 minutos. Os resultados são expressos em unidades de fluorescência.

5.4.3 Capacidade antioxidante total FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potencial)

A capacidade antioxidante total foi medida pelo ensaio FRAP (poder antioxidante redutor de ferro) segundo descrito por Benzie & Strain 1996, com modificações (MARTINEZ et al., 2017). Resumidamente, uma solução de FRAP foi preparada misturando tampão acetato de 300 mM (pH 3.6) com 2,4,6-Tri (2-piridil) -s triazina (TPTZ) 10 mM (TPTZ) em HCl (40 mM). Depois disso, o cloreto férrico (FeCl_3 20 mM) foi adicionado e misturado. 10 μL de tecido (testículo e epidídimo previamente homogeneizado) e 240 μL da solução de trabalho acima foram misturados e incubados por 10 min a 37° C. A densidade óptica das amostras foi medida a 532 nm (SpectraMax M5 Molecular Devices, CA, EUA). Uma curva dose-resposta padrão de Trolox (50-1000 μM - análogo da vitamina E solúvel em água) foi preparada. Os resultados são apresentados com referência aos equivalentes do Trolox. A capacidade antioxidante total foi expressa em mMol / L.

5.4.4 Nível glutatona reduzida (GSH)

Foi determinado pelo método espectrofluorométrico descrito por Armstrong et al. (1998). Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico (HClO_4 , 0,1

M) e centrifugadas a 3000 rpm. Posteriormente, 100 µl de o-ftalaldeído (OPT, 1 mg / ml em metanol, Sigma-Aldrich) e 800 µl de tampão fosfato (0.1 M, pH 8.0) foram adicionados ao sobrenadante (100 µl) no escuro e incubados por 15 minutos . Em seguida, 200 µl da mistura foram colocados em uma placa opaca de 96 poços e a fluorescência foi lida a 420 nm de emissão e 350 nm de excitação (SpectraMax M5 Molecular Devices, CA, EUA). Os resultados são expressos em nmol GSH / g de tecido.

5.4.5 Atividade da catalase (CAT)

Foi realizada de acordo com Aebi (1984). As amostras foram adicionadas ao tampão fosfato (50 mM, pH 7.0) e H₂O₂ (0.3 M), a diminuição na absorvância a 240 nm devido à diminuição na extinção de H₂O₂ foi aferida e a atividade da Catalase foi registrada por 3 minutos. Os resultados foram expressos em unidades por miligrama de proteína (U / mg de proteína). Uma unidade (U) foi definida como 1 pmol de H₂O₂ degradada por minuto.

5.4.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A medida de acordo com uma técnica descrita por Misra & Fridovich (1972). A amostra foi adicionada ao tampão carbonato (Na₂CO₃ 0,05M, pH 10.2) e adrenalina (60 mM) no escuro. A unidade de SOD inibe a auto-oxidação de 50% da adrenalina. O aumento da absorvância a 480 nm foi monitorizado a cada 30 segundos durante 120 segundos a 37° C e calculado o minuto A. Os resultados foram expressos em unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

5.4.7 Atividade da glutathione peroxidase (GPx)

Foi determinada de acordo com Paglia & Valentine (1967) utilizando-se meio de reação (tampão fosfato 0,1 M, pH 7.6; NADPH 0,1 mM; azida de sódio 4.28 mM e glutathione redutase 2 U / mL) . A absorvância foi medida a cada 30 s por 2 minutos a 340 nm após a adição de 0.72 mM de H₂O₂. A atividade de GPx foi expressa em mM / min / mg de proteína.

5.4.8 Níveis de grupos tiol não proteicos (NPSH)

O NPSH foi estimado no testículo e epidídimo segundo Ellman (1959). Em um método simples, rápido e método ideal para determinar a quantidade de -SH na solução protéica pura. Para determinar NPSH, aliquota de S₁ (500µL) foi misturado (1:1) com 10% de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugado. Após a centrifugação, alíquota de sobrenadante foi (200µl) adicionada em tampão de fosfato de potássio 1 M, pH 7.4, e a absorvância foi medida

a 412 nm contra o branco (SpectraMax M5 Molecular Devices, CA, EUA). Em seguida, foi adicionado 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 10 mM, seguido de incubação a 37° C por 60 min. Após a incubação, a absorvância da amostra foi novamente medida a 412 nm. O resultado foi expresso em nanomoles de grupos tiol / mg de proteína.

5.5 Análise estatística

Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. As diferenças foram analisadas usando ANOVA 1-via, seguido pelo teste de comparação múltipla post hoc de Bonferroni para dados paramétricos foi utilizado para os dados de peso corporal, peso absoluto e relativo dos órgãos e nos resultados das análises bioquímicas e os resultados de produção diária de espermatozóide, contagem espermática, tempo de trânsito no epidídimo, motilidade e morfologia espermática; e análise da integridade de membrana foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes. As análises estatísticas foram realizadas no software PrismGraph 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

6 RESULTADOS

A exposição a CdCl_2 por 14 dias em dose elevada, comparada a valores encontrados em intoxicações extremas como em acidentes ambientais, afeta negativamente o sistema reprodutor de ratos, reduzindo drasticamente o número de espermatozoides, alterando sua morfologia e capacidade móvel. O pré-tratamento com EWH demonstrou efeito protetor a este sistema impedindo estes danos possivelmente por intervir no estresse oxidativo promovido pelo metal.

Em relação ao peso corporal, no início do tratamento os animais apresentavam pesos similares. Ao final de 28 dias observou-se que os animais expostos ao Cd reduziram o peso corporal de forma expressiva, no entanto, é importante ressaltar que o pré-tratamento com EWH foi capaz de reduzir a perda de peso ocasionada pelo metal, ainda que os animais apresentem peso menor quando comparados aos animais controle (Tabela 1, Figura 11).

O pré-tratamento por 14 dias com EWH e a persistência da ingesta de EWH concomitante a 14 dias de exposição a CdCl_2 interferiu no consumo de ração dos animais. Na Tabela 1 pode ser observado que a exposição ao CdCl_2 reduziu significativamente o consumo médio (última semana de tratamento) de ração. Quando observamos, de modo temporal, na Figura 10, fica evidente que a partir do 14º dia, que coincide com o início da exposição ao metal, os animais do grupo CdCl_2 reduzem significativamente o consumo de ração até o final do tratamento. Já os animais pré-tratados com EWH (grupo $\text{EWH}+\text{CdCl}_2$) também reduzem a ingesta porém esta redução é significativamente menor quando comparada aqueles animais que não receberam o pré-tratamento (Figura 11), o que pode justificar a recuperação do peso total dos animais deste grupo. O consumo de água foi similar entre os grupos nos primeiros 14 dias de tratamento, no entanto, foi observado um declínio crescente no consumo de água nos animais que receberam CdCl_2 a partir do 14 dia de tratamento (Figura 11).

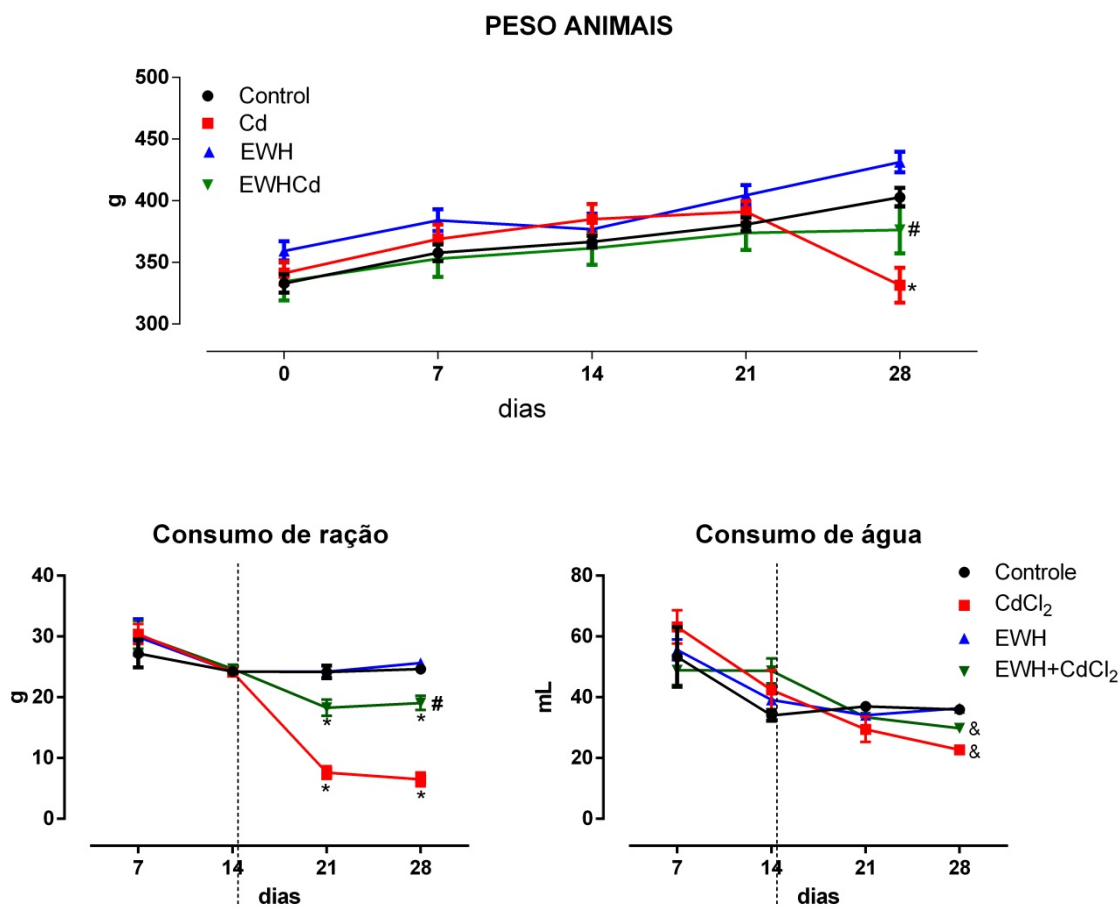


Figura 11: Peso dos animais, consumo de ração e água durante as semanas de tratamento. Linha pontilhada indica início da administração de CdCl_2 . * vs Controle e #vs CdCl_2 ; & vs 7, 14 e 21 dias no mesmo grupo.

