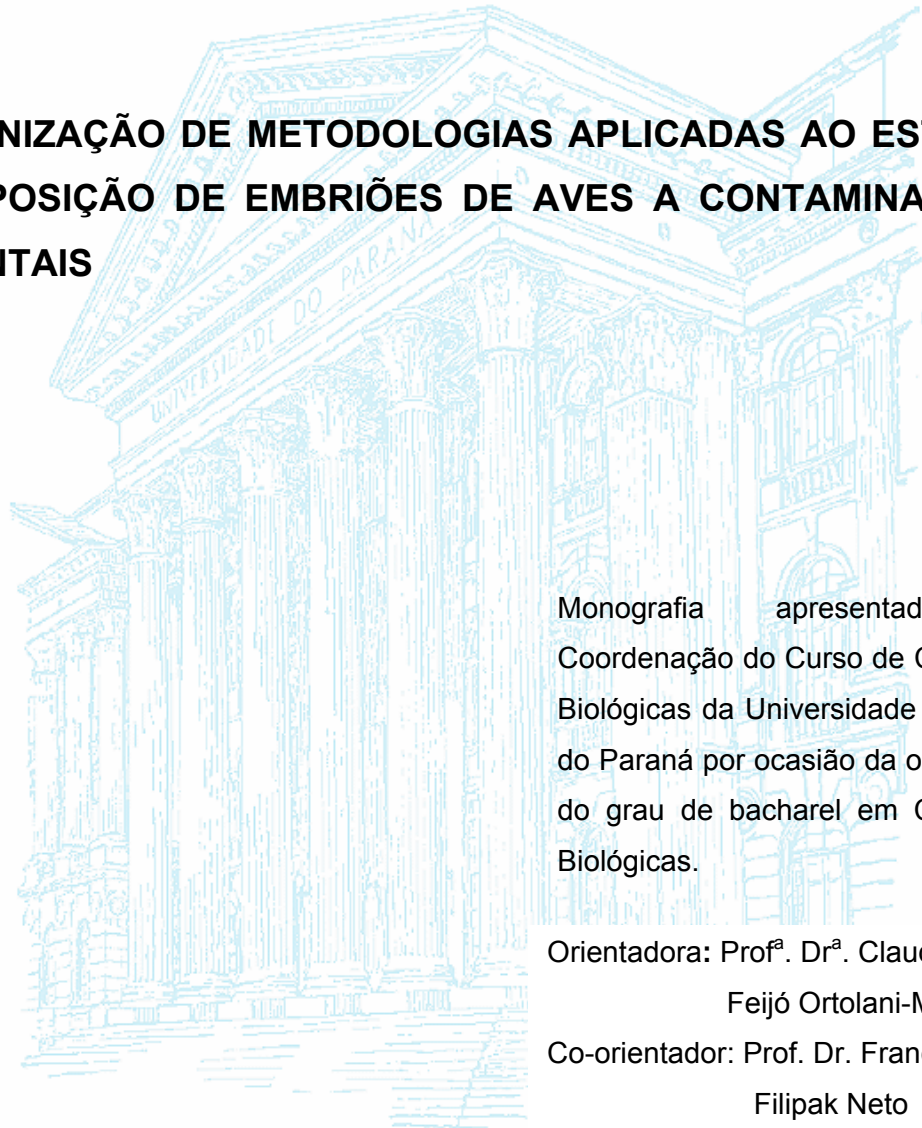


FLÁVIA YOSHIE YAMAMOTO

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS APLICADAS AO ESTUDO
DA EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES DE AVES A CONTAMINANTES
AMBIENTAIS**



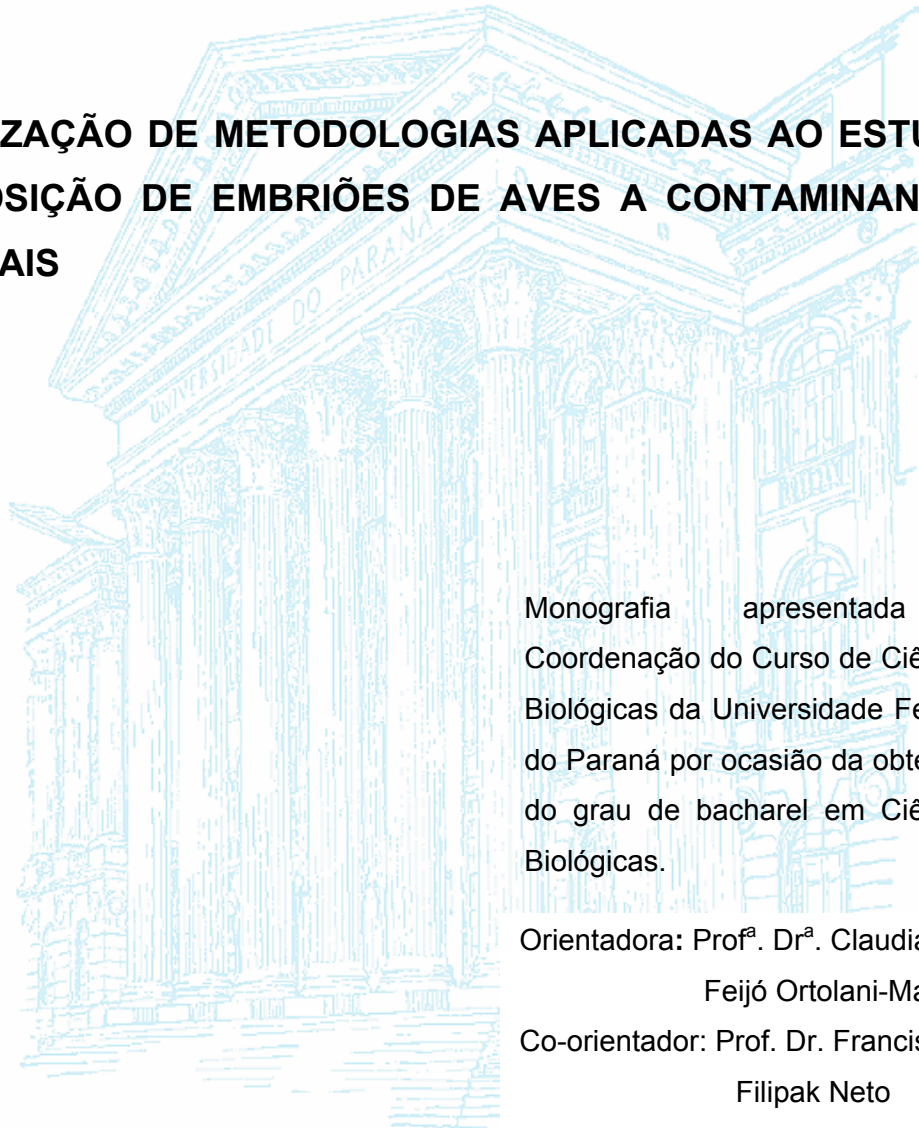
Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal
do Paraná por ocasião da obtenção
do grau de bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia
Feijó Ortolani-Machado
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco
Filipak Neto

Curitiba 2009

FLÁVIA YOSHIE YAMAMOTO

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS APLICADAS AO ESTUDO
DA EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES DE AVES A CONTAMINANTES
AMBIENTAIS**



Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal
do Paraná por ocasião da obtenção
do grau de bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia
Feijó Ortolani-Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco
Filipak Neto

Curitiba 2009

AGRADECIMENTOS

À todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho:

À professora Claudia Feijó-Ortolani Machado que me orientou com muita dedicação e paciência.

Ao professor Francisco Filipak Neto que me transmitiu vários conhecimentos essenciais, não só para este trabalho assim como para outros realizados anteriormente.

À professora Patrícia Franchi de Freitas que sempre esteve disposta a me ensinar e retirar dúvidas.

Ao professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro que me abriu portas para entrar no ramo da pesquisa em Ecotoxicologia Celular e continua me guiando nesta área.

Aos meus pais, Célia e Hiroyuki, que me incentivaram e ensinaram a importância do estudo e das conquistas.

Aos meus irmãos e amigos que sempre me apoiaram nos momentos difíceis.

Aos colegas dos laboratórios de Toxicologia Celular e de Biologia do Desenvolvimento que sempre estavam dispostos a ajudar.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Embriões de aves como modelo de estudo.....	1
1.2 Desenvolvimento embrionário de <i>Gallus gallus</i>	2
1.3 Cádmió.....	5
1.4 Biomarcadores.....	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Desenho experimental.....	10
3.2 Análises morfológicas.....	12
3.2.1 Coleta dos embriões.....	12
3.2.2 Determinação do estágio embrionário.....	13
3.3 Análises bioquímicas.....	20
3.3.1 Atividade da Glutathione S-Transferase (GST).....	20
3.3.2 Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	20
3.3.3 Quantificação de proteínas totais.....	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Metodologia empregada.....	22
4.2 Análises morfológicas.....	24
4.3 Análises bioquímicas.....	33
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Fêmea adulta e indivíduos jovens de <i>Gallus gallus</i>	2
FIGURA 2. Ilustração esquemática da clivagem discoidal das aves e répteis.....	3
FIGURA 3. Formação do tubo neural.....	4
FIGURA 4. Cádmio.....	6
FIGURA 5. Estrutura de um ovo fertilizado de galinha no momento da postura..	10
FIGURA 6. Exposição dos ovos ao cloreto de cádmio.....	11
FIGURA 7. Coleta dos embriões.....	13
FIGURA 8. Embriões nos estádios embrionários 9, 10, 11 e 12.....	17
FIGURA 9. Embriões nos estádios embrionários 13, 14, 15 e 16.....	18
FIGURA 10. Embriões nos estádios embrionários 17, 18, 19 e 20.....	19
FIGURA 11. Ovos injetados com corante vital Azul de Tripan.....	22
FIGURA 12. Porcentagem de indivíduos alterados em cada grupo de embriões (48h).....	25
FIGURA 13. Porcentagem de indivíduos alterados em cada grupo de embriões (72h).....	26
FIGURA 14. Embriões controles e expostos a 5 μ M de Cd (48 h).....	28
FIGURA 15. Embriões expostos a 50 μ M de Cd (48 h).....	29
FIGURA 16. Embriões controle (72 h).....	30
FIGURA 17. Embriões expostos a 5 μ M de Cd (72 h).....	31
FIGURA 18. Embriões expostos a 50 μ M de Cd (72 h).....	32
FIGURA 19. Atividade da Glutathione S-Transferase (GST).....	33
FIGURA 20. Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Quantidade de ovos utilizados para o experimento.....	11
TABELA 2. Estádio de desenvolvimento embrionário de acordo com a contagem de somitos.....	14
TABELA 3. Características presentes nos embriões de galinha de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário.....	14
TABELA 4. Quantidade de embriões com 48 h de incubação que sobreviveram, morreram, não desenvolveram ou rasgaram.....	23
TABELA 5. Quantidade de embriões com 72 h de incubação que sobreviveram, morreram, não desenvolveram ou rasgaram.....	23
TABELA 6. Estádios embrionários dos embriões com 48 h de incubação.....	24
TABELA 7. Estádios embrionários dos embriões com 72 h de incubação.....	24
TABELA 8. Alterações em cada grupo de embriões com 48 h de incubação.....	25
TABELA 9. Alterações em cada grupo de embriões com 72 h de incubação.....	27

RESUMO

Atualmente os embriões de aves têm sido frequentemente utilizados como modelo de estudos experimentais por serem de fácil obtenção e monitoramento, pelo curto período de desenvolvimento, por sua maior sensibilidade à ação de agentes químicos entre outras vantagens. Diversas substâncias podem agir sobre os mecanismos da embriogênese, alterando as características normais do indivíduo. O cádmio (Cd) é um metal pesado de elevada toxicidade e apresenta vários trabalhos que relatam seus efeitos adversos em uma variedade de modelos animais, inclusive em embriões de galinha. Para avaliar as condições em que um organismo se encontra é possível utilizar biomarcadores que demonstrem alterações a nível tecidual, celular ou molecular. Como o embrião de ave apresenta vários aspectos que favorecem seu uso como modelo de estudo em toxicologia, surgiu a necessidade da padronização de metodologias aplicadas ao estudo da exposição de embriões de aves a contaminantes ambientais para serem utilizadas no laboratório de Biologia do Desenvolvimento e de Toxicologia celular da UFPR. Para o presente trabalho, embriões de *Gallus gallus* (galinha) foram expostos ao cádmio através da injeção da solução de cloreto de cádmio (5 μ M e 50 μ M) na região da câmara de ar do ovo. O grupo controle recebeu injeção de solução de PBS. Após a exposição, os ovos foram incubados durante 48 h e 72 h, que correspondem aos estágios de desenvolvimento embrionários 12-13 e 18-19 (HAMBURGER e HAMILTON, 1951), respectivamente. Para as análises morfológicas os embriões foram fixados em Carnoy e corados com Carmalúmen de Mayer. As atividades enzimáticas da Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e da Glutathione S-transferase (GST) dos embriões foram quantificadas em um espectrofotômetro de microplaca. Durante a coleta dos embriões houve uma perda significativa de indivíduos que rasgaram (principalmente os embriões de 48 h), além dos que morreram ou não desenvolveram. Verificou-se que os indivíduos expostos à maior dose de Cd apresentaram mais alterações, principalmente na região cefálica, que os embriões dos demais grupos. Nas análises enzimáticas, houve um aumento na atividade específica da G6PDH em embriões num estágio mais avançado de desenvolvimento. Portanto, os embriões de galinha demonstraram ser bons modelos de estudo para contaminantes ambientais, apresentando elevada sensibilidade ao cádmio.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Embriões de aves como modelo de estudo

Embora os embriões de aves sejam comumente empregados como modelo para estudos nas áreas de embriologia comparada e biologia do desenvolvimento, eles também têm sido usados como modelo para estudos de agentes tóxicos, já que são muito sensíveis à ação de agentes químicos (BRUNSTRÖM e REUTERGÅRD, 1986; BRUNSTRÖM, 1988 e 1989; ENGWALL *et al.*, 1994).

Algumas das vantagens em se utilizar embriões de aves como bioindicadores incluem a facilidade de obtenção, manipulação e monitoramento de alterações durante o desenvolvimento embrionário. Outros aspectos que favorecem seu uso são: 1) os ovos são do tipo megalécito (dispondo de reservas nutricionais e não dependendo do ambiente externo para nutrição durante o desenvolvimento embrionário); 2) apresentam membranas envoltórias resistentes; 3) o tempo total de desenvolvimento é curto (21 dias no caso de galinhas); 4) os embriões desenvolvem-se na ausência do organismo materno e na região superior do ovo, permitindo que o desenvolvimento embrionário possa ser acompanhado diariamente em laboratório (SCHOENWOLF, 1999) e, 5) seu desenvolvimento é muito bem documentado (HAMBURGER e HAMILTON, 1951). Tais características fazem do embrião de ave um excelente modelo para avaliar os efeitos de agentes químicos tóxicos no desenvolvimento embrionário e, dependendo dos estágios avaliados, importantes comparações com mamíferos podem ser realizadas.

A espécie de ave mais utilizada em estudos de laboratório é *Gallus gallus* (galinha, Figura 1), sendo necessário incubar os ovos por um período de 21 dias, em temperatura de 38°C, oxigenação e umidade apropriadas para que a eclosão possa ocorrer (GONZALES, 1994). A relação entre o aparecimento de estruturas embrionárias com o tempo de desenvolvimento pode ser organizada em estádios (HH) (HAMBURGER e HAMILTON, 1951), o que permite acompanhar as rápidas transformações embrionárias que não poderiam ser registradas apenas em função do período em desenvolvimento. Assim, o conhecimento das etapas do

desenvolvimento embrionário permite acompanhar a organização estrutural básica do embrião.