A perda de peso também se refletiu nos órgãos reprodutores, como podemos observar a que a exposição ao CdCl_2 reduziu significativamente o peso absoluto do testículo, epidídimo e vesícula seminal (cheia e vazia) e próstata, exceto ducto deferente. Esta perda de peso também foi reduzida pelo metal quando corrigida por 100g, ou seja, o peso relativo de praticamente todos os órgãos avaliados exceto vesícula seminal cheia e ducto deferente foram reduzidos. A administração prévia de EWH, nos ratos do grupo EWH+ CdCl_2 , impediu a redução dos pesos dos órgãos reprodutores dos ratos deste grupo normalizando-os a condição similar a controle (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos do pré-tratamento do EWH sobre o consumo de água, ração, peso corporal e de órgãos reprodutivos após exposição ao CdCl₂.

Parâmetros	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Controle	CdCl ₂	EWH	EWH+CdCl ₂
<i>Consumo de água (mL)</i>	35.9 ± 0.9	22.6 ± 1.2	36.4 ± 0.7	29.8 ± 1.7
<i>Consumo de ração (g)</i>	24.6 ± 0.8	6.5 ± 1.1*	25.7 ± 0.4	19.1 ± 1.2 [#]
<i>Peso corporal inicial (g)</i>	357.8 ± 6.7	370.4 ± 10.3	384.2 ± 8.8	348.9 ± 12.5
<i>Peso corporal final (g)</i>	408.8 ± 8.1	305.1 ± 21.9*	440.6 ± 6.8	369.8 ± 16.9 [#]
<i>Testículo (g)</i>	2.1 ± 0.11	0.91 ± 0.17*	1.94 ± 0.85	1.53 ± 0.17 [#]
<i>Testículo (g/100g)</i>	0.5 ± 0.03	0.27 ± 0.03*	0.44 ± 0.02	0.40 ± 0.04 [#]
<i>Epididimo (g)</i>	0.65 ± 0.02	0.45 ± 0.05*	0.65 ± 0.03	0.65 ± 0.06 [#]
<i>Epididimo (g/100g)</i>	0.22 ± 0.06	0.12 ± 0.001*	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.03 [#]
<i>Vesícula Seminal cheia (g)</i>	1.47 ± 0.07	0.96 ± 0.07*	1.64 ± 0.24	1.48 ± 0.09 [#]
<i>Vesícula Seminal cheia (g/100g)</i>	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.38 ± 0.05	0.40 ± 0.03
<i>Vesícula Seminal vazia (g)</i>	0.77 ± 0.04	0.54 ± 0.06*	0.87 ± 0.04	0.89 ± 0.06 [#]
<i>Vesícula Seminal vazia (g/100g)</i>	0.17 ± 0.006	0.10 ± 0.02*	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01 [#]
<i>Ducto Deferente (g)</i>	0.110 ± 0.006	0.091 ± 0.005	0.107 ± 0.005	0.106 ± 0.011
<i>Ducto Deferente (g/100g)</i>	0.027 ± 0.001	0.030 ± 0.002	0.024 ± 0.001	0.028 ± 0.001
<i>Próstata (g)</i>	0.28 ± 0.07	0.11 ± 0.03*	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.05 [#]
<i>Próstata (g/100g)</i>	0.075 ± 0.01	0.039 ± 0.01*	0.057 ± 0.01	0.087 ± 0.01 [#]

Dados expressos em média ± EPM. O peso relativo dos órgãos é expresso em peso do órgão/peso corporal x 100. Unidades: g: gramas, mg: miligramas; mL: mililitros. ANOVA – uma via, *P < 0.05 vs Controle, [#] vs CdCl₂ (N = 10 em todos os grupos). Consumo de água e ração: média da última semana.

Quando avaliada a contagem dos espermatozoides no testículo foi observada uma redução significativa de seu número tanto absoluto quanto relativo nos animais expostos ao CdCl_2 (Tabela 2). A presença do metal também interferiu negativamente sobre a produção diária de espermatozoides (PDE) provocando redução na produção em mais de 90%. No entanto, de maneira bastante eficiente, o pré-tratamento com EWH impediu a redução do número de espermatozoides testiculares assim como a produção diária dos mesmos (Tabela 2).

No corpo do epidídimo foi observada uma redução significativa no número de espermatozoides após exposição ao metal que persistiu no grupo pré-tratado com EWH (Tabela 2). No entanto, a redução no tempo de trânsito espermático observada no grupo CdCl_2 foi significativamente melhorada nos animais pré-tratados com EWH.

Quando avaliada a cauda do epidídimo nota-se fenômeno diferente do corpo. Neste caso, houve redução (absoluta e relativa ao peso do órgão) do número de espermatozoides além da redução do tempo de trânsito espermático e o pré-tratamento com EWH não preveniu este dano ocasionado pela exposição ao metal neste segmento.

Tabela 2. Efeito do pré-tratamento com EWH na contagem espermática em testículo e epidídimo, produção diária de espermatozoides e tempo de trânsito espermático após exposição ao CdCl₂.

Parâmetros <i>Contagem espermática</i>	Controle	CdCl ₂	EWH	EWH+CdCl ₂
<i>Testículo</i>				
Nº espermatozoides (x10 ⁶)	226.2 ± 24.7	25.5 ± 10.7*	202.1 ± 20.6	192.5 ± 22.6 [#]
Nº espermatozoides (x10 ⁶ /g)	139.2 ± 19.6	39.9 ± 9.3*	131.1 ± 13.5	136.2 ± 12.5 [#]
PDE (x10 ⁶ /test/dia)	37.2 ± 2.6	2.5 ± 0.7*	33.2 ± 3.4	31.6 ± 3.7 [#]
PDEr (x10 ⁶ /test/dia/g)	22.3 ± 2.1	4.8 ± 1.5*	21.5 ± 2.2	21.1 ± 1.6 [#]
<i>Epidídimo Cabeça/ Corpo</i>				
Nº espermatozoides (x10 ⁶)	97.4 ± 4.3	10.1 ± 3.3*	99.6 ± 19.1	26.0 ± 2.6*
Nº espermatozoides (x10 ⁶ /g)	267.6 ± 6.3	33.2 ± 14.8*	264.3 ± 57.5	82.1 ± 11.0*
Tempo de trânsito sptz (dias)	5.9 ± 0.3	10.6 ± 1.1*	7.2 ± 0.1	6.6 ± 0.5 [#]
<i>Epidídimo /cauda</i>				
Nº espermatozoides (x10 ⁶)	123.7 ± 24.7	8.5 ± 5.5*	180.0 ± 9.5	34.7 ± 8.5
Nº espermatozoides (x10 ⁶ /g)	340.3 ± 64.9	47.6 ± 13.9*	368.7 ± 59.3	120.6 ± 25.4
Tempo de trânsito sptz (dias)	5.9 ± 0.2	8.3 ± 0.9*	5.7 ± 0.7	6.1 ± 0.3

PDE: produção diária de espermatozoides; DSPr: produção diária de espermatozoides relativo ao peso do testículo. Dados expressos em média ± EPM. Unidades: g: gramas. * vs Controle; [#] vs CdCl₂ (ANOVA 1-via).

Na avaliação da motilidade espermática classificada por espermatozoides móveis com movimentos progressivo, móveis sem movimento progressivo e imóveis, os resultados demonstram que no grupo que foi exposto por 14 dias com CdCl₂ ocorreu prejuízo acentuado na motilidade espermática, com redução do número de espermatozoides com movimento progressivo e aumento o número de espermatozoides sem movimento progressivo e imóveis (Móveis com movimento progressivo - Controle: 64 (43-78), CdCl₂: 16.8 (3-25)*, EWH: 77

(73-81), EWH+CdCl₂: 65 (55-81)[#] e imóveis - Controle: 10 (4-17), CdCl₂: 44 (25-59)*, EWH: 5 (3-9), EWH+CdCl₂: 12 (5-20)[#]) (Figura 12).

Por outro lado, o tratamento prévio com EWH foi capaz de impedir os comprometimentos de motilidade provocados pela exposição ao CdCl₂ (Figura 12). Nota-se que os animais do grupo pré-tratado com EWH apresentam resultados semelhantes ao do grupo Controle, com aumento do número do espermatozoides móveis com movimento progressivo e redução significativa dos imóveis.

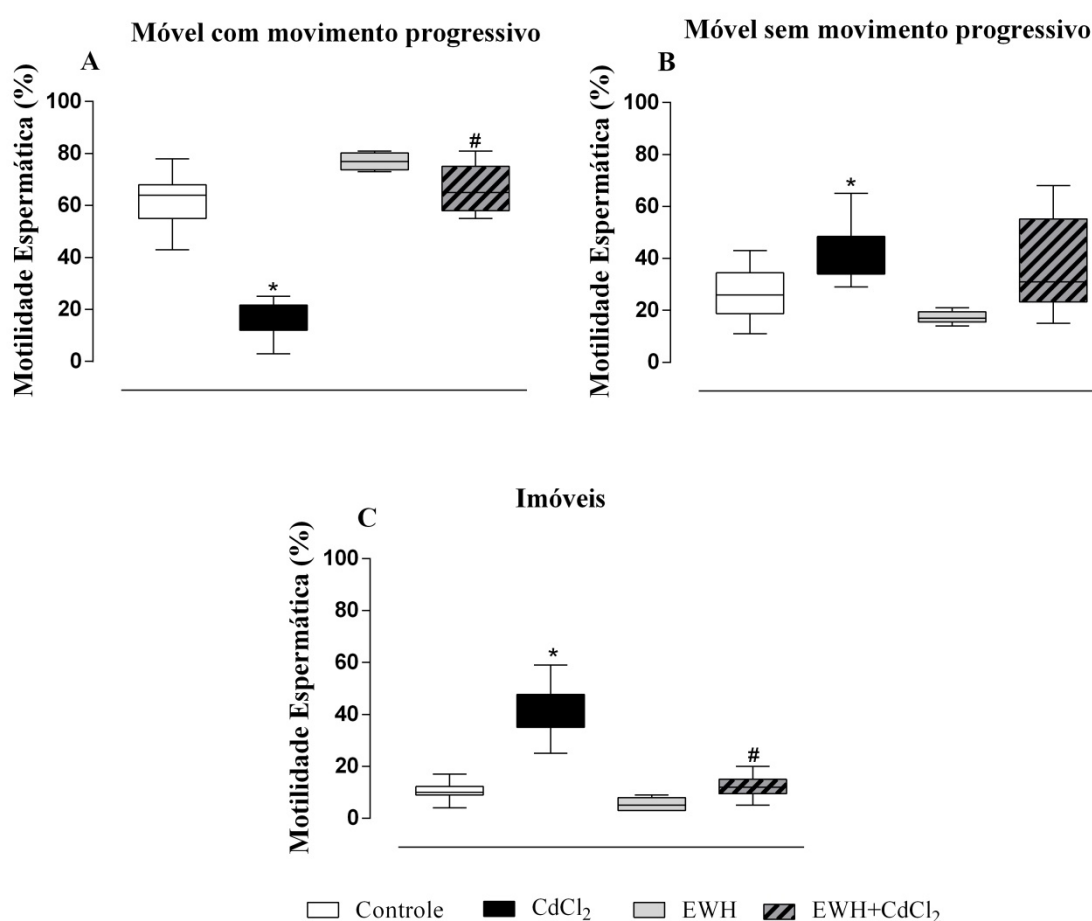


Figura 12. Efeitos do EWH sobre a motilidade espermática após a exposição com o Cd. A: Móveis com movimento progressivo, B: Móveis sem movimento progressivo, C: Imóveis. Dados expressos com média (Q1 – Q3). P<0.05 * vs Controle; [#]vs CdCl₂. Kruskal-Wallis test.

Sabendo-se que a exposição a metais além de prejudicar a quantidade e produção de espermatozoides também pode interferir na morfologia dos mesmos, avaliamos e classificamos

a morfologia espermática, segundo a Classificação de Filler (1993), da seguinte maneira: a) anormalidades de cabeça (amorfa, formato de banana e isolada) e b) anormalidades de cauda (enrolada e quebrada) em anormalidades de cabeça do tipo amorfa, formato de banana e isolada, e na cauda como enrolada e/ou quebrada.. Quando analisamos o número de espermatozoides normais é evidente o efeito da exposição por 14 dias ao CdCl₂ em reduzir drasticamente os níveis de células reprodutivas normais. No entanto, o pré-tratamento com EWH impediu a redução do número de espermatozoides com morfologia normal (Tabela 3).

As anormalidades de cabeça foram significativamente maiores nos animais do grupo CdCl₂, com destaque para o incremento da anormalidade do tipo cabeça amorfa, seguida de cabeça em forma de banana e cabeça isolada da cauda. Vale destacar que os animais tratados somente com EWH não apresentaram alterações em sua morfologia. No entanto, quando os animais foram pré-tratados com EWH e expostos ao CdCl₂ observou-se uma redução significativa no número de anormalidades, evidenciando, mais uma vez, que o EWH foi eficiente em prevenir efeitos deletérios da exposição ao CdCl₂, podendo ser comparadas a valores de encontrados em animais controle.

Tabela 3. Os efeitos do pré-tratamento com EWH sobre a morfologia espermática após 14 dias de exposição ao CdCl₂.

Parâmetros <i>Morfologia Espermática</i>	Controle	CdCl ₂	EWH	EWH+CdCl ₂
<i>Normal</i>	95 (91 – 95)	14 (5 – 30)*	77 (73 – 81)	79 (71 – 82) [#]
<i>Anormalidade de Cabeça</i>				
Amorfa	3 (2 – 3)	19 (10 - 29)*	2 (1 – 5)	2 (1 – 5) [#]
Cabeça de banana	0 (0 - 1)	18 (3 – 22)*	0 (0 – 1)	0 (0 – 1) [#]
Cabeça destacada	0 (0 – 1)	19 (15 – 31)*	1 (0 – 1)	0 (0 – 1) [#]
Nº total de Anormalidades de cabeça	5 (2 – 6)	45 (38 – 63)*	6 (2 – 9)	12 (12 – 14) [#]
<i>Anormalidade de Cauda</i>				
Cauda Curvada	2 (1 – 3)	5 (2 – 6)*	2 (1 - 2)	4 (2 – 5)
Cauda Quebrada	1 (1 – 3)	5 (3 - 7)*	5.(3 – 7)	2 (1 – 4)
Nº total de Anormalidades de cauda	2 (2 – 4)	9 (7 – 11)*	2 (1 – 3)	6 (5 – 9)

Dados expressos como mediana (Q1 – Q3). *vs Controle; [#] vs CdCl₂, teste de Kruskal-Wallis.

Outro parâmetro avaliado está relacionado à viabilidade espermática, onde foi realizado o teste hiposmótico no qual os espermatozoides que apresentam a cauda dobrada e edemaciada foram considerados normais, ou seja, com a membrana plasmática funcional. Os espermatozoides do grupo exposto com CdCl₂ apresentaram prejuízo na integridade da membrana espermática, e quando pré-tratados com EWH houve melhora na integridade da membrana (Controle: 84.4 ± 2.1 , CdCl₂: $34.6 \pm 2.9^*$, EWH: 91.7 ± 1.7 , EWH+CdCl₂: $86.4 \pm 1.5^{\#}$ - Figura 13).

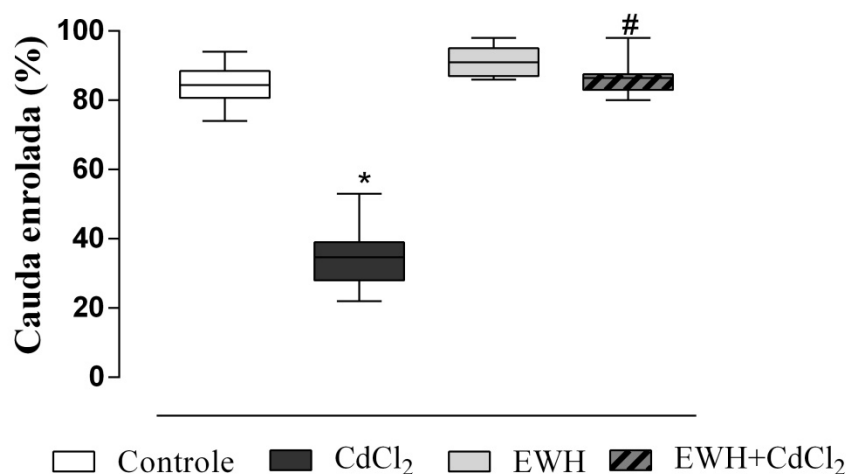


Figura 13. Efeitos do pré-tratamento com EWH na integridade da membrana espermática de ratos expostos a Cd por 14 dias. Resultados expressos na porcentagem de cauda enrolada de espermatozoides como mediana (Q1 - Q3). $P < 0,05$ *vs Controle; #vs CdCl₂, teste de Kruskal-Wallis.

Uma vez que os efeitos de metais, como o CdCl₂, sobre o sistema reprodutor estão relacionados a desequilíbrio no sistema redox e os efeitos do EWH também estão relacionados com sua capacidade antioxidante, investigamos estes mecanismos nos tecidos alvos.

Os resultados indicam que a exposição ao CdCl₂ por 14 dias aumentou o estresse oxidativo no testículo e epidídimo, demonstrado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio, bem como, da peroxidação lipídica em testículo e epidídimo. O pré-tratamento com EWH foi capaz de prevenir este efeito deletério do metal em ambos tecidos avaliados (Figura 14).

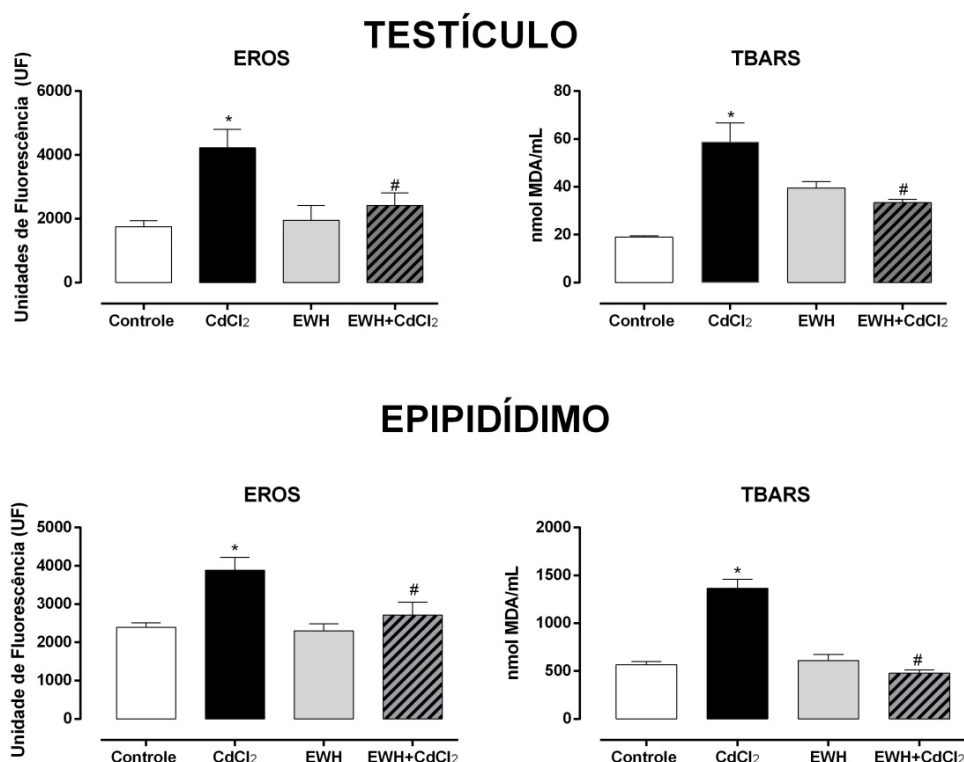


Figura14: Efeitos do pré-tratamento com EWH nos biomarcadores do estresse oxidativo após exposição ao CdCl₂. Espécies reativas - EROS (UF) e peroxidação lipídica (TBARS - nmol MDA/mL) em testículos e epidídimo. Os resultados são expressos em média ± SEM; P <0,05 *vs Controle e #vs CdCl₂; ANOVA 1-via.