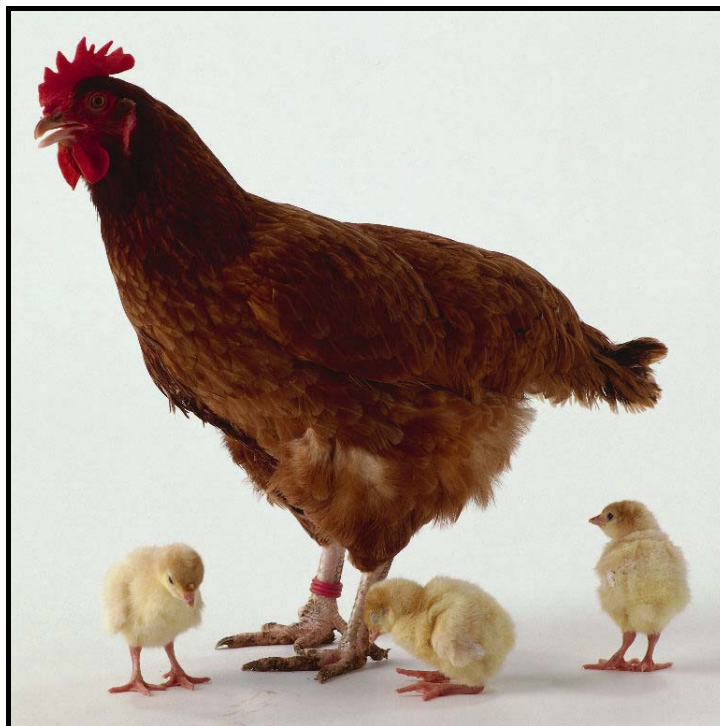


Figura 1. Fêmea adulta e indivíduos jovens de *Gallus gallus*.

1.2 Desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*

As aves apresentam ovos do tipo telolécito (possuem grande quantidade de vitelo), já que o desenvolvimento embrionário se dá externamente ao corpo da fêmea (GILBERT, 1995).

O processo de clivagem (discoidal, Figura 2) do óvulo fertilizado se inicia no oviduto da galinha, resultando na formação do blastodisco ou blastoderme no topo de uma massa de vitelo, o qual passa a ser envolvido pelo albume e pela casca (WOLPERT, 2000). A região central do blastodisco, situada sobre uma cavidade (espaço subgerminativo), é translúcida (área pelúcida), ao contrário da região externa mais escura (zona opaca). Após a postura do ovo o embrião apresenta duas camadas de células: o epiblasto (superior, originará o embrião) e o hipoblasto (inferior, originará estruturas extra-embrionárias), dando início a fase da gastrulação (GILBERT, 1995).

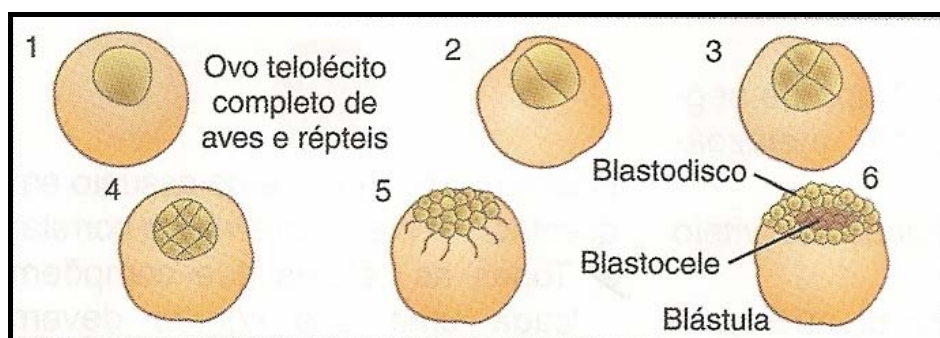


Figura 2. Ilustração esquemática da clivagem discoidal das aves e répteis.

O início da gastrulação é marcado pelo desenvolvimento da linha primitiva, precursora do eixo ântero-posterior. Ela representa a região onde as células do epiblasto estão proliferando e migrando para o interior, para baixo da camada superior (WOLPERT, 2000). Na extremidade anterior da linha é formada uma condensação de células conhecida como nó de Hensen, que dará origem à notocorda. Portanto, durante a gastrulação ocorrem intensos movimentos de células e camadas celulares, que culminam com a formação dos três folhetos embrionários: endoderme, mesoderme e ectoderme. Da endoderme se originam o epitélio respiratório, a bexiga, o trato digestivo e seus derivados. A mesoderme dá origem ao sistema músculo-esquelético, tecidos conjuntivos e outros órgãos internos como rins e coração. Já da ectoderme se originam a epiderme, seus anexos e o sistema nervoso (WOLPERT, 2000).

O desenvolvimento do embrião de ave é ântero-posterior, pois ocorre simultaneamente a gastrulação em regiões posteriores do embrião e o início da neurulação na sua região anterior. Durante a neurulação, a ectoderme se separa em dois compartimentos distintos: ectoderme de revestimento (dará origem à epiderme e seus anexos) e ectoderme neural (formará o sistema nervoso).

A neurulação consiste da formação da placa neural na linha média do embrião, que se invagina formando o sulco neural ao centro, com as pregas neurais nas laterais. Esta invaginação dará origem ao tubo neural (Figura 3) que na sua porção mais anterior formará o encéfalo e na porção posterior à medula espinhal. As células contidas nas extremidades das dobras neurais irão se segregar e formar a crista neural. Acompanhando a neurulação e o desenvolvimento da dobra cefálica, o embrião também se dobra no lado ventral

para formar o intestino, o que une os dois rudimentos de coração para formar um órgão localizado ventralmente em relação ao intestino.

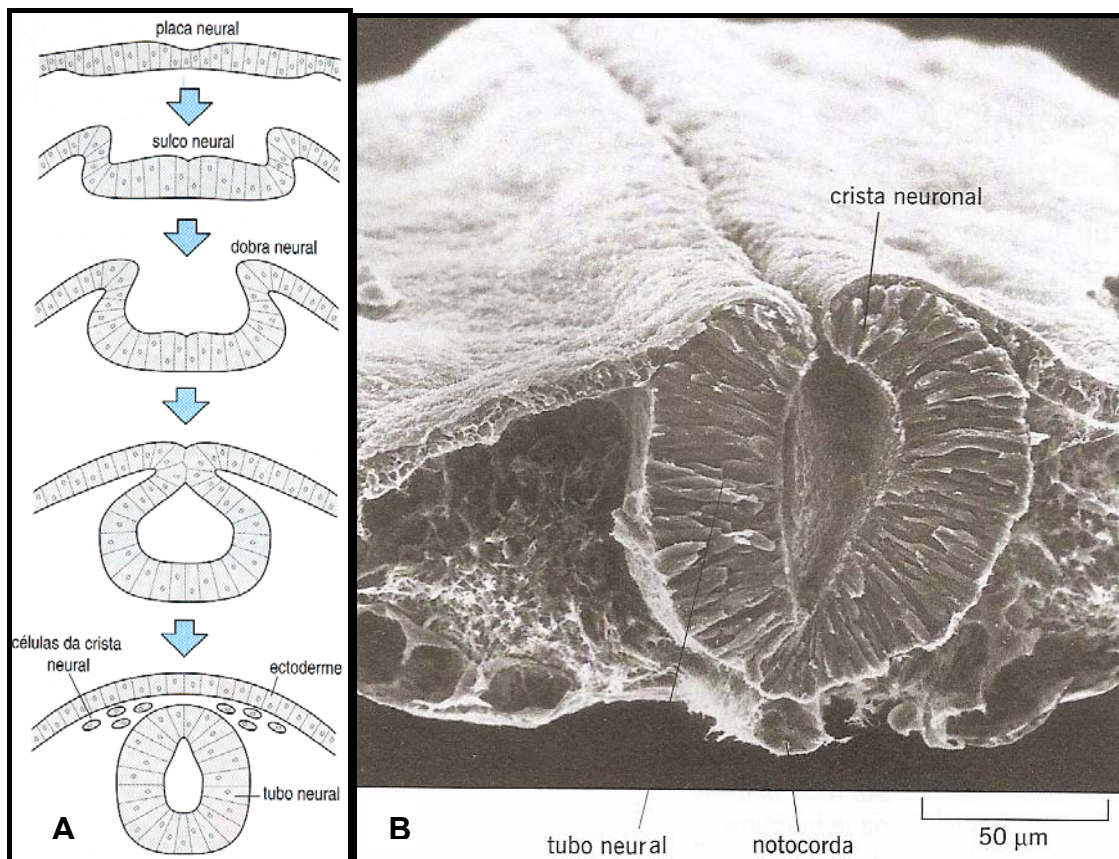


Figura 3. Formação do tubo neural. A – Ilustração do destacamento das células da crista neural durante o fechamento do tubo neural. Fonte: WOLPERT *et al.*, 2000. B – Micrografia eletrônica de varredura mostra uma secção transversal do tronco de um embrião de galinha de dois dias. Fonte: ALBERTS *et al.*, 2006.

A formação de somitos progride em uma direção posterior a uma velocidade de aproximadamente um par de somitos por hora. Em torno de dois dias após a postura o embrião já atingiu o estágio de 20 somitos, e em três dias, em torno de 40 somitos são formados, a cabeça está bem desenvolvida, o coração formado e os membros estão começando a se desenvolver. Ilhas de sangue (onde a hematopoiese está ocorrendo) e vasos sanguíneos desenvolveram-se em tecidos extra-embriônicos sendo que esses vasos conectam-se com aqueles do embrião para permitir a circulação com o batimento cardíaco. Nesse estágio, o embrião vira-se de lado e a cabeça está fortemente flexionada. O embrião obtém a sua nutrição pelas membranas extra-embriônicas, que também fornecem proteção. O saco amniótico, cheio de fluido, fornece proteção mecânica; o córion envolve todo o embrião e fica imediatamente

sob a casca; o alantóide recebe produtos excretórios e provê o sítio de troca de oxigênio e dióxido de carbono; o saco vitelínico envolve o vitelo (WOLPERT *et al.*, 2000).

No tempo restante, antes da eclosão, os olhos e os ouvidos se desenvolvem a partir das vesículas ópticas e óticas, respectivamente. O embrião cresce em tamanho, os órgãos internos se desenvolvem, as asas, pernas e o bico são formados e penas inferiores formam-se nas asas e no corpo. O pinto eclode 21 dias após a postura do ovo.

1.3 Cádmio

Diversas substâncias podem agir sobre os mecanismos da embriogênese, alterando o padrão normal da espécie (VODELA *et al.*, 1997; DIAS e MÜLLER, 1999; HEATON e BRADLEY, 1995; CARVALHO, 2002; SCHATZ, 2003). As anormalidades entre embriões podem ser usadas para indicar o potencial teratogênico dos compostos (CHO e LEE, 1990; HEINRICH-HIRSCH *et al.*, 1990), e as medidas do embrião, saco vitelínico ou massa dos órgãos indicam se um composto interfere com o crescimento (MAYER *et al.*, 1992). A mortalidade é o último biomarcador dos efeitos tóxicos e indica a ação letal de um composto.

Diversas ações antrópicas são responsáveis pelo impacto ambiental que alteram o equilíbrio normal dos ecossistemas resultando na morte de várias espécies. A utilização do cádmio em processos industriais como pigmentos, estabilizantes de plásticos, ligas metálicas e principalmente na fabricação de baterias de níquel-cádmio (Figura 4B) tem aumentado significativamente desde o fim do século XX (THOMPSON *et al.*, 2005; CULLINANE *et al.*, 2009).

O cádmio é um metal de transição, sólido à temperatura ambiente (Figura 4A) e é extremamente tóxico, sendo classificado em 7º lugar no ranque de prioridade da lista de substâncias perigosas da Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2007). Não é considerado um metal essencial já que se desconhecem funções nutritivas ou fisiológicas deste metal. As principais formas de exposição ao cádmio são por via oral (através de alimentos e água contaminados) e por inalação do ar de áreas urbanas próximas a indústrias. A fumaça de cigarro é considerada a principal fonte de contaminação

crônica, onde 0,2 a 1,0 μg de Cd é assimilado por cigarro fumado (ZHANG *et al.*, 2009).

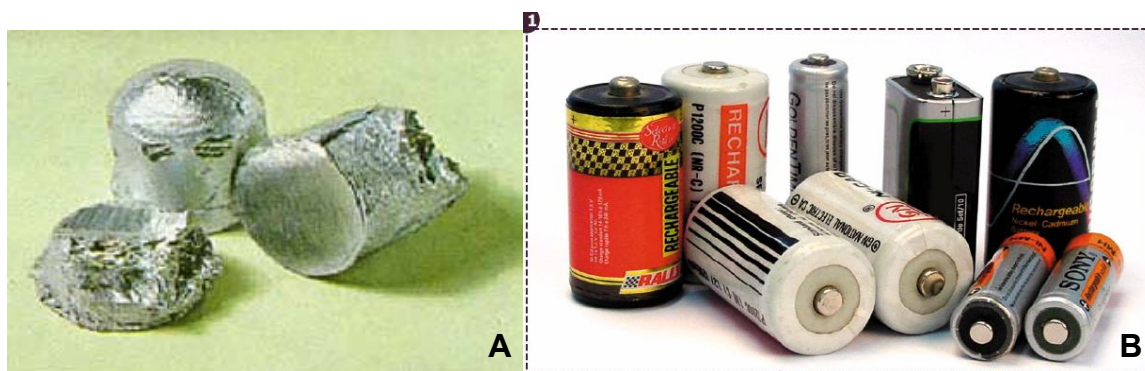


Figura 4. Cádmio. A – Ilustração do cádmio sólido à temperatura ambiente. B – Utilização do Cd para a produção de baterias níquel-cádmio.

Sabe-se que o cádmio possui efeitos carcinogênicos, causando câncer de pulmão, faringe, rins e próstata em humanos (CULLINANE *et al.*, 2009). Nos fumantes pode contribuir para a redução de fertilidade, visto que o Cd está associado com a perda das junções intercelulares que são essenciais para o movimento normal do ovócito no trato genital feminino e para o desenvolvimento do blastocisto (CULLINANE *et al.*, 2009).

O Cd é conhecido por causar efeitos adversos em uma ampla variedade de animais como ratos, camundongos, *hamsters*, sapos, peixes e galinhas, afetando diferentes tipos de tecidos.

Vários estudos reportam os efeitos do Cd em embriões de galinhas. Sua exposição pode causar defeitos faciais, oculares e auditivos, anormalidades dos membros, defeitos na parede do corpo, tubo neural, anomalias no coração, pulmão e rins, atraso no desenvolvimento e morte (THOMPSON *et al.*, 2005). Em um estudo com embriões de galinha expostos ao Cd com 60 h de incubação (estágios 16-17 HH) foi identificado o crescimento anormal da mesoderme lateral, na direção dorsal resultando no desenvolvimento defeituoso da parede ventral do corpo com características similares às anormalidades humanas como a onfalocele (THOMPSON e BANNIGAN, 2007). As primeiras mudanças histológicas detectáveis nos embriões afetados foram a desagregação de células peridérmicas após 4 h de exposição seguida de apoptose na mesoderme dos somitos (THOMPSON *et al.*, 2008). Outros estudos relatam o rompimento de junções celulares e mudanças no formato de células em vários tecidos como

endotélio (GABBIANI *et al.*, 1974; QUALIFE *et al.*; 1984; SCHLAEPFER, 1971), células epiteliais renais (PROZIALECK e NIEWENHUIS, 1991; NIEWENHUIS *et al.*, 1997), epitélio córneo (WEIDNER e SILLMAN, 1997) e epitélio intestinal (DUIZER *et al.*, 1999).

1.4 Biomarcadores

O uso de biomarcadores permite avaliar a saúde dos organismos e, indiretamente, permite inferir o grau de contaminação em que o ambiente se encontra. Os biomarcadores podem pertencer a diferentes níveis de organização biológica, indicando a exposição ou o efeito de compostos em organismos (AMARAL *et al.*, 2006). Vários trabalhos utilizando análises histopatológicas de embriões de galinha expostos ao cádmio estão disponíveis na literatura (THOMPSON *et al.*, 2008; CULLINANE *et al.*, 2009; THOMPSON *et al.*, 2005; THOMPSON e BANNIGAN, 2007), porém não foi encontrado nenhum trabalho publicado utilizando a atividade de enzimas antioxidantes como biomarcadores. De acordo com Halliwell (2000): “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”.

No organismo, as espécies reativas de oxigênio (EROs) encontram-se envolvidas na imunidade inata, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biologicamente ativas (BARREIROS *et al.*, 2006). No entanto, o excesso de EROs resulta em efeitos prejudiciais, tais como os danos às biomoléculas como lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA (HUSAIN *et al.*, 1987).

Dentre as EROs, o radical HO• é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo* (BARREIROS *et al.*, 2006). O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por ex., a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical HO• em seu interior.

O metabolismo envolve dois tipos de reações bioquímicas, conhecidas como reações de fase I e reações de fase II. As reações de fase I são catabólicas (oxidação, redução, hidrólise) e os produtos frequentemente são quimicamente

mais reativos e, portanto, paradoxalmente, algumas vezes mais tóxicos que a substância original. As reações de fase II são anabólicas e envolvem conjugação, que habitualmente resultam em produtos inativos, embora haja exceções (RANG *et al.* 2004).

A enzima glutationa S-transferase (GST) pertence à fase II do metabolismo sendo responsável pela conjugação de componentes eletrofílicos ou oriundos da fase I com a glutationa reduzida (GSH). A atividade desta enzima pode ser indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que ela utiliza como co-fator o GSH e este também participa na degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através da atuação da enzima Glutaciona peroxidase (GPx).

A glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) é a primeira enzima limitante para a via pentose fosfato. Ela participa na geração de NADPH e ribose-5-fosfato sendo importante na biossíntese redutiva de várias moléculas importantes, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que são cruciais para o crescimento celular (KAN *et al.*, 1988; SLENZKA *et al.*, 1995; GOMEZ-MILAN e LOZANO, 2007). A G6PDH também faz parte do sistema de defesa antioxidante em virtude de sua capacidade em gerar poder redutor da forma do NADPH (URSINI *et al.*, 1997; SALVEMINI *et al.*, 1999; ZIRONG e SHIJUN, 2007).

Embora o cádmio já tenha sido utilizado para o estudo morfológico de efeitos teratogênicos em embriões de ave, ainda se faz necessária a padronização de metodologias para a avaliação conjunta dos seus efeitos sob o ponto de vista bioquímico e morfológico.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

- Padronizar uma metodologia para avaliação dos efeitos da exposição ao cádmio utilizando como modelo embriões de *Gallus gallus* (galinha).

2.2 *Objetivos específicos*

- Testar a eficiência de um método de exposição de embriões de galinha a um agente tóxico;
- Expor embriões de galinha ao cádmio nas concentrações de 5 e 50 μM durante 48 e 72 h (estádios embrionários 12-13 e 19-20);
- Avaliar os efeitos da exposição através do estudo morfológico e da verificação da atividade das enzimas antioxidantes GST e G6PDH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

- Obtenção dos embriões:

Ovos fertilizados de *Gallus gallus* foram fornecidos pela Empresa Da Granja Agroindustrial Ltda.

Após higienização, os ovos foram analisados através do ovoscópio para verificação da viabilidade e presença de rachaduras na sua casca.

- Determinação do local da contaminação:

Inicialmente alguns ovos foram injetados com 200 μ L do corante vital Azul de Tripán na câmara de ar (Figura 5) e outros no albúmen, para confirmação do melhor local para uma rápida dispersão do contaminante sobre o embrião. Os embriões foram incubados por 48 horas e os ovos abertos para verificar a dispersão do corante.

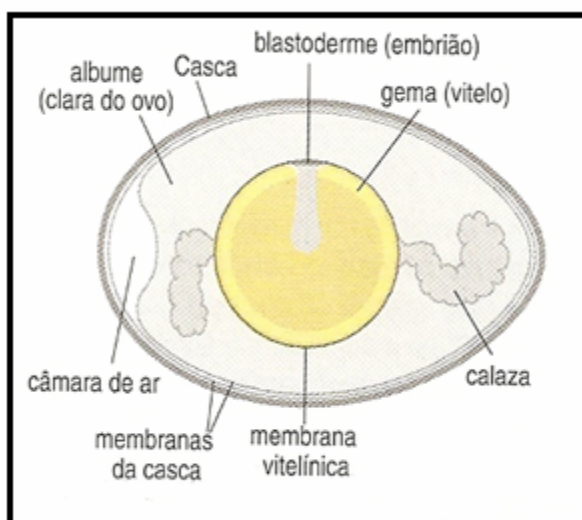


Figura 5. Estrutura de um ovo fertilizado de galinha no momento da postura.
Fonte: Biologia do Desenvolvimento (WOLPERT *et al.*, 2000)

- Grupo experimental:

Como os ovos injetados na câmara de ar mostraram melhor resultado, foram injetados neste local 200 μ L de solução de cloreto de cádmio (CdCl_2) em duas concentrações diferentes (5 e 50 μM). Os ovos contendo os indivíduos

controles foram injetados com 200 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para a administração da dose foi utilizada uma agulha grossa para perfurar a casca do ovo (Figura 6 A) e assim facilitar a posterior entrada da agulha de insulina, que é mais fina (Figura 6 B). Após a injeção do contaminante e remoção da agulha, o orifício nos ovos foi selado com fita adesiva e os ovos incubados (temperatura de 38° C, umidade relativa de 65 a 75%) por 48 e 72 h, até atingirem os estádios embrionários 12-13 e 19-20 (HH), respectivamente.

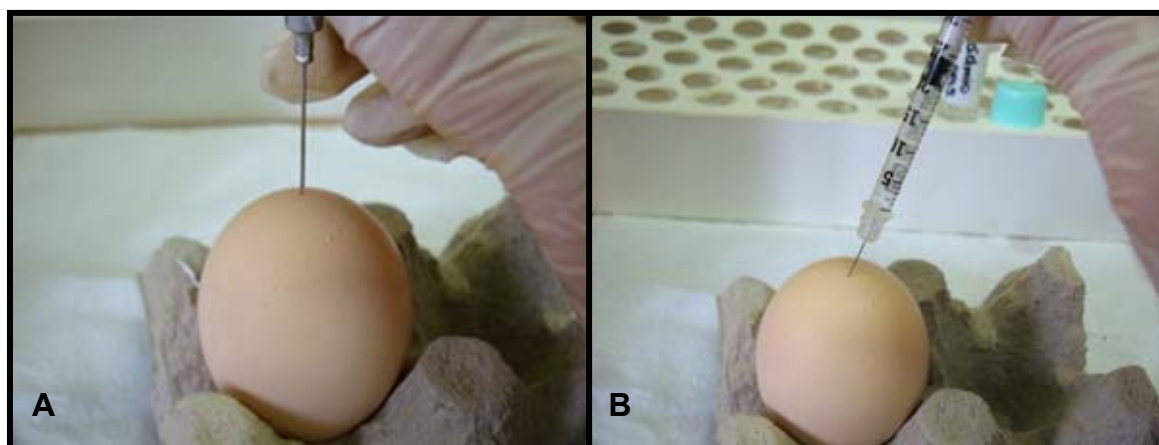


Figura 6. Exposição dos ovos ao cloreto de cádmio. A – Ovo sendo perfurado com agulha grossa na câmara de ar. B – Contaminante sendo injetado com a utilização de uma agulha de insulina.

Um total de 510 ovos foi utilizado no estudo (Tabela 1). Deste total 233 ovos foram coletados com 48 h de incubação e 263 com 72 h de incubação. Quatorze ovos foram incubados sem furar e injetar, servindo como controle de técnica, indicando se a simples injeção pode causar alterações nos embriões.

TABELA 1 – Quantidade de ovos utilizados para o experimento.

	48 h	72 h	Sem injetar	TOTAL
CONTROLE	84	89		
5μM de Cd	62	103		
50μM de Cd	87	71		
TOTAL	233	263	14	510

3.2 Análise Morfológica

3.2.1 Coleta dos embriões e Montagem total

Quarenta e oito e setenta e duas horas após a exposição, os ovos foram abertos (Figura 7 A) e os discos embrionários recortados com o auxílio de tesoura e pinça. A seguir, foram transportados para uma placa de Petri contendo PBS, (Figura 7 B). Para remoção do excesso de vitelo os embriões foram lavados em PBS. Um papel filtro retangular com uma janela em losango na região central foi encaixado sobre o embrião para mantê-lo distendido e submerso na solução fixadora (Figura 7 C). Em seguida, os embriões foram fixados em solução fixadora Carnoy, por 2 h a temperatura ambiente em uma placa de Petri tampada (Figura 7 D). Após foram lavados em água destilada e colocados em etanol 70%, onde permaneciam alguns dias. Para a coloração, os embriões foram hidratados em água destilada por 10 minutos e colocados no corante Carmalúmen de Mayer por 48 h aproximadamente, ou até ficarem vermelhos. Após a coloração, foram desidratados em série alcoólica crescente (etanol a 70, 80, 95, 100% I e 100% II; 10 min em cada banho) e, em seguida, diafanizados em dois banhos consecutivos de xilol (xilol) por 10 min cada. Para a montagem das lâminas permanentes foi utilizada a resina Permout®. Após a confecção das lâminas permanentes, a análise foi realizada sob microscópio de campo claro.

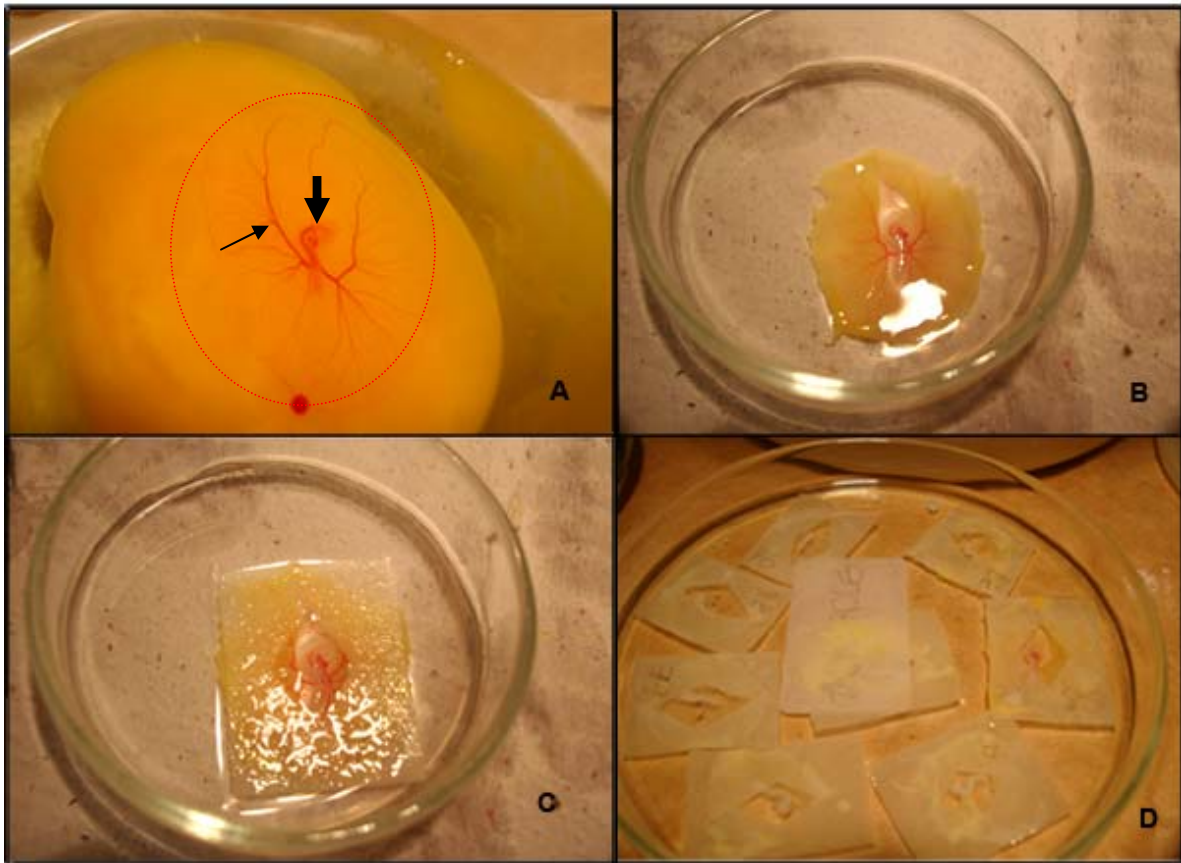


Figura 7. Coleta dos embriões. A – Embrião (seta maior) aderido ao saco vitelínico, onde observa-se sua vascularização extra–embrionária (seta menor) e o disco embrionário (tracejado). B – Transferência do disco embrionário para recipiente contendo PBS. C – Disco embrionário coberto com papel filtro. D – Embriões sendo fixados em solução de Carnoy.

3.2.2 Determinação do estágio embrionário

O estágio de desenvolvimento embrionário foi determinado de acordo com o número de somitos (Tabela 2) e com as características descritas em cada estágio (Tabela 3) segundo Hamburger-Hamilton (1951, reeditado em 1992).

TABELA 2 – Estádio de desenvolvimento embrionário de acordo com a contagem de somitos (HAMBURGER e HAMILTON, 1992).

Tempo de incubação	Estádio embrionário	Somitos
29 a 33 h	9	7
33 a 38 h	10	10
40 a 45 h	11	13
45 a 49 h	12	16
48 a 52 h	13	19
50 a 53 h	14	22
50 a 55 h	15	24-27
51 a 56 h	16	26-28
52 a 64 h	17	29-32
65 a 69 h	18	30-36
68 a 72 h	19	37-40
70 a 72 h	20	40-43

TABELA 3 – Características presentes nos embriões de galinha de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário.