Considerando que a partir de um dano oxidativo, é possível que para equilibrar o balanço redox seja ativado o sistema de defesa antioxidante, avaliamos diversos pontos desta cascata nos órgãos alvo do sistema reprodutor de ratos. Observamos que a capacidade antioxidante total não foi alterada em testículo e foi incrementada em epidídimo em animais expostos ao CdCl₂ e que o pré-tratamento com EWH manteve os valores de FRAP similares aos animais controle (Figura 15). Quando avaliamos a enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e tem um papel importante na defesa antioxidante observamos que tanto em testículo quanto em epidídimo a atividade da SOD foi aumentada na presença do metal e normalizada quando o animal foi pré-tratado com EWH. Este mesmo comportamento ocorreu quando avaliamos a enzima catalase em testículo. No entanto, não ocorreu, em nenhum dos grupos estudados, alteração da enzima catalase em epidídimo (Figura 15).

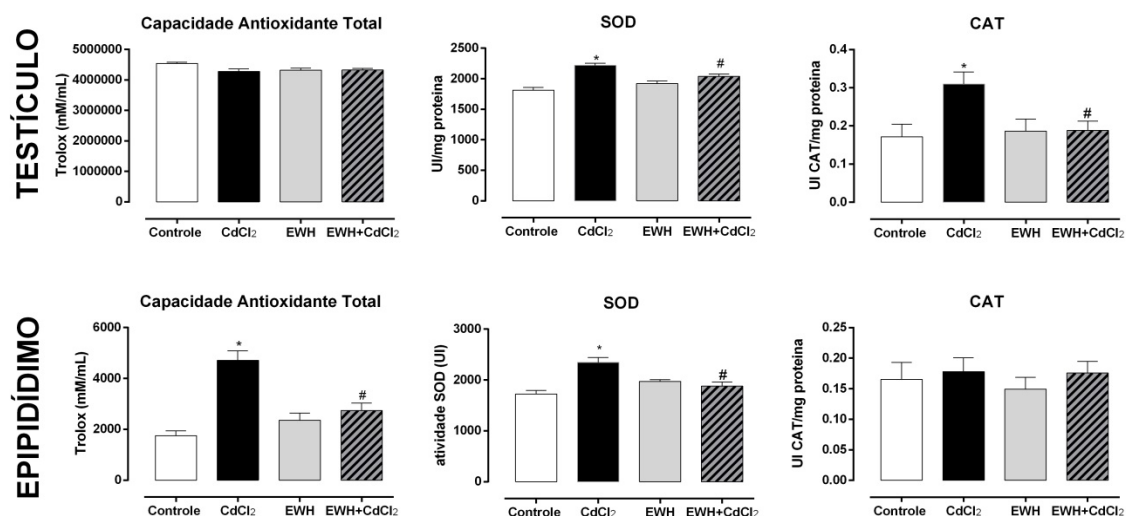


Figura 15: Efeitos do pré-tratamento com EWH sobre as defesas antioxidantes após exposição ao CdCl₂. Capacidade Antioxidante total (FRAP – Trolox – mM/mL), atividade de SOD (UI), atividade de Catalase (Unidades / mg de proteína), em testículos e epidídimo. Os resultados são expressos em média ± SEM; P < 0,05 * vs Controle e # vs CdCl₂; ANOVA 1-via.

Adicionalmente, visualiza-se um incremento na atividade da glutathione peroxidase (GPx), promovida pela exposição ao CdCl₂, que é uma enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, fazendo parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular. O pré-tratamento com EWH provocou redução deste parâmetro (Figura 16). Não foram observadas alterações da GPx em testículo.

Quando avaliamos os níveis de tióis não protéicos, glutathione (GSH), a exposição ao CdCl₂ promoveu uma redução significativa desta defesa antioxidante em testículo, sendo esta totalmente recuperada nos animais pré-tratados com EWH (Figura 16). Por fim, em relação ao sistema de defesa não enzimático, os níveis dos grupos tióis não protéicos (NPSH) não sofreu alterações em nenhuma das condições experimentais (Figura 16).

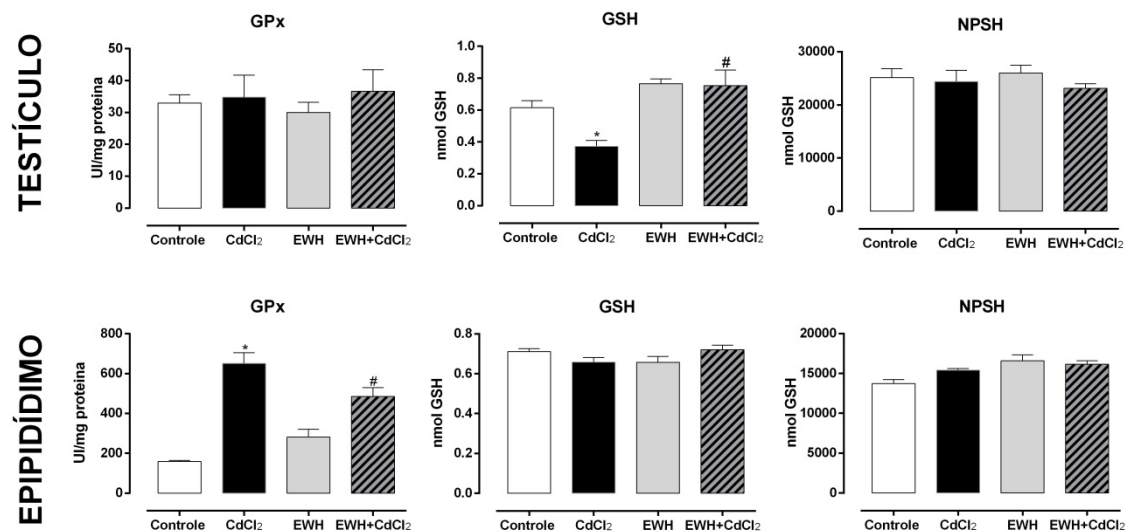


Figura 16: Efeitos do pré-tratamento com EWH sobre as defesas antioxidantes após exposição ao CdCl₂. Atividade de Glutathiona Peroxidase (nMol / min / mg de proteína), nível de GSH (nmol GSH / tecido), e grupo tióis não protéicos (NPSH) (nmol GSH / tecido) em testículos e epidídimo. Os resultados são expressos em média $\pm$ SEM; P < 0,05 *vs Controle e # vs CdCl₂; ANOVA 1-via.

7 DISCUSSÃO

A toxicidade do Cd sobre o sistema reprodutor masculino é amplamente explorada com diferentes doses e duração de tratamento (SWIERGOSZ-KOWALEWSKA, 2001; SIU et al., 2009; REN et al., 2019). No presente estudo, a exposição a altos níveis de CdCl₂ durante 14 dias levou a redução do peso corporal e de órgãos do sistema reprodutor masculino de ratos, além do prejuízo na qualidade e morfologia espermática e a indução dano oxidativo nos testículos e epidídimos. No entanto, é importante ressaltar que o principal resultado deste estudo foi notar que o pré-tratamento com EWH neutralizou/preveniu os efeitos tóxicos induzidos pelo CdCl₂.

A toxicidade do Cd está relacionada a perda ponderal tanto em exposições agudas como crônicas (PICOLLI et al., 2004; GAURAV et al., 2011; ANDJELKOVIC et al., 2018; KE et al., 2019), no entanto, os mecanismos subjacentes ainda não são claros. Estudo de Deepti et al. (2010) com ratos expostos ao dobro da dose de Cd (2 mg/Kg) e do tempo de exposição utilizada em nosso estudo e também em estudo de Abdelrazek et al. (2016) utilizando 1/30 da dose letal (3mg/ Kg) com 63 dias de exposição demonstraram perda de peso de até 50% nos ratos expostos ao Cd. As alterações encontradas foram associados aos efeitos tóxicos do metal em afetar diversos sistemas corporais e principalmente relacionado a ativação de radicais livres e peroxidação lipídica, o que corroboram nossos achados, onde a perda de peso dos animais foi acompanhada de aumento da produção das espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica.

O pré-tratamento com EWH foi capaz de prevenir a perda de peso corporal induzida por CdCl₂ mesmo com este modelo de indução de acentuada toxicidade onde há alta taxa de absorção intraperitoneal de Cd (~ 91%) se comparado a outros modelos de administração como por via oral (~ 1%). No entanto, possivelmente este achado pode estar relacionado a alta capacidade antioxidante do EWH, como já demonstrado em outros modelos experimentais (GARCÉS-RIMÓN et al., 2018; MARTINEZ et al., 2019; MIGUEL et al., 2005; REQUENA et al., 2017; RIZZETTI et al., 2016, 2017). Achados semelhantes, que corroboram efeito do pré-tratamento com EWH, sobre o peso corporal foram encontrados com o uso terapêutico de outros tipos de antioxidantes como o Licopeno (RENCUZOGULLARI; ERDOGAN, 2007), Chá Verde (ABDELRAZEK et al., 2016), vitamina E (JAHAN et al., 2014), óleo de oliva e colocynth (AMAMOU et al., 2015) em ratos expostos ao Cd em diferentes doses.

Embora os trabalhos anteriores não mostrem dados referentes a ingesta de ração dos animais expostos a metais, uma hipótese plausível para a perda de peso, e que se confirmou nos

resultados encontrados, reside na redução da ingesta de alimento/ração. Este achado está diretamente relacionado com o início das injeções intraperitoneais do metal (Figura 11), e o pré-tratamento com o EWH preveniu essa redução. A perda de peso devido a intoxicação por Cd já foi relatada em estudos anteriores com roedores expostos à baixas e altas doses de Cd e com tempos de exposição variando de 15 minutos a 30 dias e relaciona os efeitos da perda ponderal diretamente a disbiose intestinal causada devido a infiltração bacteriana, encurtamento e espessamento das vilosidades, rupturas de junções intestinais com infiltrados inflamatórios promovidas pela intoxicação (NINKOV et al., 2015; KIM et al., 2014; TINKOV et al., 2018).

Uma vez que o pré-tratamento preveniu este efeito sobre a perda de peso, uma hipótese pertinente, embora não investigada diretamente no modelo deste estudo, é que este alimento funcional possa ter, de certa forma, protegido esta microbiota dos efeitos do metal. Esta hipótese está pautada em estudos anteriores utilizando o EWH em ratos Zucker por 12 semanas onde foi demonstrado a reversão da disbiose intestinal (REQUENA et al. 2017), além de ação antiinflamatória e antioxidante demonstrada em outros modelos (GARCÉS-RIMÓN et al., 2018; MANSO et al., 2008; RIZZETTI et al., 2016).