Estádio embrionário	Características
9	<ul style="list-style-type: none"> • Primórdios do coração começam a se fundir. Neuróporo anterior aberto (Figura 8).
10	<ul style="list-style-type: none"> • O primeiro par de somitos torna-se disperso (não entra na contagem). Primeira indicação de flexão cranial (Figura 8).
11	<ul style="list-style-type: none"> • Leve flexura cranial. Neuróporo anterior está fechando. Vesículas ópticas estão comprimidas na base. Coração se inclina para a direita permitindo sua visualização (Figura 8).
12	<ul style="list-style-type: none"> • Neuróporo anterior está fechado. Destaque do telencéfalo. Vesículas ópticas primárias e pedúnculo óptico bem definidos. Fenda auditiva está aberta. Coração possui formato levemente em S. Prega facial do âmnion cobre toda a região do

	<p>prosencefalo (Figura 8).</p>
13	<ul style="list-style-type: none"> • A cabeça está parcialmente voltada para a direita. Flexuras craniais e cervicais se inclinam amplamente. Ampliação diferenciada do telencefalo. Leve estreitamento da abertura da fenda auditiva. Canal átrio-ventricular é observado por constrição. Prega facial do âmnion cobre o prosencefalo, mesencefalo e a parte do metencefalo (Figura 9).
14	<ul style="list-style-type: none"> • Flexuras e rotações: Flexura cranial – eixos do prosencefalo (telencefalo + diencefalo) e romboencefalo (metencefalo + mielencefalo) formam um ângulo quase reto. Flexura cervical se inclina completamente. Rotação do corpo até os somitos 7-9. • Arcos branquiais: 1 e 2, e fendas 1 e 2 são distintas. • Vesícula óptica primária começa a invaginar. Abertura da fenda auditiva é contraída. • Âmnion se estende até os somitos 7-10 (Figura 9).
15	<ul style="list-style-type: none"> • Prega lateral do corpo se estende da região anterior até os somitos 15-17. • Flexuras e rotações: Flexura cranial – eixos do prosencefalo (telencefalo + diencefalo) e romboencefalo (metencefalo + mielencefalo) formam um ângulo agudo. O contorno ventral do prosencefalo e romboencefalo está aproximadamente paralelo. O tronco é nítido. Rotação se estende até os somitos 11-13. • Arcos branquiais: arco visceral 3 e fenda 3 são distintas. • Vesícula óptica está completamente formada. • Âmnion se estende até os somitos 7-14 (Figura 9).
16	<ul style="list-style-type: none"> • Prega lateral do corpo se estende até os somitos 17-20. • Flexuras e rotações: Todas as flexuras são mais acentuadas que o estágio 15. Rotação se estende até os somitos 14-15. • Broto da cauda curto em cone ereto. • Âmnion se estende até os somitos 10-18 (Figura 9).
17	<ul style="list-style-type: none"> • Prega lateral do corpo se estende ao redor de toda a circunferência do corpo. • Brotos dos membros: Ambos os brotos das asas e das pernas

	<p>se elevam da blastoderme pelo dobramento das pregas do corpo. Ambos representam dilatações distintas com tamanhos aproximadamente iguais.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Flexuras e rotações: Não há mudança na flexura cranial. Flexura cervical apresenta-se mais inclinada que nos estádios anteriores. Rotação se estende até os somitos 17-18. • Pregas da cauda se inclinam ventralmente • Âmnion consideravelmente variável, podendo cobrir parte da cauda (Figura 10).
18	<ul style="list-style-type: none"> • Broto da cauda é ampliado: brotos da perna se tornam levemente maiores que os brotos das asas. • Flexuras e rotações: Na flexura cervical, o eixo da medula forma um ângulo aproximadamente reto com o eixo do tronco posterior. A rotação se estende para a parte posterior do corpo • O broto da cauda se inclina para a direita. • Âmnion geralmente fechado, ocasionalmente uma cavidade oval na região lombar (Figura 10).
19	<ul style="list-style-type: none"> • Brotos dos membros: ampliados e simétricos. Brotos da perna são levemente maiores e volumosos que os brotos das asas. • Flexuras e rotações: Na flexura cervical, o eixo da medula forma um ângulo agudo com o eixo do tronco. A flexura do tronco praticamente ou inteiramente desaparece devido à rotação do corpo inteiro. • Broto da cauda curvado, sua extremidade aponta para frente. • Alantóide: Uma pequena bolsa de tamanho variável; ainda não vesicular. • Olhos não pigmentados (Figura 10).
20	<ul style="list-style-type: none"> • Flexuras e rotações: Flexura cervical mais acentuada que no estádio 19. A dobra da região caudal começa a se estender em direção à região lombo-sacral. Rotação completada. • Alantóide: Vesicular, tamanho variável. • Olho pigmentado, coloração acinzentada clara (Figura 10).

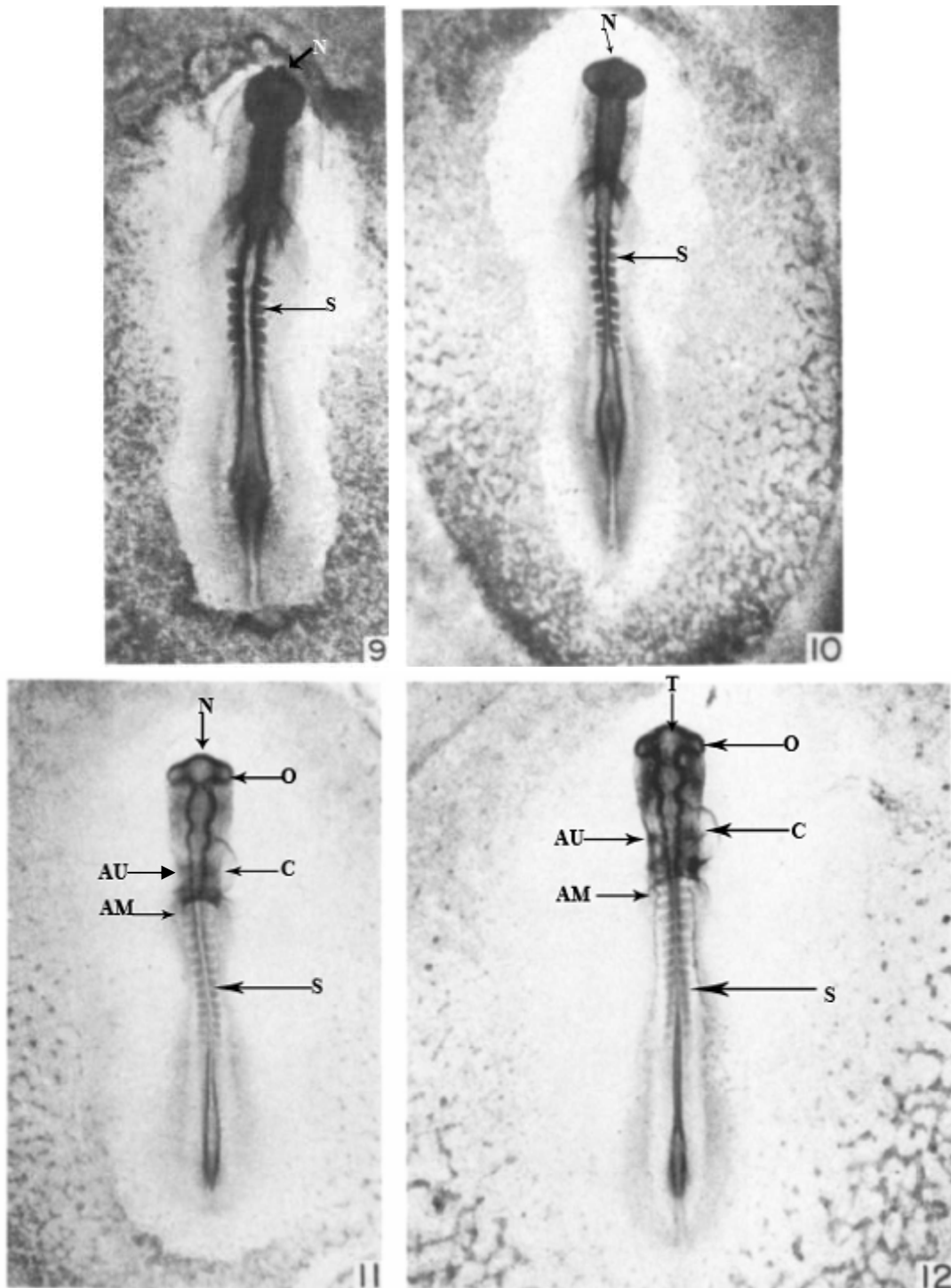


Figura 8. Embriões nos estádios embrionários 9, 10, 11 e 12.

AM = Âmnion; AU = Vesículas auditivas; C = Coração; N = Neuróporo anterior; O = Vesícula óptica; S = Somitos; T = Telencéfalo. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951).

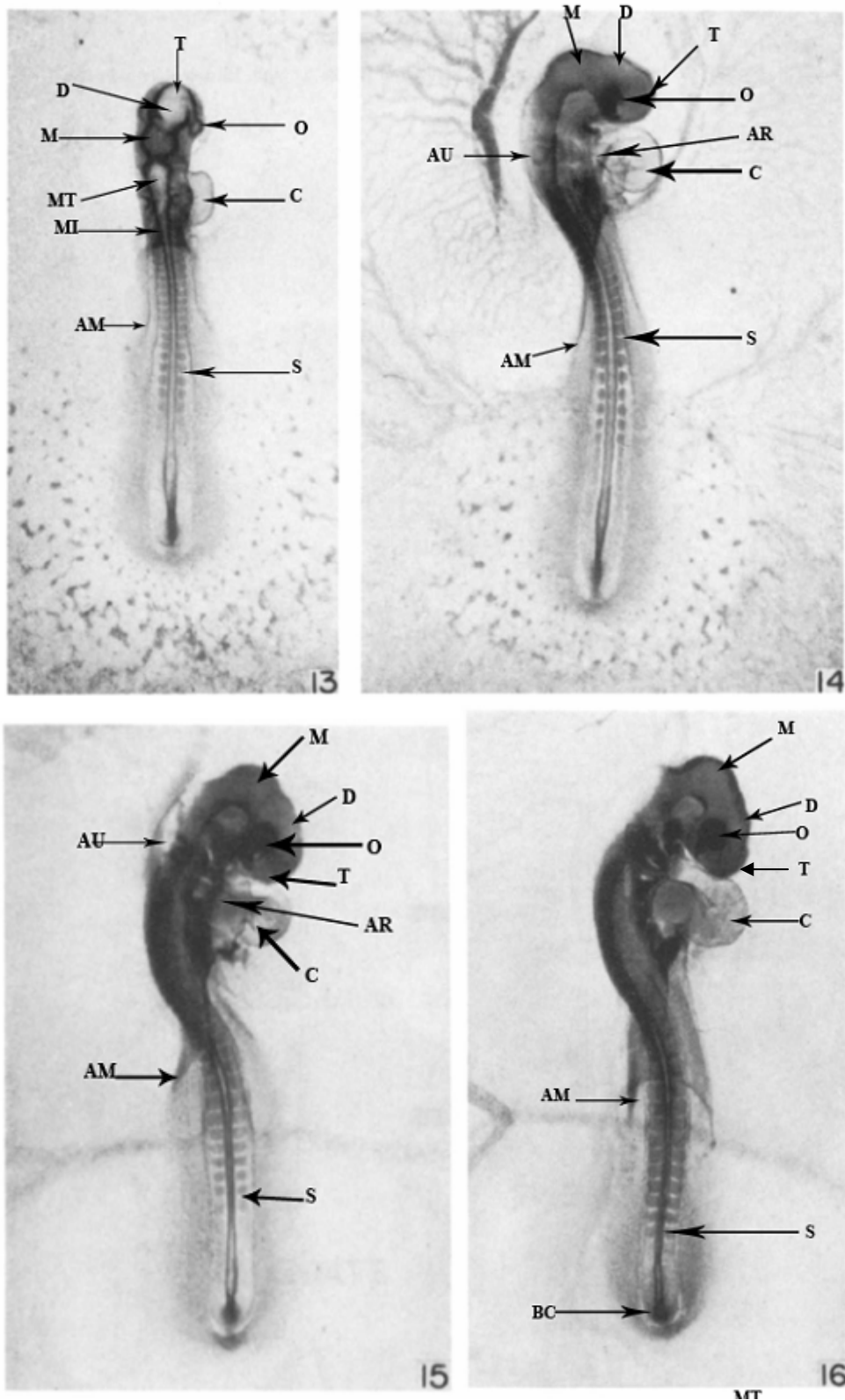


Figura 9. Embrões nos estádios embrionários 13, 14, 15 e 16.

AM = Âmnion; AR = Arcos branquiais; AU = Vesículas auditivas; BC = Broto da cauda; C = Coração; D = Diencefalo; M = Mesencéfalo; MI = Mielencéfalo; MT = Metencéfalo; O = Vesícula óptica; S = Somitos; T = Telencéfalo. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951).

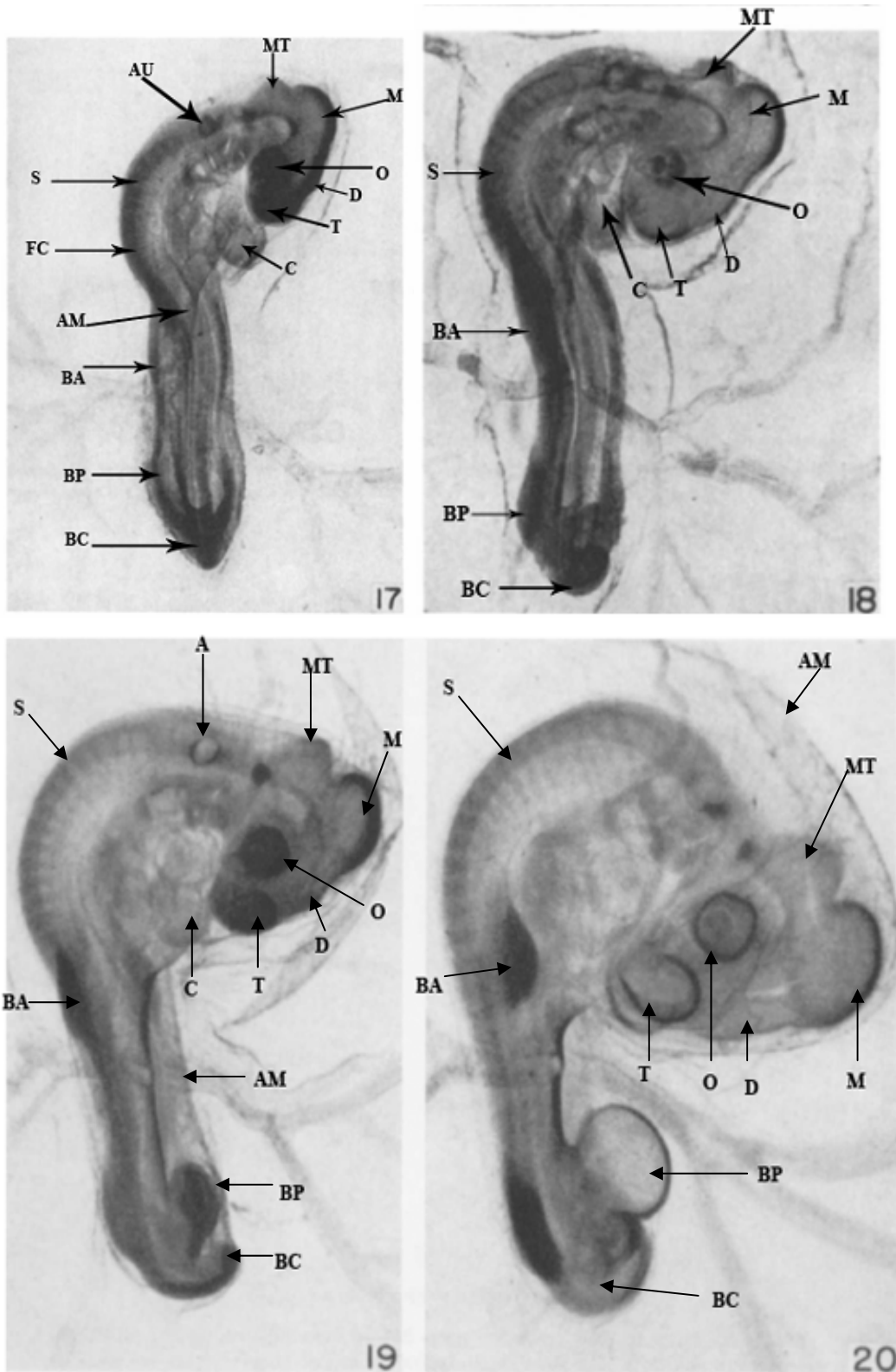


Figura 10. Embrões nos estádios embrionários 17, 18, 19 e 20.

AM = Âmnion; AR = Arcos branquiais; AU = Vesículas auditivas; BA = Broto da asa; BC = Broto da cauda; BP = Broto da perna C = Coração; D = Diencefalo; FC = Flexura cervical; M = Mesencéfalo; MT = Metencéfalo; N = Neuróporo anterior; O = Vesícula óptica; R = Romboencéfalo; S = Somitos; T = Telencéfalo. Fonte: Hamburger e Hamilton (1951).