A ação do metal também refletiu na redução do peso absoluto e relativo dos órgãos reprodutores (testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata). O efeito do Cd sobre os órgãos reprodutores é relatado em diversas doses como em estudo de Souza Predes et al. (2010) com exposição a doses únicas de 1 e 1.2 mg/kg de CdCl₂ e Yari et al. (2010) administrando por 16 dias 1 mg/kg via ip., em ambos estudos houve diminuição dos pesos dos órgãos reprodutores alvo da toxicidade.

Embora os mecanismos que pelos quais este efeito ocorre ainda precisem ser melhor elucidados, a notória redução dos pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutores e atribuída a ação tóxica direta do Cd, como por exemplo alterando a estrutura testicular aumentando a fragilidade da barreira hematotesticular (DO CARMO CUPERTINO et al., 2017), além da mimetização do Ca e Cd nos canais de Ca⁺ na membrana testicular e competindo com minerais essenciais importantes para espermatogênese, ativando sinalizadores como p38 MAPK e mediadores pró-inflamatórios (SIU et al., 2009), além de aumentar significativamente o estresse oxidativo nestes tecidos (TURNER; LYSIAK, 2008) como também observado em nosso estudo. Estes mecanismos de toxicidade do Cd que podem estar relacionados a hipotrofia testicular, epididimal, vesícula seminal e próstática observadas no modelo deste estudo, em especial o aumento do estresse oxidativo foi amplamente estudado neste trabalho. Outra via que pode estar relacionada com a redução de peso de órgãos reprodutores, que embora não tenha sido investigada neste trabalho, é uma possível alteração no status andrógeno sob controle do

eixo hipotálamo-hipófise-testicular como demonstrado nos estudos com roedores expostos a 4 mg/Kg de Cd via ip. por 6 dias (MANNA; SINHA; SIL, 2008) e 0,006 M de Cd via inalatória durante 4 semanas (BIZARRO et al., 2003) onde a relação da redução de hormônios hipofisários com atrofia dos órgãos reprodutores foi estabelecida.

Esse efeito foi evitado com o pré-tratamento com EWH, e atribuímos este achado, pelo menos parcialmente, ao alto potencial antioxidante do EWH, como podemos verificar nas análises dos órgãos reprodutores (Figura 14). Similarmente, em estudos com antioxidantes naturais, com o pré tratamento de 5 dias com 2 mg/kg de vitaminas E em ratos expostos a 2 mg/kg de Cd durante 5 semanas (YANG et al., 2006) e uso da vitamina C e/ou β -caroteno (KOYUTURK et al., 2006) foi observado a considerável reversão das alterações no peso órgãos após exposição ao Cd. Tais estudos conferem os efeitos protetores a neutralização de radicais livres e redução do dano oxidativos como os observados em nossos animais. Neste sentido, o EWH pode estar ampliando as defesas antioxidantes endógenas e reduzindo ação oxidativa nesse sistema (RIZZETTI et al., 2017). Além disso, relaciona-se que a presença de aminoácidos Tyr e Phe em alguns hidrolisados protéicos está relacionada a inativação de radicais livres (SUN et al., 2014). Estudos anteriores de nosso grupo descreveram a presença de peptídeos contendo os aminoácidos Tyr, His, Pro, Phe e Leu no EWH (DAVALOS et al., 2004; MANSO et al., 2008). Assim, podemos sugerir que seus efeitos sobre o dano oxidativo observado no testículo e epidídimo podem estar relacionadas a suas atividades antioxidante e neutralizadora de radicais livres.

Observamos, neste estudo, que a exposição ao CdCl_2 por 14 dias prejudicou os parâmetros de qualidade espermática, reduziu a motilidade e a produção diária de espermatozoides no testículo. Exposições de curto e longo prazo ao Cd parecem prejudicar a qualidade espermática, com redução da mobilidade, viabilidade e número de espermatozoides, além de aumento de anormalidades morfológicas. Esses resultados podem ser atribuídos ao aumento de ROS no testículo induzido pelo Cd que da mesma forma contribuiu à diminuição da viabilidade espermática e o aumento das anormalidades morfológicas em cabeça e cauda das espermátides, o aumento de caudas quebradas, além do aumento dos espermatozoides imóveis. Asadi et al. (2014) observaram que ratos expostos por 16 dias com a dose semelhante ao deste estudo e Kamel et al. (2011) que expôs ratos durante 12 semanas a doses de 5mg/L e 50 mg/L via água de beber, apresentavam redução significativa na motilidade e na produção diária de espermatozoides no testículo, conferindo ao Cd o efeito prejudicial na função testicular, principalmente no estágios da espermatogênese que resultam na redução da produção de espermatozoides e prejuízo da fertilidade masculina (BENCH et al., 1999).

Outro ponto a ser discutido, é o fato do Cd ser conhecido como competidor de Ca^{+} , e este mineral é essencial para a regulação da motilidade espermática (KAMEL et al., 2011). Benoff et al. (2008), relacionou o dano na motilidade espermática induzida por Cd a expressão alterada das isoformas do canal de Ca^{+} (isoforma 4) situadas na cauda do espermatozóide, reguladoras do influxo de Ca^{+} e Cd para este órgão. Além disso, o aumento do estresse oxidativo após exposição ao Cd nos órgãos reprodutores podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela má qualidade do sêmen, danos testiculares e comprometimento da fertilidade (OGUZTURK et al., 2012).

Estudos epidemiológicos indicam associação entre exposição ao Cd com infertilidade masculina, baixa qualidade do sêmen e diminuição da contagem de espermatozoides. Além disso, o Cd tem efeito prejudicial na funcionalidade dos testículos (principalmente nos estágios da espermatogênese) que pode resultar na redução da produção de espermatozoides, levando no prejuízo da fertilidade (BENOFF et al., 2000; BENCH et al., 1999).

Cabe ressaltar que esses efeitos adversos induzidos pelo Cd foram revertidos com prévio tratamento com EWH, de maneira similar a este estudo. Nosso grupo em estudo com animais expostos a mesma dose e tempo de CdCl_2 e co-tratamento com EWH observou efeito protetor com reversão parcial de alguns parâmetros em relação a qualidade espermática (Eudes et al., *dados não publicados*). Por exemplo, quanto a contagem espermática no testículo, o co-tratamento com EWH não reverte o dano causado pelo metal, no entanto é notório que o pré-tratamento porposto neste estudo melhora significativamente estes valores retornando a níveis de controle. Portanto, a pré-exposição dos animais a um antioxidante natural de origem alimentar, como o EWH, se mostra eficaz em aumentar a proteção contra os danos reprodutivos causados pela exposição a altas concentrações de Cd. Outros estudos com ~~outros~~ metais como Hg, Al, apresentaram resultados similares a toxicidade sobre qualidade espermática e a ingesta de EWH foi capaz prevenir os danos na qualidade espermática (RIZZETTI, 2016 a; MARTINEZ et al. *dados ainda não publicados*). Outros tratamentos com substâncias antioxidantes como Açafrão (ASADI et al., 2014) e Zinco (AMARA et al., 2008) também demonstraram efeito restaurador sobre a qualidade espermática em animais expostos a Cd, e essa ação positiva sobre esse parâmetro foi atribuída à capacidade desses compostos antioxidantes de eliminar do radical hidroxila, inibindo a peroxidação lipídica e consequentemente minimizando o status oxidativo, como também observado em nosso estudo (Figura 13).

O pré-tratamento com EWH também impediu o comprometimento da membrana espermática, ou seja, melhorou a viabilidade espermática em ratos com exposição ao Cd. Outros

ingredientes derivados de alimentos como sulforafano advindo do brócoli (*Brassica oleracea cuba*) (HAYES, 2008; JAHAN, 2013), açafrão (*Crocus sativus*) (ASADI, 2014), curcumina (OGUZTURK, 2012) e Zinco (AMARA et al., 2008) mostram seus benefícios como antioxidantes na infertilidade, através da melhora a motilidade e a qualidade espermática após a exposição ao Cd em ratos.

A toxicidade reprodutiva induzida pelo Cd é possivelmente ligada ao dano oxidativo, com o aumento da produção de ROS podendo levar a uma redução das barreiras antioxidantes. No estudo de Vernet et al. (2004) vincula o dano oxidativo com um papel importante na interrupção da função espermática, da mesma forma que El-Demerdash et al. (2004) observou na membrana espermática que, por ser constituída grande parte de ácido graxo poliinsaturado, é susceptível ao aumento da peroxidação lipídica (LPO) que leva a redução da motilidade progressiva dos espermatozoides, aumenta as anormalidades totais dos espermatozoides, além de causar diminuição notável na capacidade de fertilização dos espermatozoides. Em nosso estudo, tal efeito foi observado no grupo que foi exposto ao Cd, através do dano oxidativo com aumento da produção de ROS e LPO, da mesma forma é notável o prejuízo na motilidade pelo grande número de espermatozoides imóveis e móveis sem movimento progressivo. Observamos que a exposição ao CdCl₂ por 14 dias aumentou as espécies reativas e os níveis de peroxidação lipídica e prejudicou as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas nos órgãos reprodutivos. Portanto, o prejuízo reprodutivo encontrado pode estar relacionado ao aumento do nível de estresse oxidativo após a exposição ao metal. Investigamos também se o EWH poderia estar atuando como antioxidante para evitar os efeitos deletérios do CdCl₂. A exposição dos ratos ao CdCl₂ e pré-tratados com EWH mostra níveis pró-oxidantes semelhantes ao grupo não tratado, sugerindo que os efeitos benéficos do EWH podem estar ligados ao seu poder antioxidante. De fato, a ação antioxidante do EWH foi demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo* de síndrome metabólica, obesidade, hipertensão e exposição a metais (BROWN et al., 2015; RIZZETTI et al., 2017; MIGUEL, et al., 2006; DAVÁLOS et al., 2004; MOUGHAN et al., 2014). Os peptídeos bioativos derivados do EWH têm efeitos antioxidantes que podem estar agindo com EWH em conjunto, no qual parece reduzir o desequilíbrio oxidante-antioxidante, atuando como antioxidante diminuindo ação sobre a geração de espécies reativas de oxigênio e controlando os níveis de peroxidação lipídica e, com isso, prevenindo o dano de membrana plasmática nas estruturas do sistema reprodutor.

Em relação às defesas antioxidantes enzimáticas, foi observado no grupo exposto durante 14 dias de CdCl₂ um aumento da atividade da SOD em testículo e epidídimo e em relação a atividade da catalase tal efeito foi observado apenas em testículo. Esse aumento pode

ser considerado um mecanismo de defesa testicular, que pode ser explicado pelo aumento da H_2O_2 clivada através da enzima catalase, corroborando com os achados de Abdelrazek et al. (2016) em ratos expostos ao Cd (3 mg/kg) por 63 dias aumentaram a atividade da catalase. Porém, geralmente os estudos demonstram diminuição significativa nas atividades da SOD e CAT tecidual após exposição ao Cd (DJURIC et al., 2015), assim juntamente com GPx estas são três enzimas antioxidantes endógenas primárias que atuam nos sistemas de defesa para neutralizar as espécies reativas de oxigênio e proteger contra o dano oxidativo no organismo. Pode-se atribuir o aumento da atividade da SOD e CAT encontrados à alta indução de ROS nos tecidos alvos da toxicidade ao Cd, como em estudo de hepato e nefrotoxicidade (ORORORO et al., 2018). Nesse estudo, o efeito antioxidante do EWH pode ser confirmado pela normalização dos níveis de SOD e CAT no grupo de ratos pré-tratados com EWH, como também observado por Amamou et al. (2015) com co-tratamento com óleo de oliva pela ação antioxidante na prevenção das alterações desses parâmetros enzimáticos em ratos expostos à $CdCl_2$.

Em relação, a detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, nos ratos expostos ao $CdCl_2$ observa-se que aumento da atividade da GPx em epidídimo e atividade da GSH reduzida em testículo pode ser um mecanismo compensatório a ação do Cd sobre as espécies reativas de oxigênio e a interação com grupo sulfidrilas sendo indicadores de LPO. Por outro lado, o grupo pré-tratado com EWH restaurou os níveis de GSH, a exemplo de outros antioxidantes naturais, com propriedades antioxidantes como a curcumina (OGUZTURK et al. 2012; SALAMA; EL-BAHR, 2007), vitamina E e selênio (KARA et al., 2005) e *Ficus religiosa* (JAHAN et al., 2014) que também restabeleceram o perfil antioxidante de ratos expostos ao Cd.

Existem poucos estudos demonstrando os efeitos benéficos de peptídeos bioativos e aminoácidos contra a exposição a metais pesados. Anteriormente, demonstramos a capacidade do EWH de proteger contra disfunções neurológicas, cardiovasculares e reprodutoras induzidas por metais como Hg em doses baixas de exposição (RIZZETTI, 2016 a; 2016 b; RIZETTI, 2017; RIZZETTI, 2018) e preveniu a disfunção cognitiva após a exposição com Al em altas doses (MARTINEZ, 2019). Especificamente no sistema reprodutivo, no estudo de RIZETTI et al. (2016a) foi realizado a co-administração de EWH que resultou proteção contra as deficiências reprodutivas induzidas pela exposição crônica ao Hg em ratos, sendo esses efeitos atribuídos ao efeito anti-inflamatório e anti-oxidante do EWH. No presente estudo, mostramos pela primeira vez a eficácia do EWH na proteção contra uma disfunção reprodutiva acentuada induzida pela exposição ao $CdCl_2$ em níveis elevados.

Em resumo, a exposição ao Cd por 14 dias induziu importantes alterações reprodutivas como redução da qualidade espermática e aumento do dano oxidativo, confirmando a alta

toxicidade reprodutiva desse metal. No entanto, o principal achado desse estudo é que o pré-tratamento com EWH previne a disfunção reprodutiva induzida por Cd tendo, possivelmente, como mecanismo principal a redução do estresse oxidativo. Portanto, a administração de EWH como ingrediente alimentar funcional que possui propriedades antioxidantes derivada de peptídeos bioativos parece ser uma importantíssima alternativa para proteger contra a toxicidade reprodutiva induzida pela exposição ao Cd.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem, pela primeira vez, mostrar que o pré-tratamento com EWH de ratos expostos a altas concentrações de CdCl_2 por 14 dias, melhora de forma expressiva os parâmetros funcionais e morfológicos de qualidade espermática além de restaurar o peso corporal e de órgãos reprodutores sendo estes efeitos relacionados a manutenção de um melhor equilíbrio do estresse oxidativo induzido pelo metal. Portanto, o EWH, um alimento funcional, pode ser considerado uma ferramenta terapêutica alternativa útil na proteção contra os danos tóxicos induzidos pelo CdCl_2 no sistema reprodutor masculino de ratos.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para elucidar de maneira a complementar e ratificar os achados deste estudo está em curso alguns experimentos adicionais. Para confirmar o depósito de metal nos tecidos e o potencial efeito do EWH em reduzir/impedir este depósito em testículo e epidídimo e em plasma será realizada medida Cd por espectrofotometria de absorção atômica, por meio de parceria com o serviço de análises toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP com o Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior.

Sabendo-se que a liberação de hormônios do eixo hipotalâmico hipofisário, interfere diretamente na função gonadal e que a ação de metais pesados pode interferir na ação deste eixo, investiremos na avaliação dos níveis sanguíneos de FSH, LH e testosterona, a fim de obter informações de possível efeito deste metal neste sistema assim como possível efeito do EWH. Estas análises serão feitas em parceria com o Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli (PPGCF/UFES).

O processo inflamatório e apoptose são atrelados aos efeitos delérios do Cd no sistema reprodutor de maneira sistemática, e, portanto, em amostras de testículo já preparadas, realizaremos imunofluorescência para Caspase-3, TNF-alfa e COX-2 para verificar a participação destas vias neste modelo experimental.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-HAYYEH, S. et al. Cadmium accumulation in aortas of smokers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 5, p. 863–867, 2001.
- ADAMS, R. G.; HARRISON, J. F.; SCOTT, P. The development of cadmium-induced proteinuria, impaired renal function, and osteomalacia in alkaline battery workers. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 38, n. 152, p. 425–443, 1969.
- AFRIDI, H. I. et al. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. **Journal of human hypertension**, v. 24, n. 1, p. 34, 2010.
- AGENCY, E. E. C. Guidance on information requirements and chemical safety assessment R.13- metals. **Reproduction**, 2008.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Annual Report. Atlanta, GA: U.S. **Department of Health and Human Services, Public Health Service**. 2009.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for Cadmium. Atlanta, GA: U.S. **Department of Health and Human Services, Public Health Service**. 2012.
- ALCANTARA, I. L. et al. Determination of cadmium in river water samples by flame AAS after on-line preconcentration in mini-column packed with 2-aminothiazole-modified silica gel. **Analytical sciences**, v. 20, n. 7, p. 1029–1032, 2004.
- AMANUMA, K.; SUZUKI, K. T. Effect of intratracheal instillation of cadmium chloride on phospholipids in alveolar wash fluid. **Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 321–328, 1987.
- AMARA, S. et al. Preventive Effect of Zinc Against Cadmium-induced Oxidative Stress in the Rat Testis. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 2, p. 129–134, 2008.
- ANDERSEN, O.; NIELSEN, J. B.; NORDBERG, G. F. Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake - Possibilities for risk reduction. **Biometals**, v. 17, p. 543–547, 2004.
- ANDUJAR, P.; BENSEFA-COLAS, L.; DESCATHA, A. Acute and chronic cadmium poisoning. **La Revue de médecine interne**, v. 31, n. 2, p. 107–115, 2010.
- ARORA, M. et al. Association of environmental cadmium exposure with pediatric dental caries. **Environmental health perspectives**, v. 116, n. 6, p. 821–825, 2008.
- ARULDHAS, M. M. et al. Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). **Human reproduction**, v. 20, n. 10, p. 2801–2813, 2005.
- ASADI, M. H. et al. Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. **Nephro-urology monthly**, v. 6, n. 1, 2014.
- APOSHIAN, H. Vasken et al. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. **Toxicology**, v. 97, n. 1-3, p. 23-38, 1995.
- AZEVEDO, F. A. DE; CHASIN, A. A. DA M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. **São Carlos, SP: RiMa**, v. 2004, 2003.

BENCH, G. et al. Cadmium concentrations in the testes, sperm, and spermatids of mice subjected to long-term cadmium chloride exposure. **Cytometry: The Journal of the**

International Society for Analytical Cytology, v. 35, n. 1, p. 30–36, 1999.

BENOFF, S. et al. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). **Molecular Medicine**, v. 15, n. 7–8, p. 248–262, 2009.

BERNHOF, R. A. **Cadmium toxicity and treatment** *The Scientific World Journal*, 2013.

BIZARRO, P. et al. Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead–cadmium mixture. **Reproductive toxicology**, v. 17, n. 5, p. 561–566, 2003.

BLAZKA, M. E.; SHAIKH, Z. A. Sex differences in hepatic and renal cadmium accumulation and metallothionein induction: Role of estradiol. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 5, p. 775–780, 1991.

BOLKENT, S. et al. The Effects of Combined α -Tocopherol, Ascorbic Acid, and Selenium against Cadmium Toxicity in Rat Intestine. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 26, n. 1, 2007.

BOONLA, O et al. Peptides-Derived from Thai Rice Bran Improves Endothelial Function in 2K-1C Renovascular Hypertensive Rats. **Nutrients**. 15;7(7):5783-99, 2015.

BRASIL, C. N. D. M. A.-C. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 396, DE 3 DE ABRIL DE 2008** *Diário Oficial da União*. [s.l: s.n.].

CARDOSO, L.; CHASIN, A. A. M.; DA BAHIA, B. G. DO E. Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. In: **Cadernos de Referencia Ambiental**, 006. [s.l.] CRA, 2001.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, V.; CALZARETTI, G.; LANDRISCINA, C. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. **Toxicology**, v. 200, p. 29–38, 2004.

CHEN, L. et al. Effects of chronic cadmium loading on the testis and endocrine function of reproduction in male rats. **Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]**, v. 54, n. 3, p. 258–262, 2002.

CHEN, N. et al. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. **Biomaterials**, 2012.