3.3 Análises bioquímicas

Os embriões coletados foram lavados em PBS e armazenados a -80 °C até as análises. Para as análises enzimáticas, as amostras foram homogeneizadas em 200 µL de PBS gelado e centrifugadas a 12.000 g, por 30 min a 4° C (as amostras foram mantidas no gelo). As amostras foram centrifugadas novamente, caso o sobrenadante não estivesse límpido e cristalino.

3.3.1 Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi mensurada através do aumento da absorbância resultante da formação de um tioéter pelos substratos GSH (molécula endobiótica) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, substrato sintético utilizado para determinar praticamente todas as isoformas de GST já identificadas em mamíferos) (FILIPAK NETO, 2007).

Na microplaca foram adicionados 40 µL de sobrenadante (PBS no caso do branco), seguidos por 110 µl de meio de reação (4 mM de GSH, 2 mM de CDNB, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5; colocado imediatamente antes da leitura). Duas réplicas de cada amostra foram lidas espectrofotometricamente a 340 nm, em intervalos de 1 min durante 5 min.

3.3.2 Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

O método baseia-se no aumento de absorbância provocada pela redução do NADP⁺ a NADPH pela G6PDH. Para a preparação do meio de reação foram utilizados tampão Tris-HCl 0,1 M MgCl₂ 10 mM, pH 8,0, NADP⁺ a 1,0 mM e Glicose-6-fosfato a 2,0 mM. Na microplaca foram adicionados 30 µl de amostra (PBS no caso do branco), seguidos de 120 µl do meio de reação (0,1 M de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, pH 8,0; 1,0 mM de NADP⁺ e 2,0 mM de Glicose-6-fosfato) e procedeu-se a leitura a 340 nm em espectrofotômetro de microplaca, no tempo 0 (zero) e após 30 min de reação.

3.3.3 Quantificação de proteínas totais

Para normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos, a concentração de proteínas foi determinada (BRADFORD, 1976).

Na microplaca foi adicionado 5 μ l do sobrenadante de cada amostra seguidos de 250 μ l do reativo de *Bradford*[®] (*Coomassie brilliant blue*) e para o branco foi adicionado PBS. Duas réplicas de cada amostra foram empregadas e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm.

4 RESULTADOS

4.1 Metodologia empregada

Observou-se que os ovos injetados com o corante na câmara de ar demonstraram melhor dispersão do corante sobre o embrião que àqueles injetados na clara do ovo. Portanto, todos os ovos foram injetados com o contaminante na câmara de ar (Figura 11).

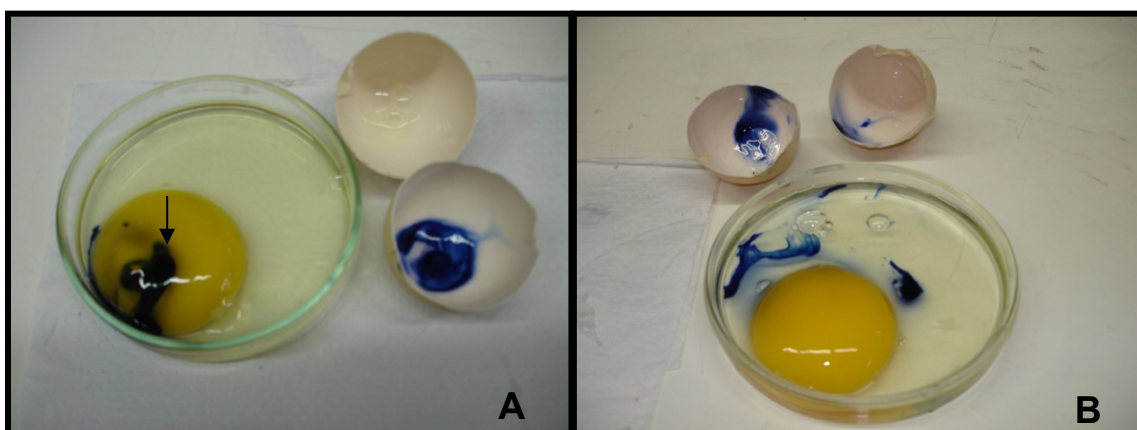


Figura 11. Ovo injetado com corante vital Azul de Tripan. A – Na câmara de ar, onde o corante se depositou sobre o disco embrionário (seta). B – Na clara do ovo.

Não houve diferença significativa entre as taxas de sobrevivência e mortalidade entre os grupos expostos ao Cd (5 μ M de Cd e 50 μ M de Cd) e o grupo controle em ambos os tempos de incubação (48 e 72 h, Tabela 4 e 5), ou entre os dois períodos de exposição quando comparados dentro de uma situação de exposição ou não exposição. Porém, observou-se que houve um aumento na taxa de falha no desenvolvimento para os embriões de 72 h (21%) expostos à 50 μ M de Cd em relação aos expostos a mesma concentração de Cd durante 48h (7%), enquanto que para os outros grupos não houve diferença significativa.

A quantidade de embriões que foram rasgados foi significativamente grande, sendo ainda maior nos indivíduos com 48 h de incubação (27%), devido ao seu pequeno tamanho e maior fragilidade. Para calcular as porcentagens de sobrevivência, mortalidade e não desenvolvimento foi descontado o número de embriões que foram rasgados do total de indivíduos utilizados para cada grupo.

TABELA 4 – Quantidade de embriões com 48 h de incubação que sobreviveram, morreram, não desenvolveram ou rasgaram.

48 h	CONTROLE	5 μM de Cd	50 μM de Cd	
Vivo	40 (69%)	30 (68%)	48 (70%)	
Morto	11 (19%)	9 (20%)	15 (22%)	
Não desenvolveu	7 (12%)	5 (11%)	5 (7%)	
Rasgou	26 (31%)	18 (29%)	19 (22%)	63 (27%)
TOTAL	84 (100%)	62 (100%)	87 (100%)	233 (100%)
Total sem rasgar	58 (69%)	44 (71%)	68 (78%)	170 (73%)

TABELA 5 – Quantidade de embriões com 72 h de incubação que sobreviveram, morreram, não desenvolveram ou rasgaram.

72 h	CONTROLE	5 μM de Cd	50 μM de Cd	Sem injetar	
Vivo	57 (70%)	53 (63%)	36 (59%)	7 (58%)	
Morto	13 (16%)	21 (25%)	12 (20%)	5 (41%)	
Não desenvolveu	12 (14%)	10 (12%)	13 (21%)	-----	
Rasgou	7 (8%)	19 (18%)	11 (15%)	2 (14%)	39 (14%)
TOTAL	89	103	71	14	277
Total sem rasgar	82 (92%)	84 (82%)	60 (85%)	12 (86%)	238 (86%)

Para os embriões incubados por 48 h, foram observados 5 estádios embrionários diferentes. Houve ocorrência de apenas um indivíduo no estágio 9, dois no estágio 14 e três no estágio 13. Predominaram os estádios 11 e 12 com ocorrência de quatorze e vinte e dois indivíduos, respectivamente. Para o grupo controle, verificou-se maior incidência de embriões no estágio 11 e para os grupos expostos predominou o estágio 12 (Tabela 6). Não foram contados somitos que não estivessem inteiramente formados ou separados por fendas da mesoderme adjacente. O primeiro somito não foi contado a partir do estágio 10 do desenvolvimento, quando começava a diminuir.

TABELA 6 – Estádios embrionários dos embriões com 48 h de incubação.

48 h	Estádio 9	Estádio 11	Estádio 12	Estádio 13	Estádio 14	TOTAL
Controle	1 (7%)	7 (54%)	3 (23%)	1 (7%)	1 (7%)	13 (100%)
5 μ M	-----	2 (16%)	8 (66%)	1 (8%)	1 (8%)	12 (100%)
50 μ M	-----	5 (29%)	11 (65%)	1 (6%)	-----	17 (100%)
Total	1 (2%)	14 (33%)	22 (52%)	3 (7%)	2 (5%)	42 (100%)

Nos embriões incubados por 72 h também foram encontrados 5 estádios embrionários diferentes, sendo observado apenas um indivíduo no estágio 13 e quatro no estágio 16. Houve a ocorrência de dez indivíduos no estágio 15 e onze no estágio 17, predominando o estágio 18 com vinte e dois embriões. Para todos os grupos verificou-se maior incidência de embriões no estágio 18 (Tabela 7).

TABELA 7 – Estádios embrionários dos embriões com 72 h de incubação.

72 h	Estádio 13	Estádio 15	Estádio 16	Estádio 17	Estádio 18	TOTAL
Controle	-----	3 (17%)	2 (12%)	3 (17%)	9 (53%)	17 (100%)
5mM	1 (5%)	4 (22%)	2 (11%)	4 (22%)	7 (38%)	18 (100%)
50mM	-----	6 (34%)	-----	4 (22%)	8 (44%)	18 (100%)
TOTAL	1 (2%)	13 (24%)	4 (8%)	11 (21%)	24 (45%)	53 (100%)

4.2 Análises morfológicas

Foi analisado um total de 45 embriões incubados por 48 h, sendo 14 controles, 15 expostos a menor dose de Cádmio e 18 da maior dose (Tabela 8).

Verificou-se que 21% (Figura 12) dos indivíduos controles apresentaram alterações, principalmente na formação de vesículas ópticas. Mas a maioria dos indivíduos não apresentou alterações significativas (Figura 14 A – D). Para os embriões expostos à menor dose de Cádmio, 31% dos indivíduos apresentaram alterações e destes quase todos demonstraram alterações na região cefálica e na formação de vesículas ópticas. Observou-se malformação principalmente do telencéfalo (Figura 14 E, F). A maioria dos indivíduos apresentou alterações na região cefálica, enquanto a região posterior se encontrava normal, com exceção

de apenas um indivíduo com malformação do tubo neural posterior sem alterações na região cefálica (Figura 14 G, H). Nos embriões expostos à maior dose de Cádmio, mais de 50% dos indivíduos apresentaram alterações (Figura 12), com predominância de alterações na região cefálica, principalmente na formação do telencéfalo (Figura 15 A – H), embora malformações do diencéfalo e mesencéfalo estivessem presentes em alguns embriões. O coração, vesículas auditivas e ópticas também apresentaram formato anormal (Figura 15 A, B, G, H), sendo que nem chegaram a se desenvolver em alguns embriões.

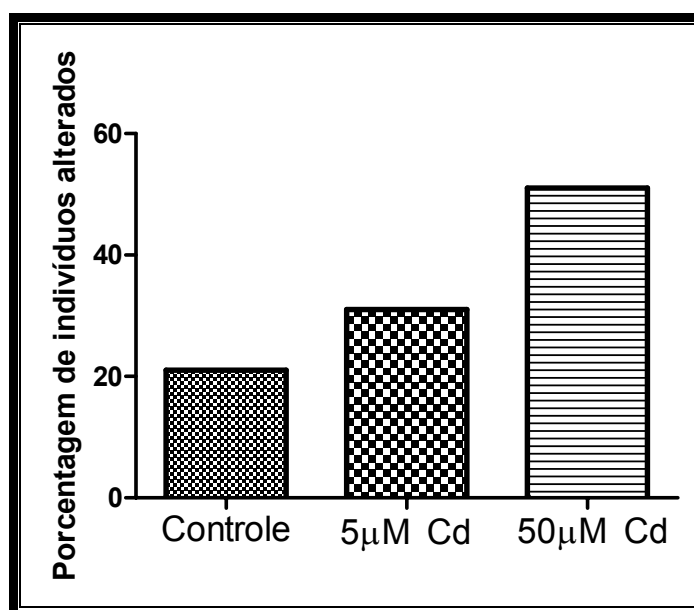


Figura 12. Porcentagem de indivíduos alterados em cada grupo de embriões com 48 h de incubação.

TABELA 8 – Alterações em cada grupo de embriões com 48 h de incubação.

48 h	Controle	5 µM de Cd	50 µM de Cd
Indivíduos analisados	13	12	17
Alterados	3 (21%)	4 (31%)	10 (55%)
Estágios dos alterados	9 (1); 11 (1); 12 (1)	11 (2); 12 (1); 1 não determinado	11 (4); 12 (4); 13 (1); 1 não determinado
Região Cefálica	2 alterados (14%)	3 alterados (25%)	5 muito alterados e 4 alterados (53%)
Coração	2 alterados (14%)	3 alterados (25%)	3 não formaram e 2 alterados (29%)
Fechamento da parede do corpo	1 alterado (7%)	1 alterado (8%)	1 muito alterado (6%)
Notocorda	1 alterado (7%)	1 alterado (8%)	1 alterado (6%)
Tubo neural	1 alterado (7%)	1 alterado (8%)	1 alterado (6%)
Rotação	2 alterados (14%)	2 alterados (16%)	-----
Vesícula	3 alterados (21%)	4 alterados (33%)	1 não formou e 5

óptica/auditiva			alterados (35%)
Neuróporo anterior	2 abertos (14%)	-----	1 aberto (6%)

Para os embriões de 72 h de incubação foram analisados um total de 53 embriões, sendo 17 controles e 18 de cada grupo exposto ao cádmio (Tabela 13).

O grupo exposto à maior dose de Cádmio apresentou maior incidência de alterações, assim como mais intensas, que os outros grupos (23% dos indivíduos, Figura 13). Somente um indivíduo do grupo controle apresentou alterações no coração e no tubo neural; todos os demais embriões encontravam-se normais (Figura 16 A – D). Os embriões expostos à menor dose apresentaram alterações em 17% dos indivíduos, sendo que alguns indivíduos possuíam um formato anormal do diencéfalo, embora as vesículas ópticas tivessem sido formadas (Figura 17 A – D). Todos os embriões alterados expostos a maior dose apresentaram malformações na região cefálica. Alguns indivíduos apresentaram desenvolvimento anormal do tubo neural, além de não formarem as vesículas ópticas e auditivas (Figura 18 A – D).

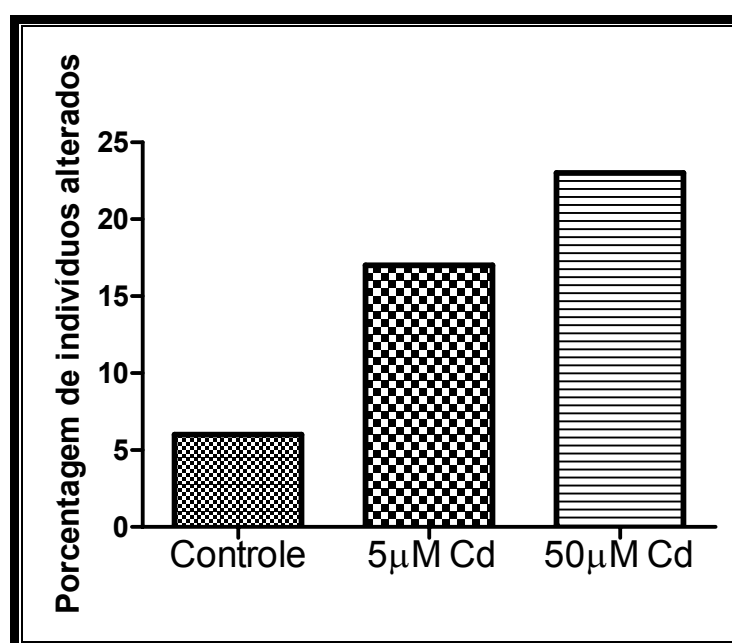


Figura 13. Porcentagem de indivíduos alterados em cada grupo de embriões com 72 h de incubação.

TABELA 9 – Alterações em cada grupo de embriões incubados por 72 h.

72 h	Controle	5 μ M de Cd	50 μ M de Cd
Indivíduos analisados	17	18	18
Alterados	1 (6%)	3 (16%)	4 (22%)
Estágios	18(1)	13 (1); 17(2)	15 (2); 16 (1); 17 (1)
Região Cefálica	-----	3 alterados (16%)	2 muito alterados/ 2 alterados (22%)
Coração	1 alterado (6%)	-----	1 alterado (6%)
Fechamento da parede do corpo	-----	-----	-----
Notocorda	-----	-----	-----
Tubo neural	1 alterado (6%)	1 alterado (6%)	1 não formou (6%)
Rotação	-----	-----	-----
Vesícula óptica/auditiva	-----	2 alterados (11%)	2 não formaram/ 1 alterado (17%)

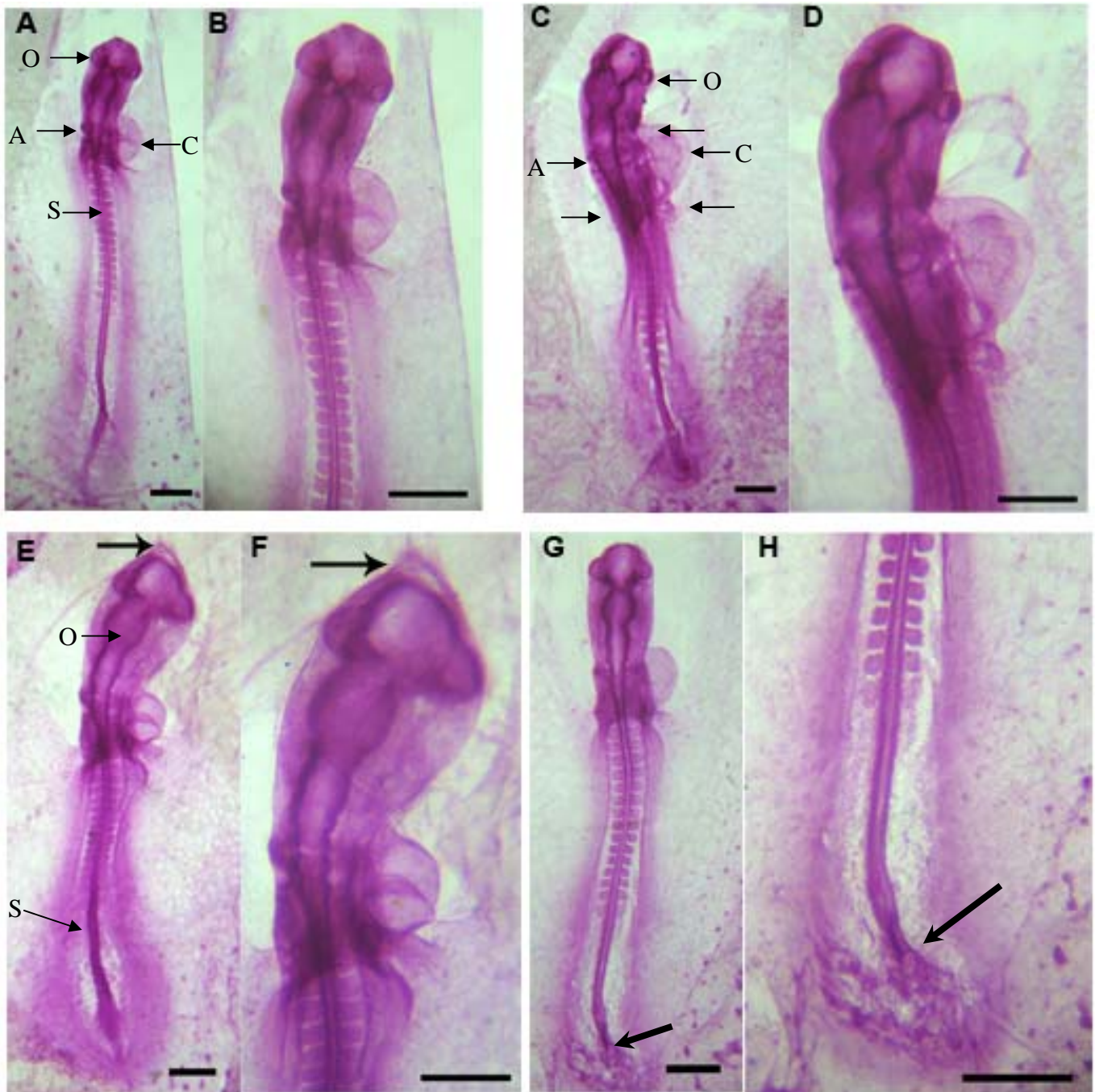


Figura 14. – Embriões controles e expostos a 5 μ M de Cd (48 h). A – Indivíduo controle no estágio 12 de desenvolvimento sem alterações. C – Indivíduo controle no estágio 13 de desenvolvimento sem alterações. E – Indivíduo contaminado com 5 μ M de Cd no estágio 12 de desenvolvimento com alteração no formato da região cefálica (seta maior) e na curvatura do corpo (seta menor). G – Indivíduo contaminado com 5 μ M de Cd no estágio 12 de desenvolvimento normal na região cefálica mas com alteração na formação do tubo neural (seta). B, D, F, H – Aumentos de A, C, e, G, respectivamente. A = Vesículas auditivas; C = Coração; O = Vesículas ópticas; S = Somitos. Barra = 0,5 cm.

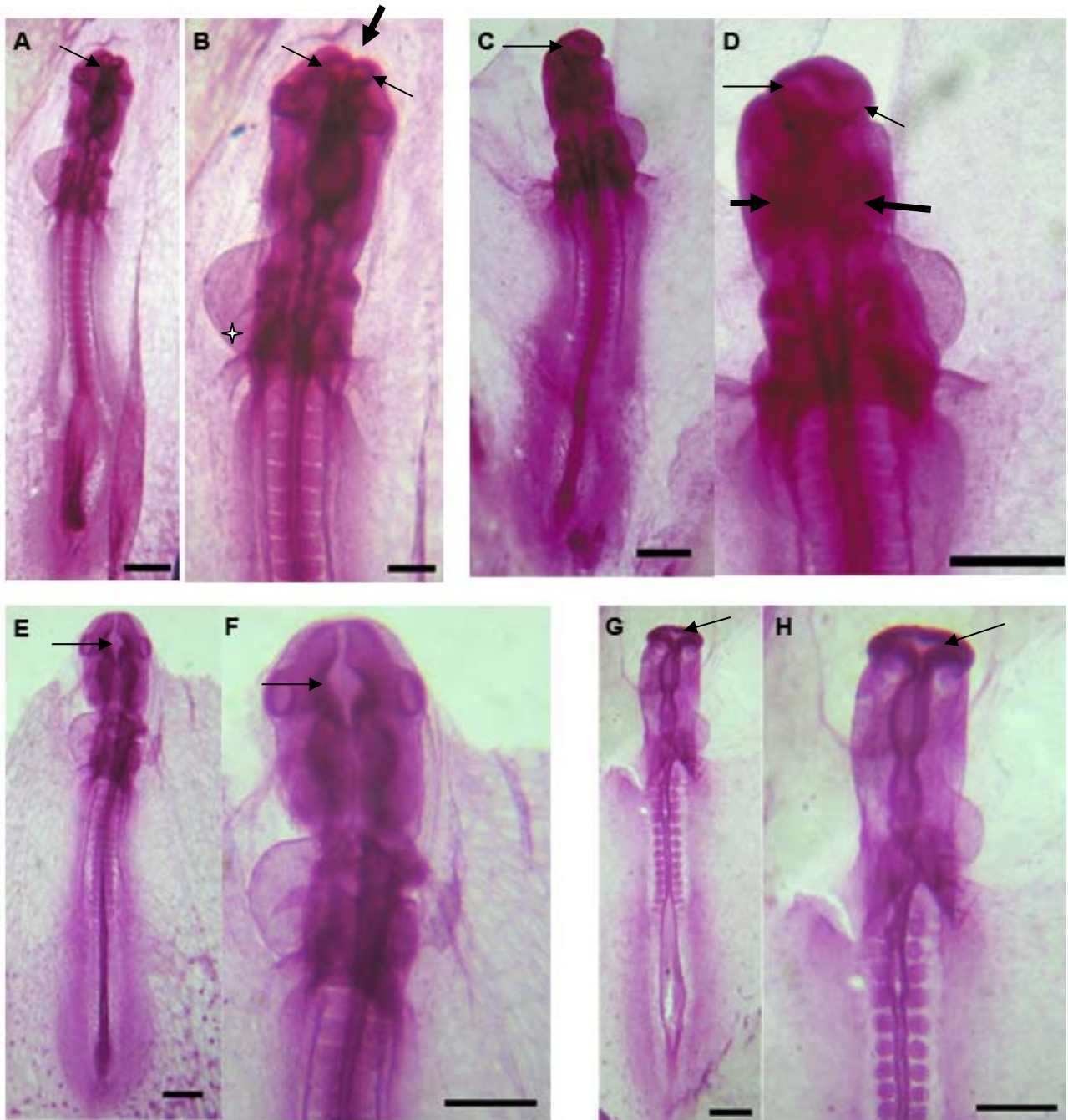


Figura 15. Embriões expostos a 50 μ M de Cd (48 h). A – Indivíduo no estágio 12 de desenvolvimento com alterações na região cefálica (prosencefalo com formato alterado, setas menores), neuróporo anterior aberto (seta maior), vesículas ópticas e coração com formato alterado. C – Indivíduo no estágio 13 de desenvolvimento com alterações na região cefálica (malformação de prosencefalo, setas menores, e mesencefalo, setas maiores), não há formação das vesículas ópticas. E – Embrião no estágio 12 de desenvolvimento com alterações no telencefalo e diencefalo (seta) e (G) alteração na região cefálica (malformação no telencefalo e diencefalo, seta), o tubo neural está aberto (anencefalia). Não há formação das vesículas ópticas e auditivas e o coração apresenta-se atrofiado. B, D, F, H – Aumentos de A, C, E, G, respectivamente. Barra = 0,5 cm.

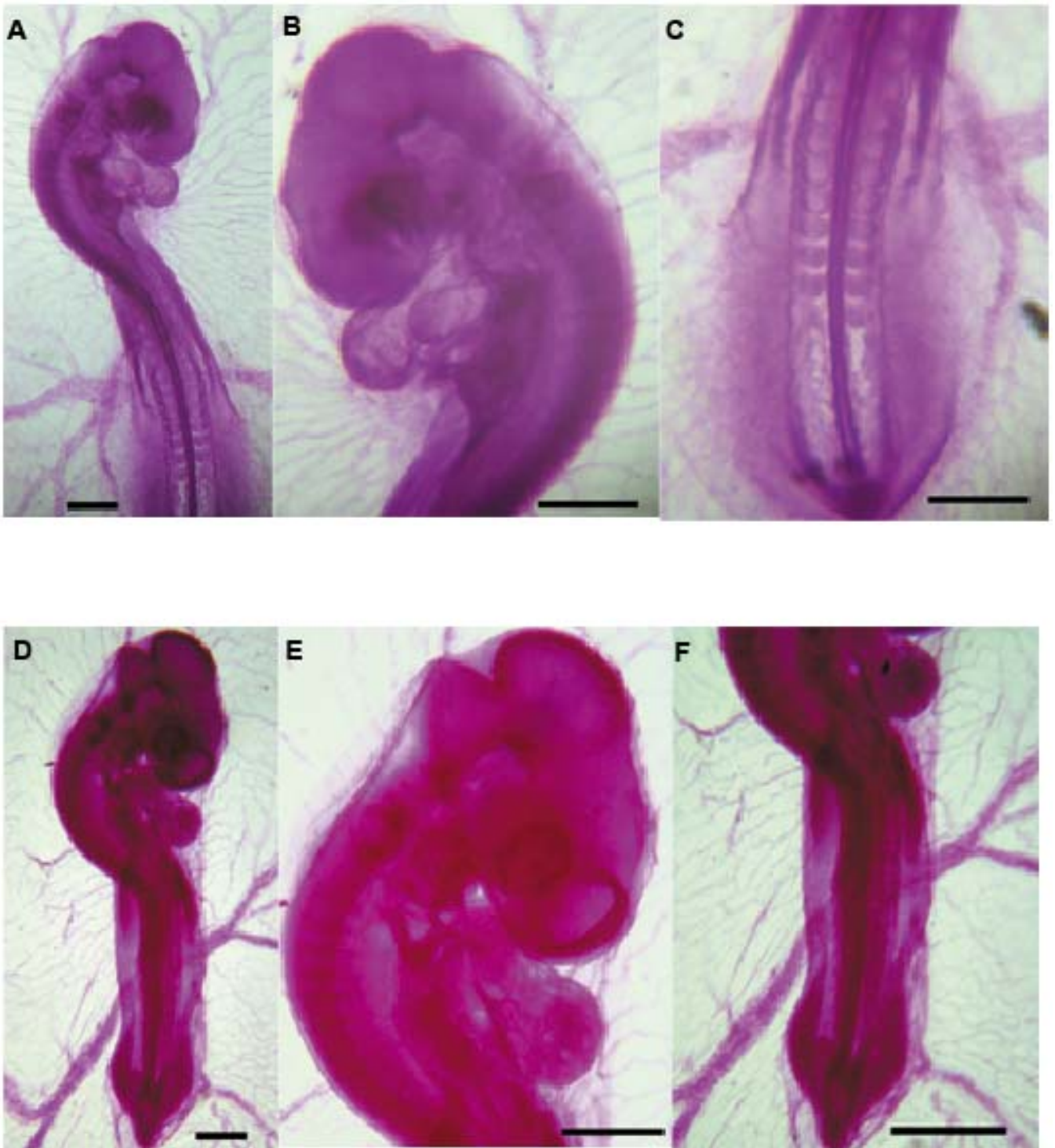


Figura 16. Embriões controle (72 h). A– Indivíduo no estágio 15 de desenvolvimento sem alterações. D – Indivíduo no estágio 18 de desenvolvimento sem alterações. B, C, E, F – Aumentos de A, D respectivamente. Barra = 0,5 cm

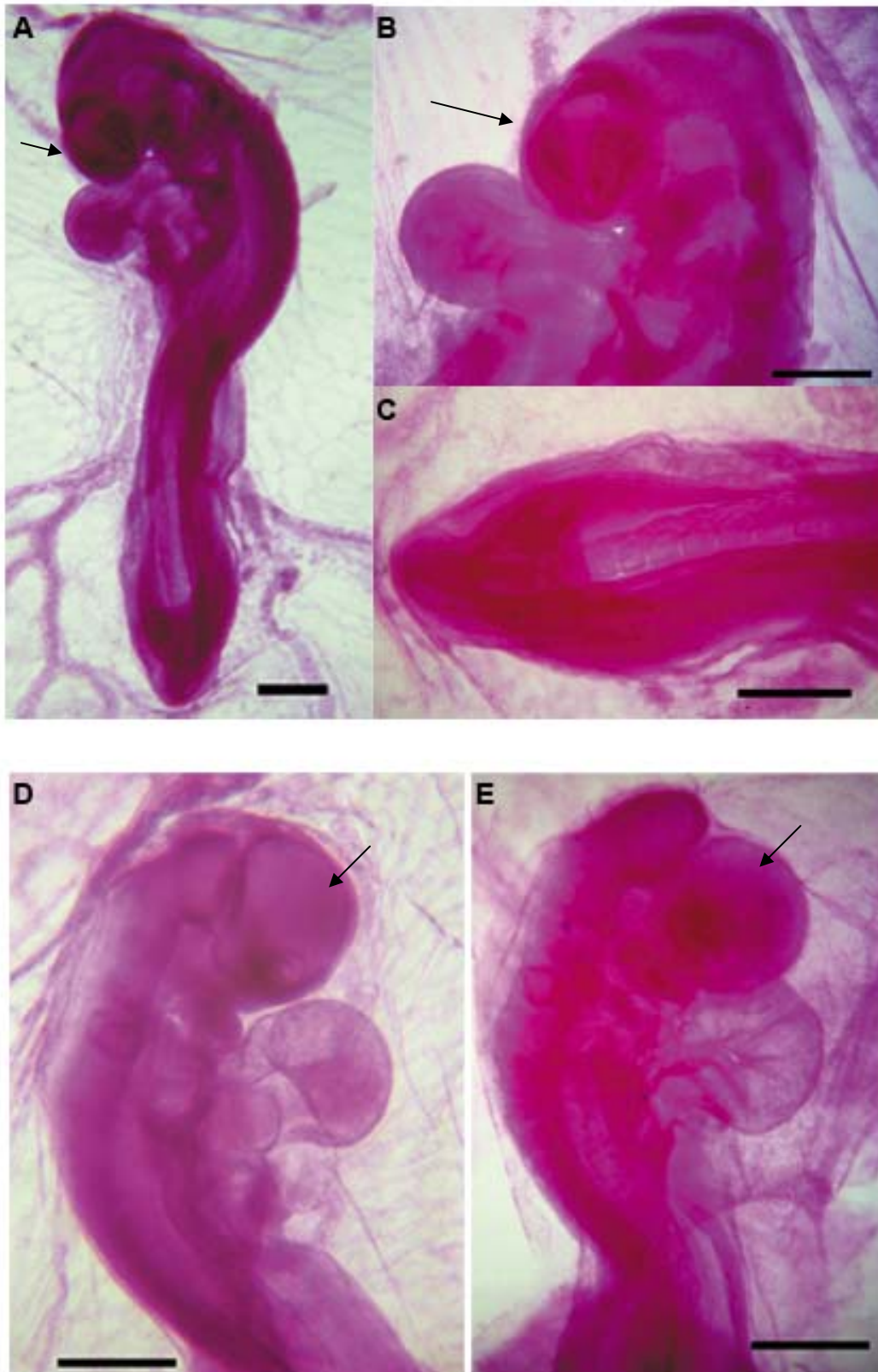


Figura 17. Embriões expostos a $5\mu\text{M}$ de Cd (72 h). A - Indivíduo no estágio 18 de desenvolvimento com alteração no formato região cefálica (seta). D, E – Indivíduos no estágio 18 de desenvolvimento embrionário com alteração no formato da região cefálica (seta). B, C – Aumento de A. Barra = 0,5 cm.

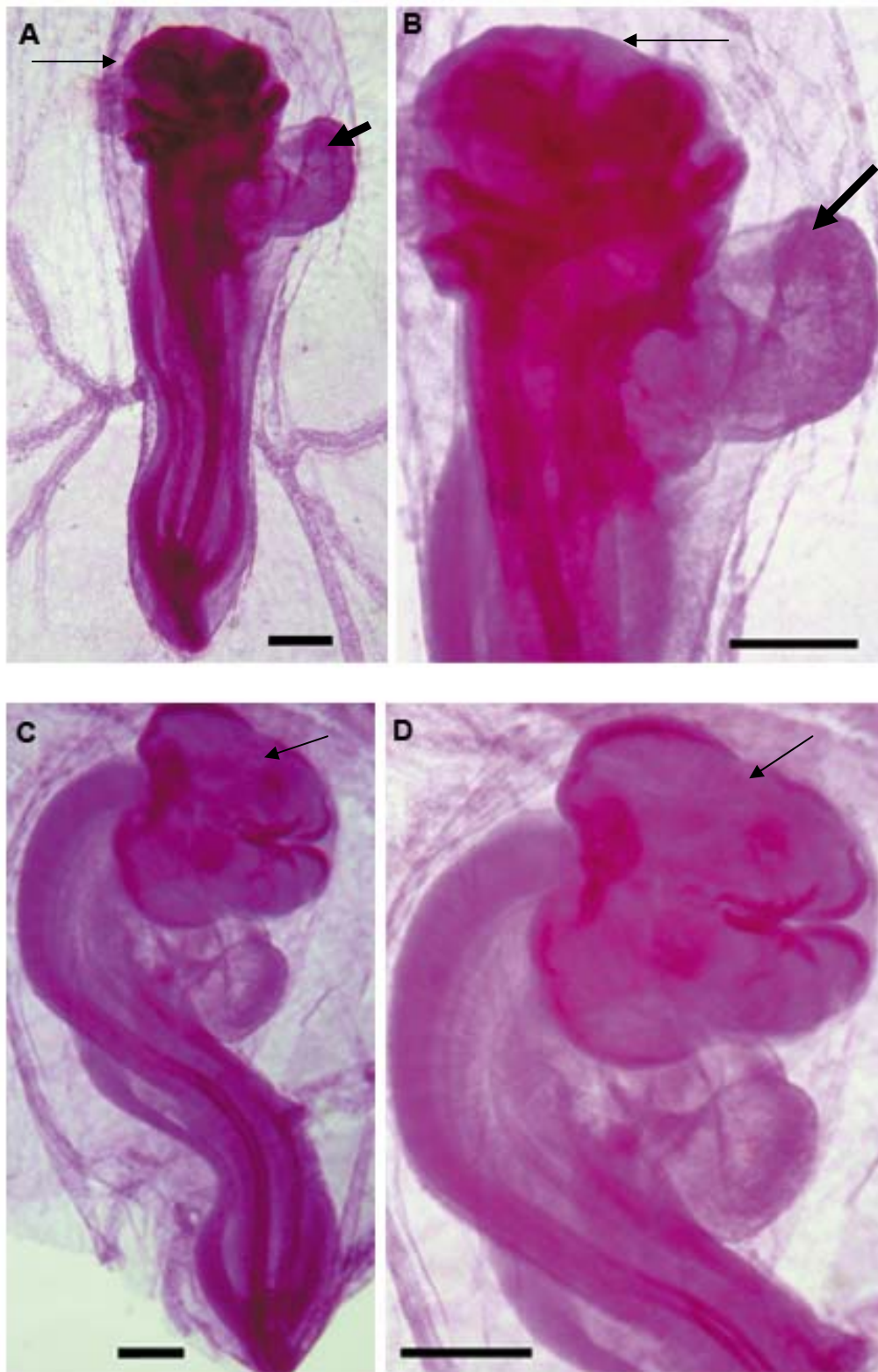


Figura 18. Embriões expostos a 50 μ M de Cd (72 h). A– Indivíduo no estágio 17 de desenvolvimento com alteração no formato da região cefálica (seta menor) e na rotação e sem formação de vesículas ópticas e auditivas. O coração apresenta formato alterado (seta maior) C – Indivíduo no estágio 18 de desenvolvimento com alteração no formato da região cefálica (seta) sem formação de vesículas ópticas e auditivas. B, D – Aumentos de A, C respectivamente. Barra = 0,5 cm.

4.3 Análises bioquímicas

Para a análise da atividade da Glutathiona S-transferase não houve diferença significativa entre os grupos expostos ao Cd e controle tanto para os períodos de exposição de 48 h como de 72 h. Também não se verificou diferença significativa entre os embriões incubados por 48 h e 72 h (48 h *versus* 72 h) dentro de cada situação de injeção (PBS (controle), 5 μ M de Cd e 50 μ M de Cd; Figura 15).

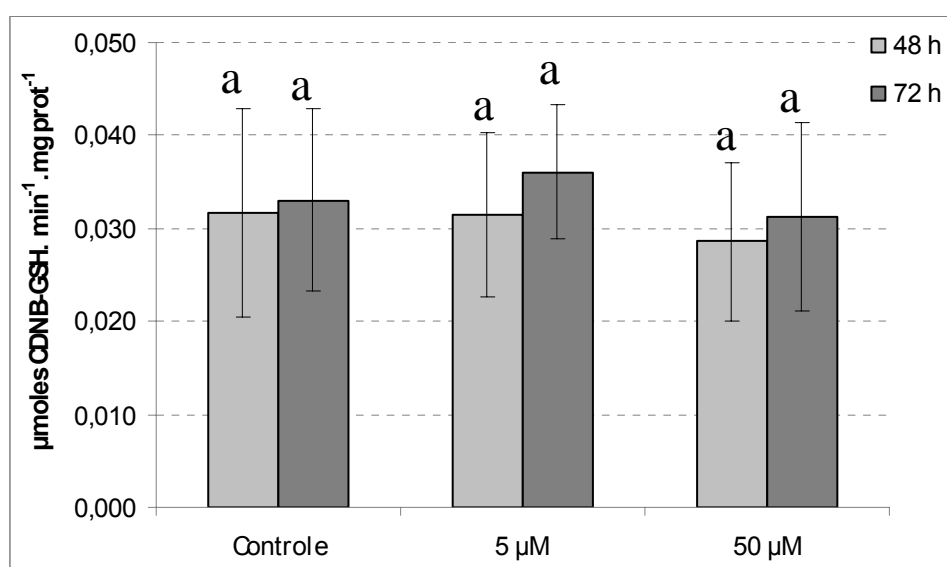


Figura 19. Atividade da Glutathiona S-transferase.

Para a atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase não houve diferença significativa entre os grupos de expostos ao Cd e controle, tanto para os embriões expostos por 48 h como para os de 72 h (Figura 16). Porém, observou-se que todos os embriões expostos por 48 h apresentaram atividade da G6PDH menor em relação aos embriões expostos por 72 h ($p < 0.05$ - Teste t).

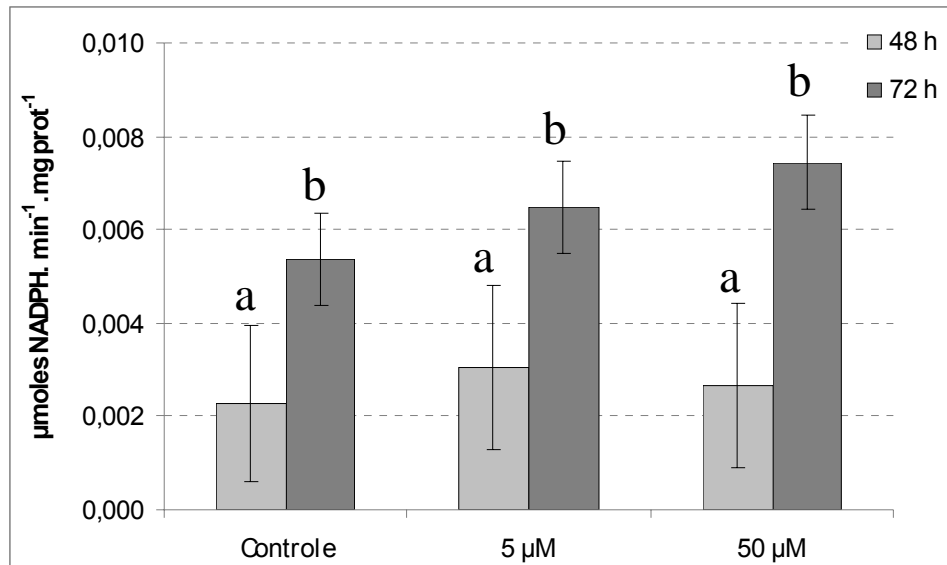


Figura 20. Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase.

5 DISCUSSÃO

A utilização de embriões de galinha como modelo de estudo apresenta vantagens como a facilidade de obtenção, a praticidade em se realizar o monitoramento de alterações durante o desenvolvimento embrionário e o tempo total de desenvolvimento ser curto. Por outro lado, verificou-se que os embriões em estádios mais precoces de desenvolvimento (48 h) são mais frágeis e delicados, o que dificulta a manipulação na coleta, sobretudo durante a abertura da casca do ovo, momento em que o saco vitelínico era, algumas vezes, rompido e o embrião, conseqüentemente, perdido. As taxas de mortalidade e de falha no desenvolvimento foram altas e também contribuíram significativamente para a utilização de um maior número de ovos para o experimento.

Erros são inerentes ao processo de desenvolvimento embrionário (CARLSON, 1996), entretanto a repetição do padrão da malformação, bem como sua representatividade, diferencia o processo normal do patológico (SCHATZ, 2003). Neste trabalho os indivíduos controle apresentaram alterações, assim como uma taxa de mortalidade e falha no desenvolvimento significativas. Porém observou-se que os indivíduos contaminados, principalmente os de maior dose, além de apresentarem mais alterações, estas seguiam um padrão de repetição.

Nos trabalhos que realizaram a exposição ao cádmio em embriões de galinha (THOMPSON *et al.*, 2008; CULLINANE *et al.*, 2009; THOMPSON *et al.*, 2005; THOMPSON e BANNIGAN., 2007), primeiramente havia a incubação dos ovos por 60 h, para então haver a exposição dos ovos ao acetato de cádmio e posterior incubação por diferentes tempos (de horas a dias). No presente trabalho, os ovos foram expostos ao cádmio antes de serem incubados com o objetivo de simular ao máximo uma situação de exposição no ambiente. Em uma situação real, a ave mãe estaria exposta e muitas vezes bioacumularia o contaminante, que seria mobilizado para o vitelo do ovócito ou ovo na época de reprodução, inclusive no caso de contaminantes lipofílicos imobilizados em reservas lipídicas (gordura) da ave. O teste com o corante vital para determinar o melhor local para injeção do contaminante garantiu que o embrião estaria exposto ao Cd, aumentando a confiabilidade do experimento. O corante vital Azul de Tripán foi escolhido por possuir caráter hidrofóbico, onde se dilui com maior facilidade no vitelo demonstrando qual a melhor forma de exposição do embrião.

No trabalho de Cullinane (2009), embriões de galinha expostos a 7,5 μM de Cd após 60 h de incubação tiveram 0% de mortalidade e 12,5 % de anormalidade quando a exposição começava após os estádios 11-13. Quando estavam nos estádios 13-18 houve uma incidência de 10% de mortalidade e 55% de anormalidade. As maiores taxas de anormalidade (achatamento e ampliação dos somitos, torção lordótica na região lombosacral e sinuosidade do tubo neural) foram verificadas quando os embriões alcançavam os estádios 13-18 de H-H. Outros resultados semelhantes foram obtidos com embriões de galinha incubados por 60 h e posteriormente expostos a 50 μM de Cd (THOMPSON e BANNIGAN, 2007). Dos indivíduos expostos por 48 h 60% sobreviveram, já nos expostos por 72 h apenas 50% sobreviveram, enquanto que para os de 144h de exposição apenas 20% sobreviveram. Apesar do presente trabalho não apresentar diferença significativa nos índices de mortalidade entre os indivíduos incubados por 48 e 72 h, é importante considerar que os indivíduos de 72 h expostos à maior dose de cádmio apresentaram maiores índices de falha no desenvolvimento que os de 48 h do mesmo grupo de exposição. As taxas de falha no desenvolvimento não foram citadas no trabalho de Cullinane (2009) e nem no de Thompson e Bannigan (2007), não sendo possível compará-las diretamente com as deste trabalho.

O atraso no desenvolvimento embrionário dos embriões de galinha pode ocorrer como uma das consequências da exposição ao cádmio, assim como a mudança das propriedades adesivas de células peridermais e alterações da mesoderme lateral, da parede ventral do corpo, na formação do tubo neural e na morfologia dos somitos (THOMPSON *et al.*, 2005), mau posicionamento dos membros dorsais e lordose exagerada na região lombossacral (THOMPSON e BANNIGAN, 2007). Além disso, a exposição de Cádmio em ratos relata defeitos faciais e anormalidades nas costelas (FERM, 1971), hidrocefalia, defeitos nos olhos e gastrosquise (SAMARAWICKRAMA e WEBB, 1981).

Apesar de não termos observado neste trabalho um atraso no desenvolvimento dos embriões expostos ao cádmio em relação aos indivíduos controle, verificou-se que os embriões que apresentaram maiores alterações geralmente pertenciam a estádios de desenvolvimento mais precoces, principalmente naqueles que apresentavam anormalidades intensas (em alguns não era possível contar os somitos do indivíduo).

A realização das análises morfológicas demonstrou representar um bom biomarcador em embriões de galinha expostos ao cádmio, onde as alterações destes indivíduos foram visualizadas com facilidade. Foram encontrados vários tipos de alterações nos indivíduos expostos ao Cd, onde se observou pelo menos uma ocorrência de anormalidade para todas as regiões analisadas. As alterações encontradas na região cefálica, nas vesículas ópticas e no coração (variando de leve intensidade até a não formação) confirmam a toxicidade do Cd, já que este interferiu na formação de órgãos essenciais para a sobrevivência do indivíduo. A malformação das vesículas ópticas, por exemplo, afeta a visão do indivíduo prejudicando na busca por alimento ou na fuga de predadores, caso o embrião chegue a sobreviver. Destas, a alteração predominante foi a malformação da região cefálica, principalmente no prosencéfalo (telencéfalo + diencéfalo). Estas regiões apresentam grande importância para o controle tanto dos estímulos nervosos como dos endócrinos, já que o telencéfalo dará origem aos hemisférios cerebrais e o diencéfalo formará o tálamo e o hipotálamo. Em humanos, a exposição de Cd tem efeitos danosos no Sistema Nervoso Central (SNC), com sintomas incluindo dores de cabeça e tonturas, sintomas semelhantes aos da doença de Parkinson, diminuição da visão, neuropatias periféricas, diminuição de equilíbrio e da capacidade de concentração (VIAENE *et al.*, 2000).

A atividade da G6PDH reduzida em embriões expostos por 48h em relação aos expostos por 72h demonstra que os embriões em menores estádios de desenvolvimento apresentam uma capacidade antioxidante menor em relação aos maiores. Ao se comparar as atividades das enzimas GST e G6PDH entre os diferentes grupos verificou-se que não houve diferença significativa, o que demonstra que o Cd não alterou a atividade das enzimas, pelo menos para os estádios em que se encontravam. Provavelmente, se fossem utilizados embriões em estádios de desenvolvimento mais avançados, estes apresentariam uma resposta antioxidante mais eficiente, caracterizada por uma atividade de enzimas antioxidantes basal mais elevada.

Os mecanismos exatos responsáveis pela toxicidade do Cd não são totalmente compreendidos. Aparentemente, ele não gera radicais livres por si, mas aumenta a peroxidação lipídica em vários tecidos após a exposição ao Cd (STOHS e BAGCHI, 1995; MULLER, 1991). Em outro estudo, células humanas em cultura apresentaram inibição do fator neurotrófico ciliar (CTNF) mediados

pela sinalização de tirosino-quinases Jak1 e Jak2, após a exposição ao Cd, o que demonstra sua neurotoxicidade. Vários artigos na literatura sugerem que os efeitos deletérios do cádmio em vários tipos de tecidos podem ser amenizados por pré-tratamento ou co-tratamento com cátions divalentes ou trivalentes. Vários mecanismos têm sido sugeridos para este efeito, incluindo a competição entre Cd e outros cátions divalentes por sítios iônicos em moléculas (PROZIALECK, 2000) e enzimas (PRASAD *et al.*, 1967; MATTHEWS *et al.*, 2004) de células adesivas e a resistência à indução do estresse oxidativo (GUPTA *et al.*, 2004) pelo cádmio. Há evidências de que o Cd pode se ligar covalentemente com a adenina e guanina levando a mudanças estruturais das bases nitrogenadas, e conseqüentemente, danos no DNA (HOSSAIN e HUQ, 2002). Presumivelmente os cátions divalentes são capazes de se comportar como bloqueadores de canais Cálcio (HESS *et al.*, 1986; LANSMAN *et al.*, 1986; WINEGAR *et al.*, 1991; SHIBUYA e DOUGLAS, 1992), sendo que trabalhos relatam que mais de 50% do cádmio entra na célula via canais de Ca^{+2} (HINKLE *et al.*, 1987).

Estudos adicionais são necessários tanto para avaliar os mecanismos de ação do cádmio para relacioná-los com seus efeitos em diferentes modelos de estudo, assim como possíveis formas de tratamento para os efeitos deste contaminante no organismo.

6 CONCLUSÕES

- Apesar do grande número de ovos utilizados no experimento, os embriões de galinha demonstraram ser um bom modelo de estudo, apresentando sensibilidade ao cádmio.
- Embriões com 48 h de incubação são mais difíceis de coletar, sendo necessário utilizar um maior número de ovos para suprir os perdidos.
- A injeção do contaminante na câmara de ar possui maior garantia de que o embrião estará exposto a este do que se o contaminante fosse injetado na clara do ovo, fato confirmado pela injeção do corante vital.
- O cádmio demonstrou ser um metal de efeitos teratogênicos.
- Apesar de não haver diferença significativa das taxas de mortalidade entre os grupos, verificou-se que os embriões de 72 h expostos a maior dose apresentaram menor taxa de não desenvolvimento em relação aos de 48 h do mesmo grupo.
- Através das análises morfológicas foi possível observar alterações, predominantes na região cefálica, nos embriões expostos ao cádmio (principalmente os de maior dose) tanto por 48 h assim como os de 72 h.
- A atividade da Glutathione S-Transferase demonstrou ser baixa tanto nos embriões incubados por 48 h assim como os de 72 h, não havendo diferença significativa entre eles.
- A atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase demonstrou ser maior nos indivíduos incubados por 72 h em relação aos de 48 h, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos controle e expostos ao Cd.
- Estudos adicionais são necessários para determinar os mecanismos de ação do cádmio, assim como para combater seus efeitos.
- O embrião de ave pode ser utilizado como modelo para o estudo de efeitos teratogênicos de outros contaminantes ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S.M.; SHEPARD K.L.; GREELEY M.S.; JIMENEZ, B.D.; RYON, M.G.; SHUGART, L.R.; MCCARTHY, J.F. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Research**, v. 28, p. 459-464, 1989.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M., ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**, 2ª Edição, Editora ARTMED, 2006.

AMARAL, A.; SOTO, M.; CUNHA, R.; MARIGÓMEZ, I.; RODRIGUES, A. Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils. **Environmental Pollution**, v. 142, p. 103-108, 2006.

ATSDR – Agency for toxic substances & disease registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>. 2007.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v.29, n. 1, p.113-123, 2006.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNSTRÖM, B.; REUTERGÅRDH, L. Differences in sensitivity of some avian species to the embryotoxicity of a PCB, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, injected into the eggs. **Environmental Pollution Series A**, v.42, p.37-45, 1986.

BRUNSTRÖM, B. Sensitivity of embryos from duck, goose, herring gull, and various chicken breeds to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. **Poultry Science**, v.67, p.52-57, 1988.

BRUNSTRÖM, B. Toxicity of coplanar polychlorinated biphenyls in avian embryos. **Chemosphere**, v.19, p.765-768, 1989.

CARLSON. B.M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CARVALHO, M.S.L. Efeitos do Acetato de Chumbo no desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*, com ênfase na Morfologia e organização das células Microgliais do telencéfalo. Dissertação (Mestrado em Neurociências), **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2002.

CHO, J.H.; LEE, C.E. Effects of diazinon on the anatomical and embryological changes in the developing chick embryo. **RDA Journal of Agricultural Science**, v.32 (3), p.35-47, 1990.

CULLINANE, J.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. - Cadmium teratogenesis in the chick: Period of vulnerability using the early chick culture method, and prevention by divalent cations – **Reprod. Toxicol.**, p.1-7,2009.

DIAS, P.F.; MÜLLER, Y.M.R. Ação da insulina na morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59 (2), p.343-350, 1999.

DUIZER, E.; GILDE, A.J.; VERSANTVOORT, C.H.M.; GROTEN J.P. Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.155, p.17–26, 1999.

ENGWALL, M.; BRUNSTRÖM, B.; JAKOBSSON, E. Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)-inducing potency and lethality of chlorinated naphthalenes in chicken (*Gallus domesticus*) and eider duck (*Somateria mollissima*) embryos. **Archives of Toxicology**, v.68, p.37-42, 1994.

FERM, V.H. Developmental malformations induced by cadmium: a study of imed injections during embryogenesis. **Biol Neonate**, v.19(1), p.101–7, 1971.

FILIPAK NETO, F. Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas, MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da **Universidade Federal do Paraná**, 132p., 2007.

FREITAS, P. F. Correlação entre distribuição de ephrinas-B e glicoconjugados PNA-positivos e trajetos migratórios de células da crista neural: análise ao nível vagal em embriões de galinhas leghorn, e de galinhas leghorn e sedosa japonesa ao nível do tronco. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da **Universidade Federal do Paraná**,2006.

GABBIANI, G.; BADONNEL, M.C.; MATHEWSON, S.M.; RYAN, G.B. Acute cadmium intoxication. Early selective lesions of endothelial clefts. **Lab Invest**; v.30, p. 86–95, 1974.

GILBERT, S. F. *Biologia do Desenvolvimento*, 2a Edição revisada, 1995.

GOMEZ-MILAN, E., LOZANO, M.J.S.M. Daily and annual variations of the hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase activity and seasonal changes in the body fats of the gilthead seabream *Sparus aurata*. **J. Exp. Zool.**, v.307A, p.516–526, 2007.

GONZALES, E. *Embriologia e Desenvolvimento Embrionário*. In: APINCO. *Manejo da Incubação*. São Paulo, 1994.

GUPTA, R.S; GUPTA, E.S.; DHAKAL, B. K.; THAKUR, A.R.; AHNN, J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. **Mol Cells**, v. 17(1), p. 132–9, 2004.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v.88, p.49-92, 1951.

HEATON, M. B.; BRADLEY, D. M. Ethanol influences on the chick embryo spinal cord motor system: analyses of motoneuron cell death, motility, and target trophic factor activity and in vitro analyses of neurotoxicity and trophic factor neuroprotection. **Journal of Neurobiology**, v.26 (1), 1995.

HEINRICH-HIRSCH, B.; HOFFMAN, D.; WEBB, J.; NEUBERT, D. Activity of aldrin epoxidase, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase during the development of chick embryos *in ovo*. **Archives of Toxicology**, v.64, p.128-134, 1990.

HESS P, LANSMAN JB, TSIEN RW. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. **J Gen Physiol**, v. 88, p. 293–319, 1986.

HINKLE, P.M.; KINSELLA, P.A.; OSTERHOUDT, K.C. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. **J Biol Chem**, v. 262(34), p. 16333–7, 1987.

HOSSAIN Z, HUQ F. Studies on the interaction between Cd²⁺ ions and DNA. **J Inorg Biochem**, v. 90, p. 85–96, 2002.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v.26, p. 2489-2491, 1987.

KAN, B., LONDON, I.M., LEVIN, D.H. Role of reversing factor in the inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione. **J. Biol. Chem.** v. 263, p.15652–15656, 1988.

LANSMAN JB, HESS P, TSIEN RW. Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. **J Gen Physiol**, v.88, p.321–347, 1986.

MATTHEWS, K.W.; MUELLER-ORTIZ, S.L.; WETSEL, R.A. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. **Mol Immunol**, v. 40, p. 785–93, 2004.

MAYER, F.L.; VERSTEEG, D.J.; MCKEE, M.J.; FOLMAR, L.C.; GRANEY, R.L.; MCCUME, D.C.; RATTNER, B.A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M. and Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers*.

Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Lewis Publishers, Colorado, p.5-85, 1992.

MULLER, L. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **Toxicology**, v.67, p.285–292, 1991.

NIEWENHUIS, R.J.; DIMITRIU, C.; PROZIALECK, W.C. Ultrastructural characterization of the early changes in intercellular junctions in response to cadmium (Cd²⁺) exposure in LLC-PK1 cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.142, p.1–12, 1997.

QUALIFE, C.; DURNAM, D.; MOTTET, N.K. Cadmium hypersusceptibility in the C₃H mouse liver: cell specificity and possible role of metallothionein. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.76, p. 9–17, 1984.

PRASAD, A.S.; OBERLEAS, D.; WOLF, P.; HORWITZ, J.P. Studies on zinc deficiency: changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats. **J Clin Invest**, v.;46(4), p. 549–57, 1967.

PROZIALECK, W.C.; NIEWENHUIS, R.J. Cadmium (Cd²⁺) disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK1 cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.107, p.81–97, 1991.

PROZIALECK, W.C. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 164, p. 231–49, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. **Elsevier**, 5^a Edição, p. 434-449, 2004.

SALVEMINI, F.; FRANZE, A.; IERVOLINO, A.; FILOSA, S.; SALZANO, S.; URSINI, V. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. **J. Biol. Chem.**, v. 74, p. 2750–2757, 1999.

SAMARAWICKRAMA, G.P.;WEBB, M. The acute toxicity and teratogenicity of cadmium in the pregnant rat. **J Appl Toxicol**; v. 1, p. 264–9, 1981.

SCHATZ, J.C. Caracterização morfológica de embriões de *Gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula. Dissertação (Mestrado em Neurociências), **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2003.

SCHLAEPFER, W.W. Sequential study of endothelial changes in acute cadmium intoxication. **Lab Invest**, v.25, p.556–564, 1971.

SCHOENWOLF, G. C. The avian embryo: a model for descriptive and experimental embryology. In: MOODY, S. A. Cell lineage and fate determination. San Diego: **Academic Press**, 644p, 1999.

SHIBUYA I, DOUGLAS WW. Calcium channels in rat melanotrophs are permeable to manganese, cobalt, cadmium, and lanthanum, but not to nickel: evidence provided by fluorescence changes in fura-2-loaded cells. **Endocrinology**, v.;131, p. 1936–41, 1992.

SLENZKA, K., APPEL, R., RAHMANN, H. Development and altered gravity dependent changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the brain of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. **Neurochem.**, v. 26, p.579–585, 1995.

STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radic Biol Med**, v.18, p.321–336, 1995

THOMPSON, J.; HIPWELL, E.; VOON LOO, H., BANNIGAN, J. Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos. **Reproductive Toxicology**, v.20, p.539-548, 2005.

THOMPSON, J., BANNIGAN J. Omphalocele induction in the chick embryo by administration of cadmium. **Journal of Pediatric Surgery**, v.42, p.1703–1709, 2007.

THOMPSON, J.; WONG, L.; LAU, P.S.; BANNIGAN, J. Adherens junction breakdown in the periderm following cadmium administration in the chick embryo: distribution of cadherins and associated molecules. **Reproductive Toxicology**, v.25, p.39–46, 2008.

URSINI, M.V., PARRELLA, A., ROSA, G., SALZANO, S., MARTINI, G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochem. J.**, v.323, p.801–806, 1997.

VIAENE, M. K.; MASSCHELEIN, R.; LEENDERS, J.; DE GROOF, M.; SWERTS, L. J.; ROELS, H. A. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. **Occup. Environ. Med.**, v.57, p.19–27, 2000.

VODELA, J. K.; LENZ, S. D.; RENDEN, J. A.; MCELHENNEY, W. H.; KEMPPAINEN, B. W. Drinking water contaminants (arsenic, cadmium, lead, benzene and trichloroethylene). 2. Effects on reproductive performance, egg quality, and embryo toxicity in broiler breeders. **Poultry Science**, v.76, p.1493-1500, 1997.

WEIDNER, W.J.; SILLMAN, A.J. Low levels of cadmium chloride damage the corneal endothelium. **Arch Toxicol**, v. 71, p.45–60, 1997.

WINEGAR, B.D.; KELLY R.; LANSMAN, J.B. Block of current through single calcium channels by Fe, Co, and Ni. Location of the transition metal binding site in the pore. **J Gen Physiol**, v. 97, p. 351–67, 1991.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSEL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E. Princípios de Biologia do Desenvolvimento, editora ARTMED, 2000.

ZHANG, J.; FU, Y.; LI, J.; WANG, J.; HE, B.; XU, S. - Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. **Environm Toxicol Pharmacol**, v.27, p.345–349, 2009.

ZIRONG, X.; SHIJUN, B. Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v.67, p.89–94, 2007.