CHIA, S. E. et al. Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. **International journal of fertility and menopausal studies**, v. 39, n. 5, p. 292–298, 1994.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de Maio de 2011** *Diário Oficial da União*, 2011.

CONAMA, C. N. DO M. A. **RESOLUÇÃO CONAMA n. 357, de 17 de março de 2005** Publicada no DOU n. 357, 2005.

DAVALOS, A. et al. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of food protection**, v. 67, n. 9, p. 1939–1944, 2004.

DE SOUZA PREDES, F.; DIAMANTE, M. A. S.; DOLDER, H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 91, n. 2, p. 125–131, 2010.

DELRASO, N. et al. Cadmium uptake kinetics in rat hepatocytes: correction for albumin binding. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 72, p. 19–30, 1 abr. 2003.

DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. S1, p. S77–S112, 1998.

- DJURIC, A. et al. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 25–33, 2015.
- DO CARMO CUPERTINO, M. et al. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. **Life sciences**, v. 175, p. 23–30, 2017.
- ELINDER, C.-G. et al. Cadmium in kidney cortex, liver, and pancreas from Swedish autopsies. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 31, n. 6, p. 292–302, 1976.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.
- FRIBERG, L.; VAHTER, M. Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring: Results of a UNEP/WHO global study. **Environmental Research**, 1983.
- FUJITA, H.; YAMAGAMI, T.; OHSHIMA, K. Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. **Nutr. Res.** 21:149-58, 2001.
- GARCÉS-RIMÓN, M. et al. Pepsin Egg White Hydrolysate Improves Glucose Metabolism Complications Related to Metabolic Syndrome in Zucker Fatty Rats. **Nutrients**, v. 10, 2018.
- GERHARDSSON, L. et al. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 16, n. 4, p. 261–266, 2002.
- GO, Y.-M. et al. Low-Dose Cadmium Causes Metabolic and Genetic Dysregulation Associated With Fatty Liver Disease in Mice. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 2, p. 524–534, 2015.
- GODT, J. et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, 2006.
- GOERING, P. L.; WAALKES, M. P.; KLAASSEN, C. D. Toxicology of cadmium. In: **Toxicology of metals**. [s.l.] Springer, 1995. p. 189–214.
- GONÇALVES, L.; ALVES, M.E.; INFRATOR, S. **FEEMA apura vazamento na Baía de Sepeti**, 1996.
- GRANADO-LORENCIO, Fernando; HERNÁNDEZ-ALVAREZ, Elena. Functional foods and health effects: a nutritional biochemistry perspective. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 26, p. 2929-2957, 2016.
- HASSLER, E.; LIND, B.; PISCATOR, M. Cadmium in blood and urine related to present and past exposure. A study of workers in an alkaline battery factory. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 40, n. 4, p. 420–425, 1983.
- HENRY, C. J. **Functional foods**. **Eur J Clin Nutr** 64, 657–659, 2010.
- HIRANO, S.; TSUKAMOTO, N.; SUZUKI, K. T. Biochemical changes in the rat lung and liver following intratracheal instillation of cadmium oxide. **Toxicology letters**, v. 50, n. 1, p. 97–105, 1990.
- HIRANO, T.; YAMAGUCHI, Y.; KASAI, H. Inhibition of 8-hydroxyguanine repair in testes after administration of cadmium chloride to GSH-depleted rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 147, n. 1, p. 9–14, 1997.
- HONDA, R. et al. Cadmium exposure and trace elements in human breast milk. **Toxicology**, v. 186, n. 3, p. 255–259, 2003.
- HORIGUCHI, H. [Current status of cadmium exposure among Japanese, especially regarding the safety standard for cadmium concentration in rice and adverse effects on proximal renal

- tubular function observed in farmers exposed to cadmium through consumption of self-grown . **Nihon eiseigaku zasshi. Japanese journal of hygiene**, v. 67, n. 4, p. 447–454, 2012.
- HUANG, D. et al. Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. **Planta**, v. 245, n. 5, p. 863–873, 2017.
- ICMBIO. **Instituto Chico Mendes Biodiversidade-Santa, Nota Técnica N. 02/2016 Conjunta – APA Costas das Algas /RVS**. 2016
- INABA, T. et al. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. **Toxicology letters**, v. 159, n. 2, p. 192–201, 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS [IBAMA]. **Laudo Técnico Preliminar - Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais**Laudo Técnico Preliminar. [s.l: s.n.].
- ICDA. International Cadmium Association . Disponível: www.cadmium.org, 2013.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Summaries & evaluations: Cadmium and cadmium compounds (Group 1). Lyon, p. 119 **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Vol. 58;1993.
- JAHAN, S. et al. Comparative analysis of antioxidants against cadmium induced reproductive toxicity in adult male rats. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 60, n. 1, p. 28–34, 2014.
- JÄRUP, L. Cadmium overload and toxicity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. suppl_2, p. 35–39, 2002.
- JÄRUP, L.; ÅKESSON, A. **Current status of cadmium as an environmental health problem****Toxicology and Applied Pharmacology**, 2009.
- JIMÉNEZ-ORTEGA, V. et al. Cadmium as an endocrine disruptor: correlation with anterior pituitary redox and circadian clock mechanisms and prevention by melatonin. **Free radical biology and medicine**, v. 53, n. 12, p. 2287–2297, 2012.
- JIN, Y. et al. Cadmium exposure to murine macrophages decreases their inflammatory responses and increases their oxidative stress. **Chemosphere**, v. 144, p. 168–175, 2016.
- JONES, Mark M.; CHERIAN, M. George. The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. **Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 1-25, 1990.
- JOSEPH, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 272–279, 2009.
- JUSTIÇA GLOBAL. VALE DE LAMA - Relatório de inspeção em Mariana após o rompimento da barragem de rejeitos do Fundão. 2015. 2015.
- KADE, I. J. Mercury Toxicity on Sodium Pump and Organoseleniums Intervention: A Paradox. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- KAJI, M. Role of experts and public participation in pollution control: the case of Itai-itai disease in Japan1. **Ethics in science and environmental politics**, v. 12, n. 2, p. 99–111, 2012.
- KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox Regulation of Cellular Signalling. **Cellular Signalling**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 1999.
- KARA, H. et al. Effects of Exogenous Metallothionein on Acute Cadmium Toxicity in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 104, n. 3, p. 223–232, 2005.
- KIDO, T. et al. Dose-response relationship between urinary cadmium and metallothionein in a

- Japanese population environmentally exposed to cadmium. **Toxicology**, v. 65, n. 3, p. 325–332, 1991.
- KIM, N. Environment Waikato Technical Report 2005/51. Document 921188v2, 2005.
- KIPPLER, M. et al. Factors influencing intestinal cadmium uptake in pregnant Bangladeshi women—a prospective cohort study. **Environmental research**, v. 109, n. 7, p. 914–921, 2009.
- KIRK-OTHMER. **Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, Volumes 1-26**. [s.l.: s.n.].
- KIRSCHVINK, N. et al. Airway inflammation in cadmium-exposed rats is associated with pulmonary oxidative stress and emphysema. **Free radical research**, v. 40, n. 3, p. 241–250, 2006.
- KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; DIWAN, B. A. **Metallothionein protection of cadmium toxicity****Toxicology and Applied Pharmacology**, 2009.
- KOIZUMI, T.; LI, Z. G. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 37, n. 1, p. 25–36, 1992.
- KOYUTURK, M. et al. Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 235–240, 2006.
- KUNDU, S. et al. Cadmium induces lung inflammation independent of lung cell proliferation: a molecular approach. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 6, p. 19, 12 jun. 2009.
- LAUWERYS, R. R. et al. Epidemiological Survey of Workers Exposed to Cadmium. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 28, n. 3, p. 145–148, mar. 1974.
- LI, X. X.; HAN, L. J.; CHEN, L. J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **J Sci Food Agric**. 88:1660-6, 2008.
- LIZOTTE, J. et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor by osteoblastic cells: protection against cadmium toxicity. **Toxicology letters**, v. 215, n. 3, p. 167–173, 2012.
- MAINIER, F. B.; DOS SANTOS, F. B. Os revestimentos de cádmio e as contaminações ambientais. **Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Engenharia, Niterói, RJ, Brasil**, 2006.
- MANNA, P.; SINHA, M.; SIL, P. C. Cadmium induced testicular pathophysiology: prophylactic role of taurine. **Reproductive toxicology**, v. 26, n. 3–4, p. 282–291, 2008.
- MANSO, M. A. et al. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. **Food chemistry**, v. 109, n. 2, p. 361–367, 2008.
- MARETTOVÁ, E.; MARETTA, M.; LEGÁTH, J. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: a review. **Animal reproduction science**, v. 155, p. 1–10, 2015.
- MARTELLI, A. et al. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1807–1814, 2006.
- MARTINEZ, Caroline S. et al. 60-day chronic exposure to low concentrations of HgCl₂ impairs sperm quality: hormonal imbalance and oxidative stress as potential routes for reproductive dysfunction in rats. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e111202, 2014.
- MARTINEZ, C. S. et al. Egg White Hydrolysate as a functional food ingredient to prevent cognitive dysfunction in rats following long-term exposure to aluminum. **Scientific Reports**, 2019.

- MARTINEZ, C. S et al. Egg White Hydrolysate: A new putative agent to prevent vascular dysfunction in rats following long-term exposure to aluminum. *Food and Chemical Toxicology*, v. 133, p. 110799, 2019.
- MATTIAZZO-PREZOTTO, M. E. **Comportamento de cobre, cádmio, crômio, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH.** [s.l: s.n.].
- MCELROY, J. A. et al. Urinary cadmium levels and tobacco smoke exposure in women age 20–69 years in the United States. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 70, n. 20, p. 1779–1782, 2007.
- MCGEER, J. C.; NIYOGI, S.; SCOTT SMITH, D. Cadmium. *Fish Physiology*, v. 31, p. 125–184, 1 jan. 2011.
- MENKE, A. et al. Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults. *Environmental Health Perspectives*, 2009.
- MESSER, C. M.; SHRIVER, T. E. Corporate Responses to Claims of Environmental Misconduct: The Case of Phelps Dodge and Blackwell, Oklahoma. *Deviant Behavior*, v. 30, n. 7, p. 647–668, 2009.
- MIGUEL, M. et al. Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods. *European Food Research and Technology*, v. 221, n. 3, p. 542–546, 2005.
- MIN, K.-S. et al. Effect of hemolytic and iron-deficiency anemia on intestinal absorption and tissue accumulation of cadmium. *Toxicology letters*, v. 179, n. 1, p. 48–52, 2008.
- MITRA, E. et al. Protective effect of aqueous Curry leaf (*Murraya koenigii*) extract against cadmium-induced oxidative stress in rat heart. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 5, p. 1340–1353, 2012.
- MORROW, Hugh. Cadmium and cadmium alloys. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, p. 1-36, 2000.
- MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*, v. 25, n. 5, p. 747–806, 2004.
- NAND, V. et al. Water purification using *Moringa oleifera* and other locally available seeds in Fiji for heavy metal removal. *International Journal of Applied*, v. 2, n. 5, 2012.
- NATH, R. et al. Molecular basis of cadmium toxicity. *Progress in food & nutrition science*, v. 8, n. 1–2, p. 109–163, 1984.
- NOGAWA, K. Chapter 32 – Cadmium. In: **Handbook on the Toxicology of Metals.** [s.l: s.n.].
- NORDBERG, G. F. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 238, n. 3, p. 192–200, 1 ago. 2009.
- NORDBERG, M.; NORDBERG, G. F. **Toxicological aspects of metallothionein. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 2000.**
- NOKES, Chris; WEAVER, Louise. Cadmium in Groundwater: review of regional council data. **Ministry of Health, Wellington**, 2014.
- NRIAGU, J. O. **Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere** [7] *Nature*, 1979.
- OGA, S.; DE SIQUEIRA, M. E. P. B. Introdução a toxicologia. In: **Fundamentos de toxicologia.** [s.l: s.n.]. p. 1–10.

- OGAWA, T. et al. Relationship among prevalence of patients with Itai-itai disease, prevalence of abnormal urinary findings, and cadmium concentrations in rice of individual hamlets in the Jinzu River basin, Toyama prefecture of Japan. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 14, n. 4, p. 243–252, 2004.
- ÖHRVIK, H. et al. Effects of cadmium on calcium transporter SPCA, calcium homeostasis and β -casein expression in the murine mammary epithelium. **Toxicology letters**, v. 201, n. 1, p. 80–85, 2011.
- OLIVEIRA, V. DE C.; OLIVEIRA, D. DE C. A semântica do eufemismo: mineração e tragédia em Brumadinho. 2019.
- ORORORO, O. C. et al. Effects of Hibiscus Sabdarrafa L. anthocyanins on cadmium-induced oxidative stress in Wistar rats. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 22, n. 4, p. 465–470, 2018.
- OTEIZA, P. I.; ADONAYLO, V. N.; KEEN, C. L. Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. **Toxicology**, v. 137, n. 1, p. 13–22, 1999.
- PAN, J. et al. Cadmium levels in Europe: implications for human health. **Environmental geochemistry and health**, v. 32, n. 1, p. 1–12, 2010.
- PROZIALECK, W. C.; EDWARDS, J. R. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 1, p. 74–93, abr. 2007.
- QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresour Technol.** 99:1690-8, 2008.
- RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Res Int.** 38:175-82, 2005.
- REBELO, F. M.; CALDAS, E. D. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. **Environmental research**, v. 151, p. 671–688, 2016.
- REEVES, P. G.; CHANEY, R. L. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. **Science of the total environment**, v. 398, n. 1–3, p. 13–19, 2008.
- REQUENA, T. et al. Pepsin egg white hydrolysate modulates gut microbiota in Zucker obese rats. **Food & Function**, v. 8, n. 1, p. 437–443, 2017.
- REVILLA, E.; MARIA, C. S.; MIRAMONTES, E.; BAUTISTA, J.; GARCIA- MARTINEZ, A.; CREMADES, O. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. **Food Res Int.** 42:387-93, 2009.
- RIZZETTI, D. A. et al. Ameliorative effects of egg white hydrolysate on recognition memory impairments associated with chronic exposure to low mercury concentration. **Neurochemistry International**, 2016.
- RIZZETTI, Danize Aparecida et al. Egg white hydrolysate promotes neuroprotection for neuropathic disorders induced by chronic exposure to low concentrations of mercury. **Brain research**, v. 1646, p. 482-489, 2016.
- RIZZETTI, D. A. et al. Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.
- RIZZETTI, Danize Aparecida et al. Egg white-derived peptides prevent cardiovascular disorders induced by mercury in rats: role of angiotensin-converting enzyme (ACE) and

NADPH oxidase. **Toxicology letters**, v. 281, p. 158-174, 2017.

ROCHA, Joao BT et al. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, v. 100, n. 1-3, p. 27-37, 1995.

SANTOS-HERNÁNDEZ, Marta et al. Effect of egg white digests on the release of gastrointestinal hormones in STC-1 cells. 2018.

SARKAR, A.; RAVINDRAN, G.; KRISHNAMURTHY, V. A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. **Int J Biotechnol Res**, v. 3, n. 1, p. 17–36, 2013.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A Review. **Peptides**. 31:1949-56, 2010.

SATARUG, S. et al. **A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population** **Toxicology Letters**. [s.l: s.n.].

SCHWARTZ, D. A. et al. Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 267, n. 5, p. L609–L617, 1994.

SEARS, M. E. Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification--a review. **Scientific World Journal**. 2013:219840, 2013.

SMACCHI, E.; FOX, P. F.; GOBBETTI, M. Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458. **FEMS Microbiol Lett**. 170(2):327-33, 1999.

SEBASTIAN, Abin; PRASAD, Majeti Narasimha Vara. Cadmium minimization in rice. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 1, p. 155-173, 2014.

SETCHELL, B. P.; WAITES, G. M. H. Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 47, n. 1, p. 81–86, 1970.

SINGH, B. R.; STEINNES, E. Soil and water contamination by heavy metals. **Soil processes and water quality**, p. 233–272, 1994.

SIU, E. R. et al. **Cadmium-induced testicular injury** **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2009.

SUGHIS, M. et al. Bone resorption and environmental exposure to cadmium in children: a cross-sectional study. **Environmental Health**, v. 10, n. 1, p. 104, 2011.

SUGIYAMA, M. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. **Cell biology and toxicology**, v. 10, n. 1, p. 1–22, 1994.

SUN, S. et al. Antioxidant and anti-fatigue activities of egg white peptides prepared by pepsin digestion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 15, p. 3195–3200, 2014.

TAHA, E. A. et al. Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males. **Central European journal of urology**, v. 66, n. 1, p. 84, 2013.

TAN, K. H. **Soil sampling, preparation, and analysis**. [s.l.] CRC press, 2005.

TANDY, S. et al. Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 3, p. 937–944, 2004.

- TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. **Química nova**, v. 15, n. 2, p. 147–154, 1992.
- TELISMAN, S. et al. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. 1, p. 45–53, 2000.
- THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 25, p. 304–315, 1 maio 2008.
- TORRES, D. et al. Risk assessment associated with exposure to lead and cadmium in Portuguese Population. **Acta Portuguesa de Nutrição**, N. ° 13 (Resumos e Comunicações Orais, pp. 38-47), 2018.
- TRINDER, D. et al. Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. **Gut**, v. 46, n. 2, p. 270–276, fev. 2000.
- TURNER, T. T.; LYSIAK, J. J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. **Journal of andrology**, v. 29, n. 5, p. 488–498, 2008.
- UENO, D. et al. Physiological, genetic, and molecular characterization of a high-Cd-accumulating rice cultivar, Jarjan. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 7, p. 2265–2272, 2010.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Developing Integrated Solid Waste Management Plan - Training Manual. **United Nations Environment Programme (UNEP)**, 2009.
- WANG, H. et al. Redistribution of subcellular calcium and its effect on apoptosis in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead. **Toxicology**, v. 333, p. 137–146, jul. 2015.
- WANG, R.-S. et al. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5624–5633, 2006.
- WASANA, H. M. S. et al. Drinking water quality and chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu): synergic effects of fluoride, cadmium and hardness of water. **Environmental geochemistry and health**, v. 38, n. 1, p. 157–168, 2016.
- WÄTJEN, W.; BEYERSMANN, D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. **Biometals**, v. 17, n. 1, p. 65–78, 2004.
- WESTER, R. C. et al. In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. **Toxicological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–5, 1992.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution. **Joint WHO I Convention Task Force on Health Aspects of Air Pollution**, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cadmium. In: Guidelines for drinking-water quality, 3rd edition incorporating 1st and 2nd addenda. Vol. 1. .WHO . Recommendations. Geneva, World Health Organization, pp. 317–319, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Exposure to cadmium: a major public health concern. **Preventing Disease Through Healthy Environments**, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain food additive and contaminants (Section 5.2 Lead). WHO - **World Health Organization technical report series**, 2011.

WÜNSCH FILHO, V. et al. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, p. 175–187, 2010.

XIE, Z.; HUANG, J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Food Chem.** 111:370-6, 2008

XU, Q. et al. Understanding and mitigating the toxicity of cadmium to the anaerobic fermentation of waste activated sludge. **Water research**, v. 124, p. 269–279, 2017.

YANG, H. S. et al. Effects of α -Tocopherol on Cadmium-Induced Toxicity in Rat Testis and Spermatogenesis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 21, n. 3, p. 445, 2006.

YANG, J.-M. et al. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. **Reproductive toxicology**, v. 17, n. 5, p. 553–560, 2003.

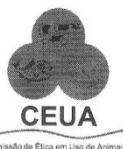
ZHANG, H. et al. TRPC1 is involved in Ca^{2+} influx and cytotoxicity following Pb^{2+} exposure in human embryonic kidney cells. **Toxicology Letters**, v. 229, n. 1, p. 52–58, ago. 2014.

ZHOU, T. et al. Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. **Toxicology**, 1999.

ANEXO 1



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



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 012/2019

Título: O pré-tratamento com hidrolisado de clara de ovo previne os danos cardiovasculares, reprodutores e do sistema nervoso central e periférico induzidos pela exposição ao cádmio?

Data da aprovação: 08/05/2019

Período de vigência do projeto: 08/05/2021

Pesquisadores(a): Giulia Alessandra Wiggers

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (55) 99914-7174

E-mail: giuliapecanha@gmail.com

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	80
Peso/Idade	300 g/12 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério Central da UFSM

Profª. Drª. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA