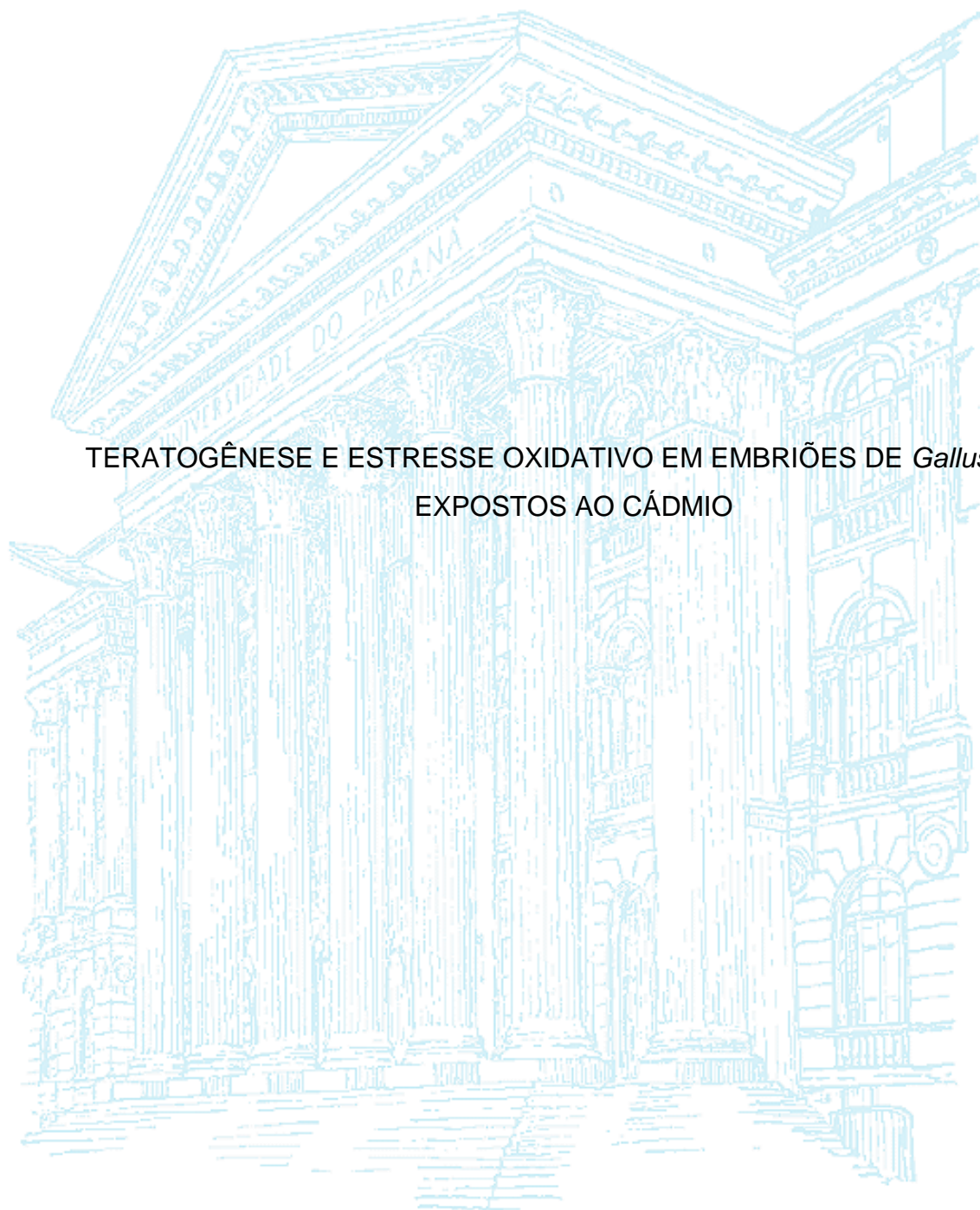


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISLEINE JARENKO STEIL



TERATOGENESE E ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES DE *Gallusgallus*  
EXPOSTOS AO CÁDMIO

CURITIBA

2013

GISLEINE JARENKO STEIL

TERATOGENESE E ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES DE *Gallusgallus*  
EXPOSTOS AO CÁDMIO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Feijó Ortolani-Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2013

## AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, preciso agradecer a todos que ajudaram a tornar tudo isso possível:

Primeiramente à família, que estão comigo desde que estou nesse mundo e ficarão comigo mesmo depois que se forem. Principalmente minha mãe e minha vó, meus exemplos, minhas guerreiras. Nunca mediram esforços em relação aos meus estudos: sempre me apoiando (inclusive financeiramente), fortificando, aconselhando, acolhendo. Ao meu irmão, por influenciar diretamente na minha decisão de prestar vestibular para a UFPR faltando um ano para eu me formar na PUC, obrigado pelas discussões em relação à isso.

Ao meu pai, que sempre deu muito valor à educação e ao exemplo que me dá entrando no mestrado depois dos seus 50 anos. Às minhas irmãzinhas, pelo simples fato de existirem na minha vida. Às minhas primas, principalmente Annelise por estar sempre por perto e por me oferecer várias caronas, nunca esquecerei daquela para a prova da 2ª fase da UFPR. E também àThaysa, bióloga, obrigada por aguçar a minha curiosidade sobre as áreas mais lindas da biologia.

À minha orientadora, Claudia Feijó Ortolani-Machado, pelos ensinamentos, conselhos, sugestões, firmeza com delicadeza, apoio e por confiar em mim.

Ao meu co-orientador, Francisco Filipak Neto, por me ajudar na compreensão de vários pontos, pelas análises estatísticas, pelo auxílio nas dúvidas, pelas sugestões e orientação.

À Patrícia Franchi de Freitas (UTFPR - Dois Vizinhos), por ajudar intensamente na primeira parte do meu trabalho e primeiro ano da minha iniciação científica, pelas sugestões sempre bem vindas, pelo auxílio com a coloração e análises anátomo-morfológicas dos embriões.

Ao professor Marco Randi (UFPR), pelas análises estatísticas presentes nesse trabalho.

À todos os colegas e amigos do laboratório de Biologia do Desenvolvimento e de Toxicologia Celular, importantes diretamente na realização deste trabalho: Dandie, obrigada por ser sempre tão solícito e paciente comigo, desculpa minha ansiedade e obrigada pelas conversas e conselhos, não por me dar sustos. Mannu, obrigada por aguentar meu humor quando os experimentos não davam certo, minhas piadas, meus desesperos, minha fala rápida e o ritmo do estágio. Érica, durante o tempo que ficou no laboratório sempre me ajudou muito. Everton, obrigada por sempre me acalmar com a sua fala calma e por ser meu companheiro de laboratório desde o princípio.

Aos amigos de infância, cuja amizade durará para sempre e sempre: Camila e Luiz Rodolfo, todos os momentos ao lado de vocês valem à pena. Obrigada por tudo.

Aos colegas e amigos que ganhei na PUC, toda a turma foi de suma importância na minha vida, mas, principalmente: Thuane, Lina, Aline, Gabriela e Bruno.

Aos colegas e amigos que ganhei na UFPR, principalmente: Fernando, Saritha, Rafinha e Amanda Protsky.

A todos os orientadores de estágios anteriores, principalmente: Marta L. Fischer, Marcílio Thomazzini, Suzete Penteado e Guilherme Schuhli, além de colegas de estágios anteriores. Vocês foram muito importante para o meus conhecimentos e crescimento profissional.

À Bulma, minha filha peluda, orelhuda e de focinho, pelo carinho e amor incondicional que sente por mim, além de dormir no meu pé várias vezes durante meus estudos.

Ao meu amor, meu companheiro, meu amigo, Eduardo, por estar comigo durante todo esse processo, por acreditar no meu potencial e nunca desistir de ser uma pessoa melhor e me fazer uma pessoa melhor a cada dia.

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O cádmio(Cd) é um metal tóxico, capaz de causar efeitos adversos em uma ampla variedade de animais, incluindo embriões de aves. Estes são empregados como modelo na toxicologia, pois são muito sensíveis à ação de contaminantes. Porém, há poucos estudos sobre seus efeitos nos estádios iniciais de desenvolvimento. Além disso, a investigação do estresse oxidativo induzido pelo contaminante também mostra-se útil na determinação dos efeitos tóxicos do cádmio em embriões de ave. O objetivo do presente trabalho foi avaliar em embriões de ave com 3 e 7 dias de desenvolvimento os efeitos na morfologia e estresse oxidativo da exposição ao cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) em duas concentrações. Os ovos foram divididos em 3 grupos e expostos através da injeção, na câmara de ar do ovo, de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{CdCl}_2$  a 5  $\mu\text{M}$  e a 50  $\mu\text{M}$ . O grupo controle foi injetado com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após a exposição, os ovos foram incubados durante 3 e 7 dias. Para as análises morfológicas os embriões de 3 dias foram fixados, corados, montados em lâmina e analisados em estereomicroscópio, os de 7 dias foram fixados, lavados e fotografados para posteriores análises. Os resultados demonstraram que o cádmio não induz a mortalidade dos embriões nem promove atrasos no desenvolvimento para essas doses e tempo analisadas, porém é capaz de promover efeitos teratogênicos, causando, principalmente, malformações como falhas no fechamento da parede do corpo e alterações cefálicas. Nos grupos contaminados na menor dose foram encontrados mais indivíduos malformados e embriões com 7 dias apresentaram mais variações de malformações. Para as análises bioquímicas, após a coleta os embriões foram lavados com PBS e armazenados a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, foram homogeneizados, e o homogenato centrifugado e alíquotado. A concentração de proteínas foi determinada pelo método BRADFORD (1976) e serviu de base para as padronizações. A análise de concentração de tióis não proteicos e glutathiona (GSH) demonstrou que esse não é um sistema relacionado com a toxicidade do Cd. A análise da peroxidação lipídica (LPO) para embriões com 3 dias indica um aumento das defesas para a LPO, ou uma falha nos processos geradores da LPO induzido pelo Cd. Para embriões com 7 dias essa análise não demonstrou diferença significativa. Comparando os valores em embriões com 3 e 7 dias foi observado que a LPO aumenta com o tempo de

incubação. A análise da concentração de carbonilas(PCO) indica que o cádmio promove efeitos tóxicos e danos a proteínas. A enzima catalase(CAT) não pode ser mensurada em embriões com 3 dias, porém foi detectável em embriões com 7, demonstrando que esse sistema antioxidante está em processo de desenvolvimento e embriões mais jovens são mais sensíveis ao estresse oxidativo. Esses resultados indicam que o cádmio tem efeito teratogênico já nos estádios iniciais de desenvolvimento, além de induzir estresse oxidativo em embriões de galinha contaminados, nos tempos e concentrações utilizados nesse trabalho.

Palavras-chave: Metais pesados; Embrião de ave; Morfologia; Malformações; Glutathiona; Carbonilação de proteínas; Peroxidação lipídica; Catalase.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>1.1 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO EXPERIMENTAL</b> .....	8
<b>1.2 CÁDMIO</b> .....	9
<b>1.3 ESTRESSE OXIDATIVO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
<b>3.1 EMBRIÕES COM 3 DIAS DE DESENVOLVIMENTO</b> .....	24
<b>3.2 EMBRIÕES COM SETE DIAS DE DESENVOLVIMENTO</b> .....	26
<b>3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS</b> .....	28
<b>4 RESULTADOS</b> .....	32
<b>4.1 ANÁLISES ANÁTOMO-MORFOLÓGICAS</b> .....	32
<b>4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS</b> .....	39
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	50
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO EXPERIMENTAL

A espécie de ave mais utilizada em estudos de laboratório é *Gallusgallus*, sendo necessário incubar os ovos por 21 dias em temperatura de 38°C, oxigenação e umidade apropriadas para que a eclosão possa ocorrer. Este modelo animal apresenta várias vantagens sobre outras espécies, tais como: facilidade de obtenção e observação, o embrião desenvolve-se fora do corpo da mãe, o tempo total de desenvolvimento é curto e seu desenvolvimento é muito bem documentado (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Entretanto, podem ocorrer variações individuais entre embriões, seja por variações genéticas, diferença entre o momento de exposição e incubação ou até mesmo por variações de temperatura, tipo e tamanho da incubadora. Para que essas variações não influenciem na análise do desenvolvimento dos embriões, esses são analisados por estádios, que nada mais são do que a relação entre idade cronológica e o desenvolvimento de estruturas em embriões de galinha (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). A análise dos estádios em estudos de toxicologia permite a observação tanto de atraso no desenvolvimento do embrião causado pelo contaminante, como também de alterações morfológicas.

Além disso, o início do desenvolvimento embrionário de aves pode ser comparado com o processo de desenvolvimento de outros grupos animais, que podem ser mais difíceis de serem estudados em laboratório, como mamíferos.

Após a fertilização, a primeira divisão celular em aves começa aproximadamente 3 horas, o que corresponderia em humanos ao período de 24 horas. No segundo dia de incubação, inicia a formação do cérebro, olhos e ouvidos, início do sistema vascular, o que corresponde a aproximadamente a 3ª e 4ª semana de gestação em humanos. No 4º dia, o desenvolvimento do embrião de ave equivale a 2 meses de gestação humana. A partir desse estágio, não é possível comparar os estádios de desenvolvimento do embrião de ave ao desenvolvimento de outros grupos animais (MOORE; PERSAUD, 1994 *apud* GANDARRA, 2002).

Portanto, os embriões de ave, além de serem amplamente utilizados em estudos relacionados com embriologia descritiva, experimental e do

desenvolvimento, são utilizados também em estudos de toxicologia e teratologia, por serem sensíveis à maior parte dos efeitos químicos (VÁRNAGY, 1985 *apud* KERTÉSZ; HLUBIK, 2002).

## 1.2 CÁDMIO

O metal cádmio (Cd) é um elemento químico presente na atmosfera, na crosta terrestre, solos vulcânicos, rochas sedimentares, água do mar, água doce e gelo (CARDOSO; CHASIN, 2001), sendo a atividade vulcânica a principal fonte natural de lançamento de cádmio para a atmosfera. As emissões de cádmio no ambiente ocorrem para o ar, água e solo, sendo que o metal tem maior mobilidade no ar e menor no solo. Além disso, as condições climáticas como chuvas e ventos também podem ser responsáveis por transportar o cádmio dos rios até os oceanos, representando o maior fluxo global do cádmio (WHO, 1992). Além de estar presente no ambiente naturalmente, várias ações antrópicas promovem um aumento significativo da quantidade desse metal no ambiente, como a mineração, produção industrial e lixo proveniente da indústria (WHO, 1992). Os principais usos industriais são em revestimento do aço e do ferro, como estabilizador para cloreto de polivinila (PVC), em pigmentos para plástico e vidro, baterias de níquel-cádmio e ligas metálicas fundíveis (WHO, 1992). O cádmio também é componente de aparelhos eletrônicos como computadores, monitores de tubo, bateria de laptops e celulares. O descarte ou destinação incorreta dos produtos eletrônicos que contém cádmio geram lixo eletrônico, cujas consequências são danos ao meio ambiente e ao homem (FERREIRA; FERREIRA, 2008).

É um metal potencialmente tóxico e possui capacidade de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar. No ambiente aquático causa toxicidade a microorganismos, podendo ser captado e retido por plantas aquáticas e acumulado em animais que por ventura se alimentem destas. Pode, também, ser bioacumulado por organismos marinhos, como peixes, crustáceos e moluscos. Já a contaminação do solo pode aumentar a absorção desse metal por plantas, musgos e líquens, sendo que muitas espécies vegetais são sensíveis a solos contaminados. Ainda, animais herbívoros que se alimentam de plantas contendo cádmio contaminam-se também (CARDOSO; CHASIN, 2001).

A contaminação humana pode ocorrer pelo ar, água e, principalmente, por alimentos e bebidas contaminados e pela exposição à fumaça do cigarro (CARDOSO; CHASIN, 2001). O cigarro contém cádmio a partir da planta do tabaco que absorve este do solo, fertilização e pesticidas (LEMOS et al., 2008). Estudos indicam que fumantes de tabaco estejam expostos a 1,7µg de cádmio por cigarro, sendo a quantidade absorvida de 1 a 3µg por dia aproximadamente (ADAMSSON, 1979 *apud* WHO, 1992).

Atualmente não existem tratamentos eficientes para minimizar os efeitos da contaminação crônica pelo cádmio. Sendo assim, impedir ou minimizar a contínua exposição ao contaminante é a principal medida preventiva para tentar diminuir o prejuízo da saúde dos indivíduos expostos (BERNARD, 2008).

#### *Toxicidade do cádmio*

O cádmio é listado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA como um dos 126 principais poluentes. Sua principal propriedade toxicológica é a meia-vida extremamente longa no organismo, estimada entre 15-20 anos em humanos (JIN; LU; NORBERG, 1998 *apud* WAISBERG et al., 2003).

Uma vez absorvido, independente da via de absorção, ele se acumula no organismo humano, em especial nos rins e outros órgãos vitais. Por ser altamente tóxico, também pode alterar vários sistemas biológicos (BERNARD, 2008), como o imune e o endócrino.

Nos seres humanos, a intoxicação aguda por cádmio através da exposição à fumaça contendo cádmio pode provocar uma pneumonia química grave com edema pulmonar e morte. No caso de ingestão, pode causar descamação da mucosa intestinal, resultando em diarreia grave e sangramento, e vômito. Já na intoxicação crônica, os rins, pulmões e os ossos são os órgãos mais afetados (GODT et al., 2006; JOHRI et al., 2010).

O cádmio é classificado em 1º lugar na categoria de carcinógeno pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer nos EUA, indicando que é capaz de induzir câncer em humanos e animais (IARC, 1993). A exposição ambiental ao cádmio é relacionada, principalmente, com câncer de pulmão (NAWROT et al., 2006), renal (IL'YASOVA; SCHWARTZ, 2005; JOHRI; JACQUILLET; UNWIN, 2010), além de acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca (PETERS et al., 2010), e problemas ósseos como a osteoporose (AKESSON et al., 2006; GODT et al.,

2006;BERNARD, 2008; NAWROT et al., 2010). Estudos realizados com mulheres na pós-menopausa também sugerem que o cádmio é um composto estrogênico e a exposição ao metal está associada ao aumento dos níveis de testosterona, que tem sido relacionado com um maior risco ao desenvolvimento de câncer de mama (NAGATA et al., 2005). Há trabalhos que relacionam a ingestão de cádmio proveniente de alimentos com câncer endometrial (AKESSON; JULIN; WOLK, 2008),ou o tabagismo com acúmulo de cádmio na placenta (PIASEK et al., 2001).

#### *Modelos animais demonstrando a toxicidade/teratogenicidade do cádmio*

Apesar de existirem muitos estudos com populações humanas expostas ao cádmio, para conseguir elucidar e demonstrar os mecanismos e efeitos de diferentes doses e exposição desse contaminante, devem ser utilizados em estudos modelos animais, já que o cádmio atua de forma similar em humanos e animais. Em função disso, espécies como peixes, aves, ratos, camundongos, coelhos e macacos podem ser utilizadas na investigação da toxicidade desse metal.

Utilizando como modelo animalo peixe *Daniorerio* (zebrafish),a contaminação com cádmio indica que a mortalidade aumenta com a concentração do contaminante, sendo esse capaz também de afetar a somitogênese, a formação da notocorda, diferenciação de células musculares, o eixo corporal, causar edema cardíaco, hipopigmentação, hipoplasia de cabeça e olhos, deformidades no saco vitelino e cauda. Também foram constatadas consequências fisiológicas relacionadas com a atividade, que demonstraram defeitos de locomoção nesses animais contaminados(CHENG et al., 2000; HEN CHOW; CHENG, 2003).

Em embriões do anfíbio *Xenopus laevis* observou-se que a mortalidade dependeu da concentração do cloreto de cádmio ( $CdCl_2$ ), sendo que os embriões apresentaram rotação anômala do intestino, anomalias oculares, dobra na notocorda, nadadeira dorsal disforme, displasia facial, deformidades cardíacas e bolhas dérmicas, além de retardo no crescimento e hipopigmentação(SUNDERMAN; PLOWMAN; HOPFER, 1991).

No caso de animais placentários, como em ratos, o cádmio pode afetar a reprodução, incluindo efeitos nos testículos, ovário e sobre a placenta(THOMPSON; BANNIGAN, 2008). Os efeitos do cádmio no embrião pós-implantação dependem da fase e da dose em que são expostos ao contaminante. Efeitos causados quando a contaminação ocorre na fase próxima a gastrulação podem incluir: retardo do

crescimento, malformações craniofaciais, malformações cardiovasculares, anomalias intestinais e deformidades corporais em diferentes espécies (THOMPSON; BANNIGAN, 2008). Embriões de ratas em diferentes dias de gestação apresentaram malformações, atrofia das regiões cervicais e do crânio, diminuição do peso dos fetos e alterações na cabeça como anoftalmia, microftalmia e hidrocefalia. Foi observado que o cérebro também sofreu alterações e era menor que nos controles (PARZYCK et al., 1978).

Estudos posteriores a esses indicam ainda que o cádmio é um poderoso estrogênio não esteroide *in vivo*, indicando que o metal pode representar uma nova classe de desreguladores endócrinos (JOHNSON et al., 2003), podendo causar também baixa natalidade e abortos espontâneos em ratas (GODT et al., 2006).

Embriões de ave contaminados após 60h de incubação apresentaram maior mortalidade com o aumento da dose do contaminante. Já a taxa de anomalias aumentou com a dose, até certa concentração, e declinou com as concentrações mais elevadas. Isso pode ter sido ocasionado pela grave citotoxicidade em doses mais elevadas (THOMPSON; BANNIGAN, 2001). Além disso, defeitos no tubo neural podem ocorrer se a contaminação acontecer antes da fase de neurulação estar completa. Os defeitos na parede do corpo e em membros tendem a ocorrer com a administração de cádmio no período pós-neurulação (THOMPSON; BANNIGAN, 2008).

Estudo anterior realizado em nosso laboratório, injetando o contaminante no dia zero, antes da incubação, demonstrou que em embriões de ave com 48h e 72h de desenvolvimento as alterações morfológicas foram mais evidentes na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , sendo que as malformações foram encontradas, principalmente, na região cefálica, vesículas ópticas, auditivas e no coração (YAMAMOTO et al., 2012).

Além disto, um dos defeitos induzidos pelo cádmio em embriões de ave apresenta características consistentes com a onfalocele, inclusive com a presença de lordose da coluna vertebral, que é uma característica da onfalocele humana (THOMPSON; BANNIGAN, 2007). As onfaloceles são defeitos no abdômen por onde protui conteúdo abdominal dentro de um saco formado por peritônio e âmnio. Além disso, o embrião de galinha é um bom modelo experimental para reproduzir um caso de gastrosquise em humanos. Gastrosquise é definida por um defeito da

espessura total da parede abdominal, onde protuem as vísceras abdominais (GANDARA, 2002).

De uma maneira geral, o cádmio em embriões é capaz de produzir malformações da parede ventral do corpo, no sistema nervoso central, nos membros, face, olhos e no intestino, dependendo da espécie e da fase de tratamento (THOMPSON et al., 2010)

A teratogenicidade do cádmio pode estar relacionada à substituição de zinco ou cálcio por cádmio em muitos processos biológicos, estresse oxidativo, proliferação anormal de células e apoptose (THOMPSON; BANNIGAN, 2008). Outros estudos mais recentes indicam que o cádmio pode alterar a regulação de alguns genes, interferir na somitogênese e prejudicar o desenvolvimento da parede abdominal (DOI et al., 2011).

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O processo de oxidação ocorre no metabolismo de organismos aeróbicos. Esse processo produz naturalmente radicais livres, que também podem ser produzidos por alguma alteração biológica. Um quadro de estresse oxidativo pode ser originado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante do organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

#### *Radicais livres*

De acordo com Hermes-Lima, (2004), “um radical livre é definido como qualquer átomo ou molécula que contenha elétrons desemparelhados e com existência independente”.

Esses radicais livres podem ser divididos em dois grupos, aqueles onde o elétron desemparelhado encontra-se em átomos de oxigênio (espécies reativas de oxigênio) ou em átomos de nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio). As principais espécies reativas de oxigênio (EROs) distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}\bullet$ ); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as espécies reativas de nitrogênio (ERN) estão o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ). Algumas dessas moléculas são altamente reativas no organismo

podendo danificar lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Outras moléculas são pouco reativas, mas também podem causar danos celulares. O radical HO• é o mais deletério ao organismo, devido a sua meia-vida muito curta (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As espécies reativas promovem reações com alguns substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA, podendo ocasionar mutações, inversões, podendo promover um acúmulo de bases danificadas e desencadear um processo canceroso. Pode ainda alterar aminoácidos de proteínas, causando perda ou modificação de sua função. Quando ocorrem na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo através da membrana, ou ocasiona a ruptura desta, levando à morte celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Além da capacidade de causar lesões diretas ao DNA, as espécies reativas podem interagir com muitas moléculas do sistema redox, causando perturbações funcionais e alterações estruturais, e, como um segundo mensageiro, pode influenciar na regulação gênica (WAISBERG et al., 2003).

### *Antioxidantes*

Os organismos aeróbicos possuem defesas contra espécies reativas de oxigênio (EROs) na forma de antioxidantes (HERMES-LIMA, 2004).

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”.

Em circunstâncias normais, há um equilíbrio entre a formação de radicais livres e sua remoção por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). No entanto, muitos estados patológicos e doenças estão associados com um aumento na geração de radicais livres ou em uma diminuição na capacidade antioxidante, às vezes com ambas as condições. Um aumento da formação de radicais livres necessita uma resposta celular para promover ou aumentar a síntese de antioxidantes endógenos. Porém, a defesa antioxidante pode ser pequena em relação a altas gerações de radicais livres, levando a uma condição de estresse oxidativo (HERMES-LIMA, 2004).

Existe ainda, uma correlação entre a atividade antioxidante de substâncias polares e a capacidade de inibir ou retardar o surgimento de células cancerígenas e

o envelhecimento das células em geral (FERRARO et al., 1994 apud BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, como a catalase (CAT) e superóxido dismutase(SOD) ou, não enzimaticamente, como a glutathione (GSH). Os antioxidantes podem ser produzidos pelo corpo ou ser provenientes da dieta, como a vitamina E e vitamina A (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os sistemas enzimáticos antioxidantes são três: o primeiro é composto por dois tipos de enzimas SOD, que catalisam a destruição do radical ânion superóxido  $O_2^{\bullet-}$ , convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A ação desta enzima permite a eliminação do  $O_2^{\bullet-}$  mesmo em baixas concentrações. O segundo sistema de prevenção é formado pela enzima catalase que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em oxigênio e água.

O terceiro sistema é composto pela GSH em conjunto com duas enzimas GPx(glutathioneperoxidase) e GR (glutathioneredutase). Esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutathione opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A GSH reduz o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  em presença de GPx, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

### *Estresse oxidativo no desenvolvimento*

As espécies reativas podem ser produzidas no metabolismo normal do embrião (GOTO et al., 1993 apud LIMA-VERDE et al., 2007).

Os efeitos patológicos induzidos por espécies reativas podem ocorrer durante o desenvolvimento embrionário. As alterações embrionárias podem ser resultado do aumento da produção de espécies reativas, seja pelo aumento na produção endógena ou induzida por xenobióticos. Esse aumento pode danificar moléculas e/ou alterar a tradução de sinal, oxidar proteínas, lipídios, DNA (WELLS et al., 2005), bloquear o desenvolvimento (GOTO et al., 1993) e comprometer a viabilidade do embrião (JABLONKA-SHARIFF; OLSON, 1997).

Por isso, os processos embrionários que regulam o equilíbrio da formação de EROs, dano oxidativo e reparo do DNA e tradução de sinal mediada por EROs são determinantes para evitar a teratogenicidade (WELLS et al., 2005).

### *Metais e estresse oxidativo*

Vários mecanismos estão relacionados com a toxicidade de alguns metais, como o cádmio, o chumbo, o mercúrio e o arsênio. Um provável e importante mecanismo envolvido é a geração de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente, o estresse oxidativo induzido por esses metais. Esses ainda apresentam afinidade para compartilhar elétrons, o que pode resultar em ligações covalentes (BONDY, 1996 *apud* ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001), que são formadas principalmente entre os metais e grupos sulfidrilas de proteínas. Portanto, a depleção de reservas de sulfidrilas de uma célula pode ser um mecanismo do estresse oxidativo induzido por metais (STOHS; BAGCHI, 1994 *apud* ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001).

Apesar dos metais apresentarem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio por diferentes maneiras, o mecanismo mais comum envolve reações do tipo Fenton e Haber-Weiss (ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001). A reação Haber-Weiss gera radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e superóxido. Como ocorre nas células, pode ser uma fonte de estresse oxidativo. A reação é lenta porém catalisada pelo ferro. A primeira etapa da reação é:  $Fe^{3+} + \bullet O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ . A segunda etapa da reação é uma reação de Fenton:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$ .

Além dos possíveis danos relacionados com estresse oxidativo já citados, metais também podem causar ativação de fatores de transcrição nucleares, ativação de sinalizadores de proteínas, interrupção do ciclo celular e apoptose. O estresse oxidativo induzido por metais explica também alguns efeitos cancerígenos causados por esses (LEONARD; HARRIS; SHI, 2004) (Figura 1).

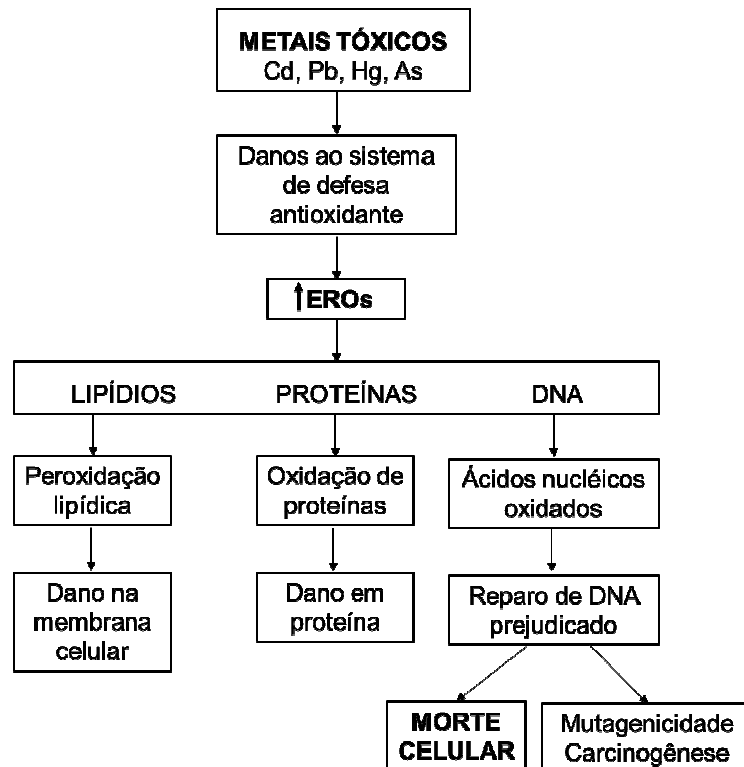


Figura 1: Possível mecanismo de estresse oxidativo induzido por metais (Adaptado de ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001).

### *Estresse oxidativo induzido por cádmio*

A toxicidade induzida por Cd pode ser multifatorial. O estresse oxidativo induzido por ele pode ser um mecanismo envolvido com sua capacidade tóxica. Outros mecanismos que podem estar envolvidos incluem a inibição de mecanismos de reparo do DNA, comprometimento do sistema de defesa antioxidante, a interferência em mecanismos de transdução de sinal e o rompimento da adesão célula-célula (WAISBERG et al., 2003).

O cádmio, por si só, é incapaz de gerar radicais livres diretamente (JOMOVA; VALKO, 2011), no entanto, a formação indireta de ERO e ERN envolvendo radicais hidroxila, superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio é aumentado em resposta ao cádmio. Além disso, o malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, também aumenta em resposta à contaminação, demonstrando a presença de EROs (WAISBERG et al., 2003).

O deslocamento do cobre e do ferro pelo cádmio pode explicar o aumento da toxicidade induzida por esse, pois o cobre deslocado de seu local de ligação é capaz de catalisar a desagregação de peróxidos de hidrogênio através de reações de Fenton (JOMOVA; VALKO, 2011).

Além de causar danos oxidativos diretamente no DNA, as EROs podem interagir com outras moléculas, podendo influenciar até na regulação gênica. Em consequência disso, alterações na síntese de proteínas podem ocorrer. Esse aumento do estado de estresse oxidativo nas células em resposta ao cádmio, provavelmente contribui para o seu potencial carcinogênico (WAISBERG et al., 2003).

Os mecanismos do estresse oxidativo induzido por cádmio podem ser divididos em três grupos:

1) Efeitos adversos de cádmio em sistemas de defesa celular e status tiol: O Cd permanece nos pulmões e induz uma proteína rica em cisteína (Cis), chamada de metalotioneína (MT). Existem várias isoformas de MTs, que são conhecidas por proteger células do estresse oxidativo. Como MTs são ricas em cisteína e os metais têm alta afinidade para tióis, MTs são conhecidas por sequestrar metais. Portanto, os metais (particularmente o Cd) são armazenados como um complexo de Cd-MT no fígado. Este Cd-MT é transferido pelo fígado para os rins, em seguida é filtrado e reabsorvido pelos túbulos renais proximais. O complexo Cd-MT é metabolizado nos lisossomos e libera íons de Cd. Uma vez liberados, esses íons se ligam novamente a MTs preexistentes ou recém-sintetizadas. Se a síntese de MTs não consegue acompanhar a demanda e essa falta supera outros sistemas de defesa, a toxicidade do Cd segue. A glutationa (GSH) é conhecida por proteger as células contra o estresse oxidativo. Quando ocorre aumento ou diminuição de seus níveis isto demonstra um estado de oxidação. Quando as células estão sofrendo estresse oxidativo, aumenta a síntese de GSH. Se este continua, a síntese de GSH não consegue suprir com eficiência a demanda, portanto, ocorre a depleção de GSH. Alterações nos níveis de GSH têm sido observados em estudos de toxicidade do Cd, sendo que a maioria dos estudos relataram um aumento nos níveis de GSH após exposição. Isso indica que a toxicidade do Cd provoca estresse oxidativo, modificando o status tiol de células (ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001).

2) Aumento da peroxidação lipídica pelo cádmio: A peroxidação lipídica é observada na toxicidade do Cd, porém as razões não são completamente conhecidas. Acredita-se que as variações nos níveis de GSH e MT podem conduzir os radicais livres para a forma "reativa", de forma que os radicais HO• e O<sub>2</sub>•- podem atacar ligações duplas dos lipídios da membrana, resultando num aumento da peroxidação lipídica. Além

disso, a respiração mitocondrial, como a principal fonte de ROS, é promovida pela peroxidação de lipídios e, portanto, aumenta o estresse oxidativo, induzido pela toxicidade do Cd(ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001).

3) Os efeitos deletérios de cádmio em enzimas celulares: tem sido relatado que, especialmente CAT e SOD, duas principais enzimas antioxidantes, são afetadas pelo cádmio(ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001).

Portanto, os efeitos tóxicos induzidos pela contaminação por cádmio podem promover alterações nos níveis de tióis não protéicos, aumentar a peroxidação de lipídios e alterar enzimas antioxidantes como a catalase, gerando um quadro de estresse oxidativo.

Stohs et al.(2001) observaram em ratos que a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo cádmio pode contribuir para sua toxicidade, resultando em danos a membranas biológicas, ao DNA e apoptose, indicando que a toxicidade e carcinogênese do cádmio envolve os sistemas de estresse oxidativo e eventos associados com sinalização celular e regulação.

O decréscimo na atividade e/ou níveis de antioxidantes como a catalase, causadas por cádmio, juntamente com a geração de radicais que são produzidos durante o metabolismo normal, pode explicar o aumento na peroxidação lipídica e danos no DNA das células(WAISBERG et al., 2003).Em consequência do aumento na produção de radicais livres induzido por cádmio, pode ocorrer alteração na regulação de alguns genes, o que pode provocar uma produção alterada de muitas proteínas (WAISBERG et al., 2003).

Portanto, o que se espera de um quadro de estresse oxidativo induzido por cádmio são alterações nos níveis de glutathione, aumento da peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas e alterações nos níveis da enzima antioxidante catalase. As alterações morfológicas encontradas em organismos contaminados pelo cádmio podem ter relação com as alterações que ocorrem em função do estresse oxidativo induzido por esse metal.

Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros morfológicos e de estresse oxidativo induzido por cádmio em embriões de ave para melhor elucidar os mecanismos envolvidos com sua toxicidade.

## 2. OBJETIVOS

### *Objetivo geral*

Avaliar, em embriões de *Gallusgallus* com 3 e 7 dias de desenvolvimento, efeitos morfológicos e bioquímicos da exposição ao cádmio em duas concentrações (5 $\mu$ M e 50 $\mu$ M).

### *Objetivos específicos*

- Avaliar qual o melhor local para a injeção do contaminante para embriões com 7 dias de desenvolvimento.

- Avaliar a letalidade em embriões expostos às diferentes concentrações do contaminante, comparando-a ao grupo controle.

- Avaliar, através de análises anátomo-morfológicas, os efeitos da exposição do cádmio nas concentrações 5 e 50 $\mu$ M, em embriões de ave com 3 e 7 dias de incubação.

- Adaptar protocolos bioquímicos para embriões de ave contaminados com cádmio, para realizar diferentes análises relacionadas com estresse oxidativo induzido pelo metal.

- Avaliar a concentração de glutatona e outros tióis proteicos através de análises bioquímicas em embriões expostos, comparando-os com o grupo controle.

- Avaliar possíveis danos em macromoléculas causados pela exposição dos embriões ao cádmio através do ensaio de peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO).

- Avaliar a atividade da enzima catalase em embriões expostos, comparando-a com o grupo controle.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos utilizando animais no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná.

#### *Obtenção dos ovos e seleção*

Ovos fertilizados de *Gallus gallus* foram fornecidos por empresa especializada. A higienização externa dos mesmos foi realizada com papel toalha levemente umedecido com etanol 70%. Apenas ovos com a casca íntegra foram selecionados e numerados com lápis preto na casca para identificá-los de acordo com os grupos (Figura 2). Ovos que apresentaram rachaduras ou que estavam quebrados não foram utilizados no estudo.



Figura 2. Identificação dos ovos

#### *Determinação dos tempos de incubação*

Os tempos de incubação escolhidos neste trabalho foram 3 e 7 dias. Os embriões com 3 dias de incubação estão bem no início do desenvolvimento. Nesse estágio (Figura 3A-B), que corresponde ao estágio 19 e 20 de acordo com Hamburger e Hamilton (1951), estão sendo formadas estruturas essenciais, como membros e órgãos. Além disso, ainda não passaram pelo primeiro período crítico de desenvolvimento que ocorre no 4º dia de incubação (DEWITT; MEYER; HENSHEL, 2005). Já embriões com 7 dias de incubação (correspondente ao estágio 31 HH) são

maiores e desenvolvidos, sendo mais fácil a observação de estruturas, estadiamento e melhor capacidade de se avaliar a progressão de malformações (Figura 3C).

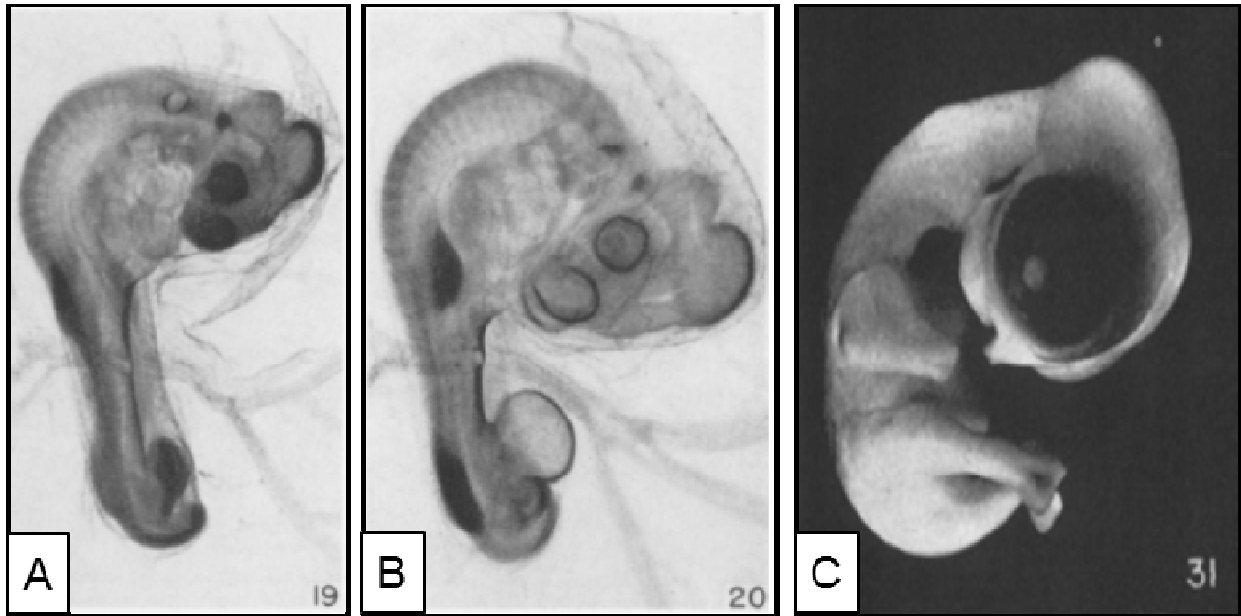


Figura 3. Embrião com três dias, **A)**estádio 19 e **B)** estágio 20; **C)** Embrião com 7 dias, estágio 31 (Fonte: Hamburger e Hamilton, 1951)

#### *Determinação do local da injeção do contaminante*

Trabalho anterior em nosso laboratório mostrou que o melhor local para uma rápida dispersão do contaminante sobre o embrião de 3 dias ocorria quando injetado na câmara de ar (YAMAMOTO et al., 2012). Porém não havia dados para embriões de 7 dias. Em função disso, ovos foram injetados com 100  $\mu$ L do corante vital Azul de Tripán em dois locais diferentes: na câmara de ar e no albúmen (Figura 4A), para confirmação do melhor local para a injeção do contaminante em embriões de 7 dias. Ainda, para confirmar os dados anteriores, os ovos foram incubados durante três e sete dias e, então, abertos para verificação da dispersão do corante.

Como os ovos injetados na câmara de ar mostraram melhor resultado para embriões de 3 e 7 dias (Figura 4B-C), foram inoculados neste local 100  $\mu$ L de solução correspondente a cada grupo.

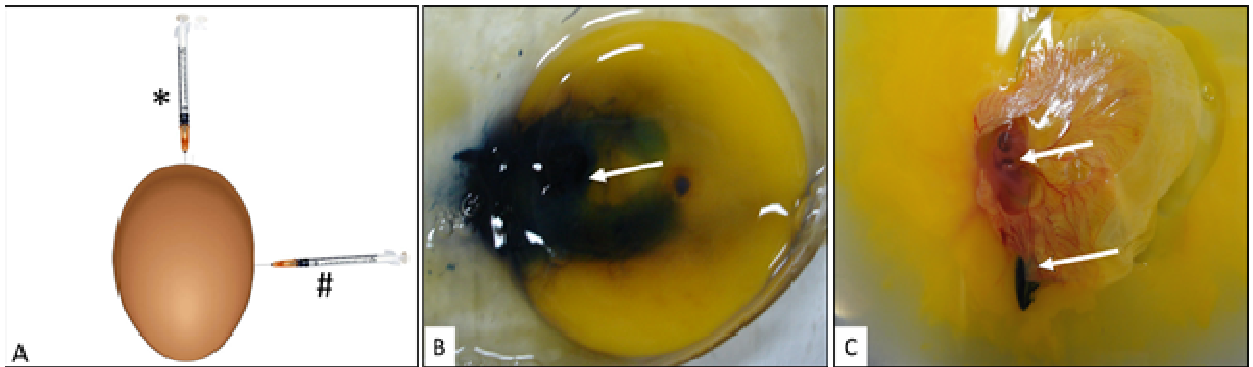


Figura 4: **A)** Locais de injeção do corante Azul de Tripan: \* Câmara de ar ou # Albúmen; **B)** Dispersão do corante Azul de Tripan (setas) injetado na câmara de ar em embriões incubados por 3 dias; **C)** e por 7 dias.

### *Desenho experimental*

Os ovos foram separados em 3 grupos: (1) GRUPO CONTROLE: ovos injetados com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x), que foi o tampão utilizado como diluente do contaminante; (2) GRUPO CONTAMINADO I: ovos injetados com 100  $\mu$ l de solução de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) na concentração de 5  $\mu\text{M}$ ; e (3) GRUPO CONTAMINADO II: ovos injetados com 100  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Essas concentrações foram determinadas por trabalhos anteriores em nosso laboratório, que demonstraram ser capazes de alterar o desenvolvimento do embrião.

Foram utilizados números variáveis de ovos por experimento e por grupo injetado. Sendo realizados cinco experimentos para as análises morfológicas e dez para as análises bioquímicas.

Considerando que a massa média de um ovo de *Gallusgallus* é 60 g, as concentrações finais da contaminação com  $\text{CdCl}_2$  nos embriões foram de aproximadamente 0,008  $\mu\text{M}$  no grupo contaminado com  $\text{CdCl}_2$  a 5  $\mu\text{M}$  e 0,08  $\mu\text{M}$  no grupo contaminado com  $\text{CdCl}_2$  a 50  $\mu\text{M}$ , considerando uma dispersão completa do cádmio por todo volume do ovo.

Para a administração da dose foi usada uma agulha grossa (tamanho 25x7) para perfurar a casca do ovo e, assim, facilitar a posterior entrada da agulha de insulina, que é utilizada para injetar as soluções e é mais fina. Para diminuir uma possível contaminação, a agulha grossa foi flambada antes de cada perfuração e os

materiais utilizados na injeção do contaminante nos ovos foram esterilizados no fluxo laminar, através da exposição à luz ultravioleta, durante 20 minutos.

Após a injeção das soluções, o orifício foi selado com fita adesiva (Figura 5 A) e os ovos incubados (temperatura de  $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 65 a 75%), durante três ou sete dias (Figura 5 B).

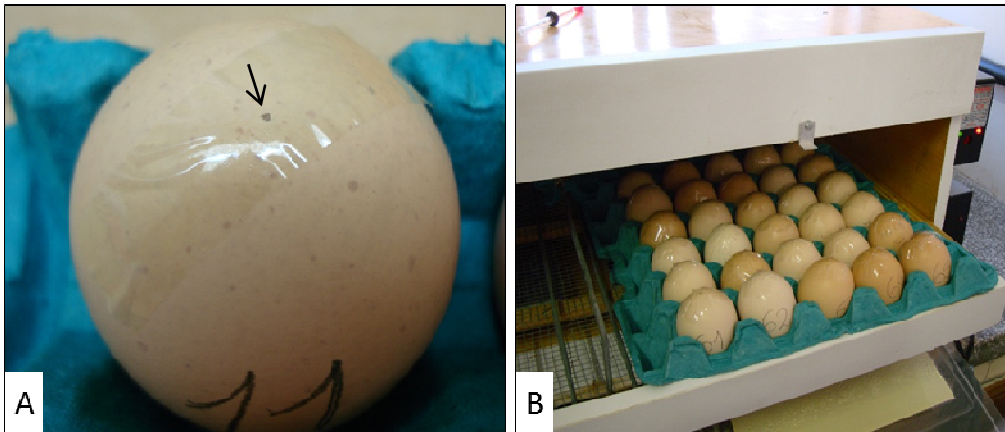


Figura 5: **A)** Orifício na região da câmara de ar (seta) selado com fita adesiva transparente; **B)** Ovos incubados com temperatura e umidade controladas.

### 3.1 EMBRIÕES COM 3 DIAS DE DESENVOLVIMENTO

#### *Coleta*

Depois de incubados por três dias em temperatura e umidade controladas, os ovos foram abertos por completo e com cuidado, sendo observado se o embrião estava vivo (com o coração batendo), morto ou se não havia ocorrido o desenvolvimento embrionário (ausência de disco embrionário). Apenas embriões considerados vivos foram coletados. Utilizando tesoura e pinça de ponta fina, o disco embrionário foi recortado e transportado com o auxílio de um pincel para uma placa de Petri contendo PBS para a remoção do excesso de vitelo(Figura 6).

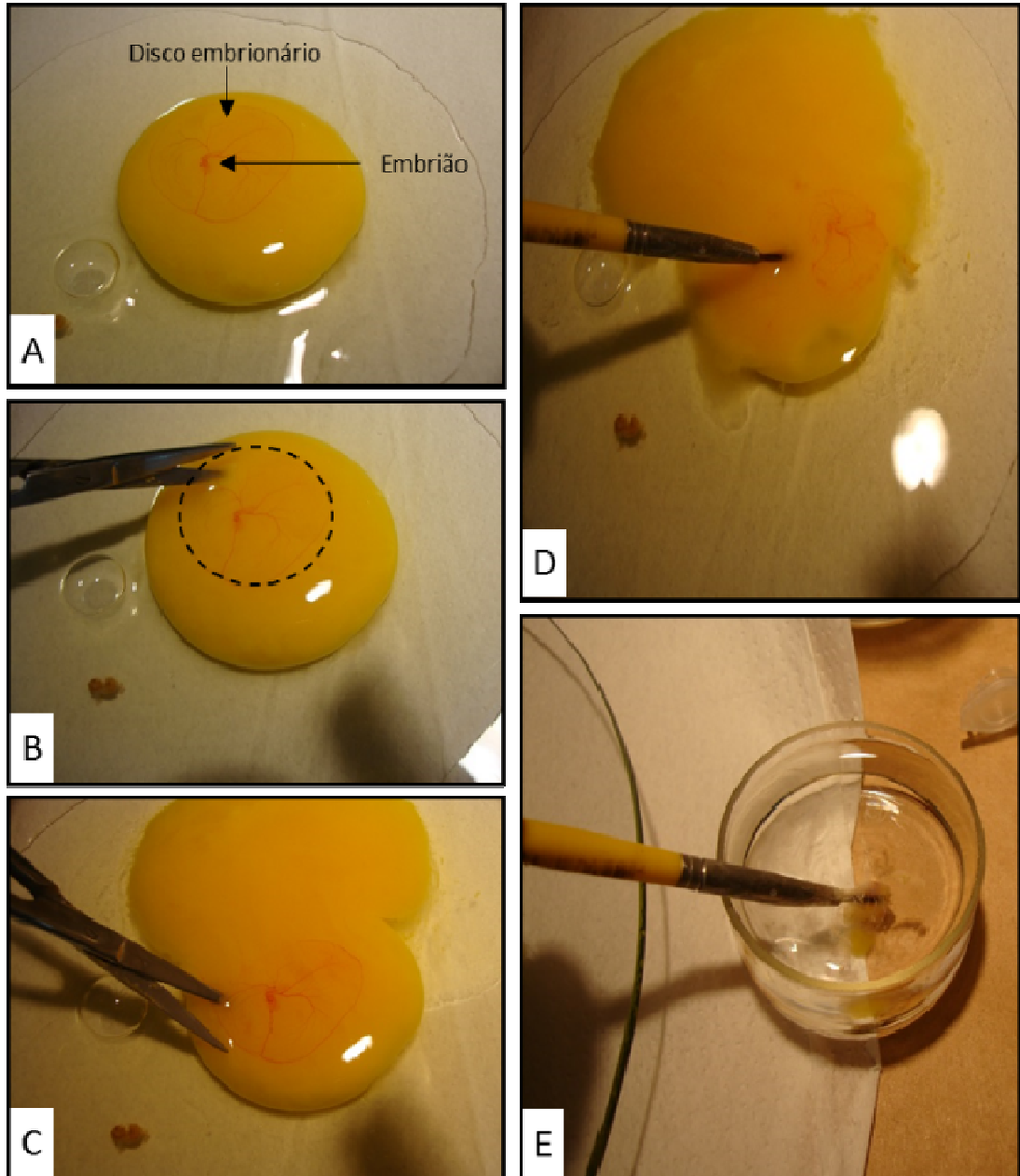


Figura 6. Coleta de embrião com três dias de desenvolvimento: **A)** Embrião vivo; **B e C)** Recorte do disco embrionário; **D eE)** Transferência do embrião para uma placa de Petri contendo PBS, com o auxílio de um pincel.

#### *Análise morfológica: Montagem total*

Para a análise morfológica foi realizada a técnica de montagem total (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Para isso, um recorte retangular em papel filtro com um losango vazado no centro foi colocado sobre cada embrião para mantê-lo distendido. Em seguida, os embriões foram fixados em Carnoy por 48 h, a temperatura ambiente, em uma placa de Petri com tampa. Depois foram lavados em água destilada e colocados em etanol 70%, onde permaneceram por alguns dias.

Para a coloração, os embriões foram hidratados em água destilada por 10 min e imersos no corante Carmalúmen de Mayer por 72 h. Após a coloração, foram desidratados em série alcoólica crescente (etanol a 70%, 80%, 95%, 100% I e 100% II; 10 minutos em cada banho) e, em seguida, diafanizados em dois banhos consecutivos de xilol, por 10 min cada. Para a montagem das lâminas permanentes foi utilizada a resina Permount®. Após a confecção das lâminas (Figura 7), as análises e registro fotográfico foram realizados sob estereomicroscópio.



Figura 7. Lâminas permanentes para análises de embriões com 3 dias, fixados, corados e montados com Permount®.

### *Preparo dos embriões para análises bioquímicas*

Após a coleta e retirada do excesso de vitelo em PBS, os embriões foram mantidos em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a homogeneização, o material foi descongelado, os embriões separados em um *pool* de três indivíduos e homogeneizados com o auxílio de um homogenizador, em  $400\mu\text{L}$  de PBS gelado. O homogenato foi centrifugado a  $12.000\text{ g}$ , durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até as posteriores análises bioquímicas.

## **3.2 EMBRIÕES COM SETE DIAS DE DESENVOLVIMENTO**

### *Coleta*

Após 7 dias de incubação, os ovos foram abertos completamente e com cuidado, sendo observado se o desenvolvimento havia ocorrido e se o embrião estava vivo ou morto. Quando vivos, com o auxílio de uma tesoura, os embriões

foram separados de suas membranas extraembrionárias e com uma pinça de ponta curva foram transferidos para placa de Petri contendo PBS, para serem lavados algumas vezes (Figura 8).

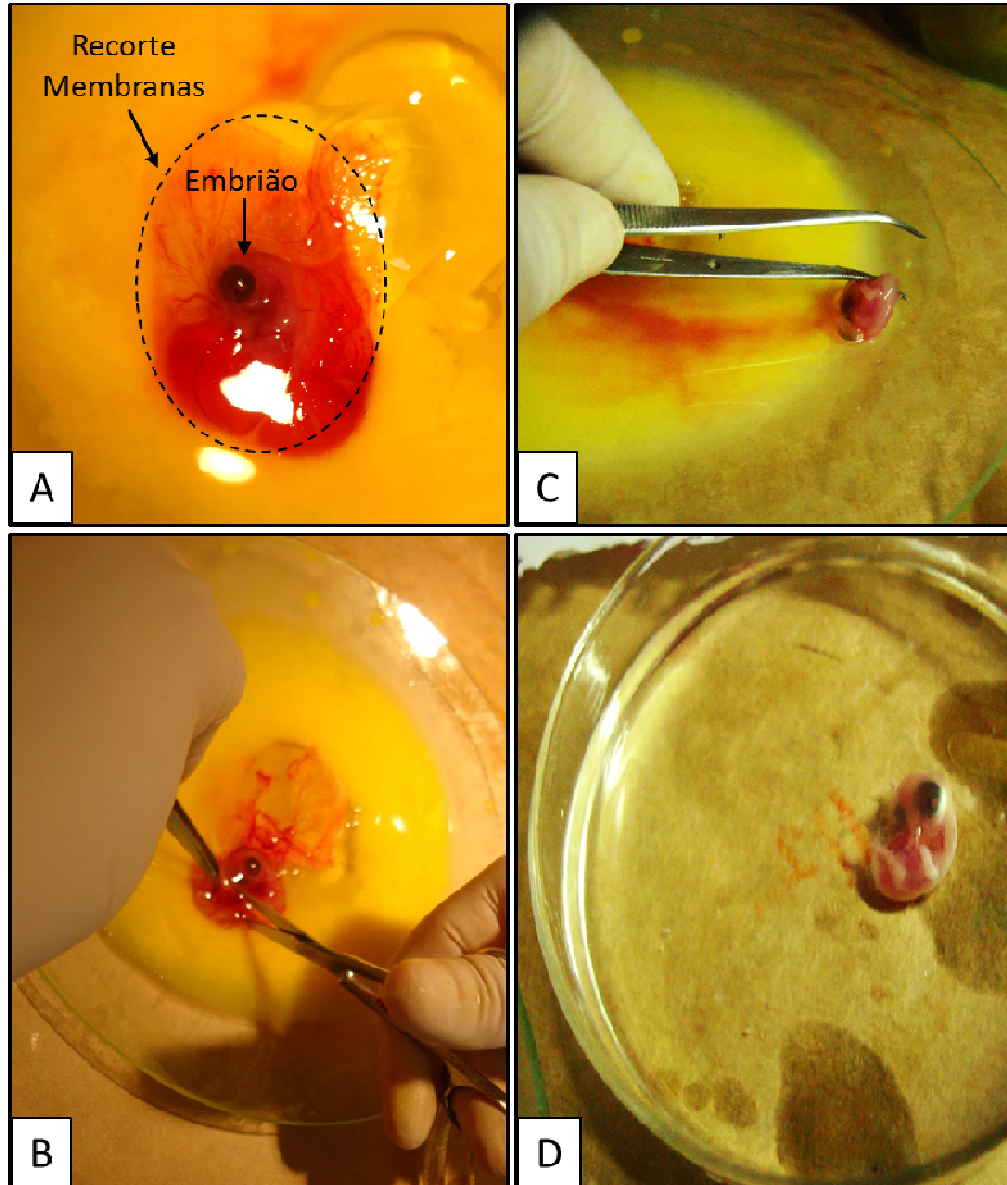


Figura 8. Coleta de embrião com sete dias de desenvolvimento: **A)** Embrião vivo; **B)** Recorte das membranas extraembrionárias; **C e D)** Transferência do embrião para uma placa de Petri contendo PBS, com o auxílio de uma pinça de ponta curva.

#### *Análise anatômica*

Os embriões coletados e lavados foram fotografados e depois transferidos para recipientes individuais contendo a solução fixadora Alfac, onde permaneceram por 48 horas. Foram, então, lavados com água destilada por três vezes e

armazenados em etanol 70%, para as posteriores análises em estereomicroscópio e registro fotográfico.

#### *Preparo dos embriões para análises bioquímicas*

Após a coleta e lavagem dos embriões em PBS 1x, estes foram colocados individualmente em tubos de centrífuga de 2 ml e mantidos em freezer -80°C. Os embriões foram descongelados e homogeneizados em 1 ml de PBS gelado. Após centrifugado a 12.000 g, durante 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer -80 °C até as posteriores análises bioquímicas

#### *Determinação do estágio embrionário*

O estágio de desenvolvimento em que os embriões se encontravam foi determinado de acordo com Hamburger e Hamilton (1951).

### **3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

#### *Determinação de concentração proteica total*

Para normalização da quantidade de material biológico empregada em cada um dos ensaios bioquímicos realizados foi necessário primeiramente obter os valores da concentração de proteínas presentes no sobrenadante de cada amostra. Para esse fim, foi utilizado o método de Bradford (1976). Esse método baseia-se na ligação do corante BG-250 com proteína, sendo que essa interação provoca um deslocamento do comprimento de onda de absorção do corante.

Para quantificar a concentração de proteínas, 10 µL de cada amostra (PBS para o branco) foram pipetados em duplicata em uma microplaca com 96 poços, seguido de 250 µL do reativo de Bradford. Após 5-10 min foi medida a absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi calculada pela equação da reta a partir dos valores encontrados na absorbância e comparados com os valores da curva-padrão de soro de albumina bovina - BSA (0; 0,125; 0,250; 0,500; 1 mg de BSA.ml<sup>-1</sup>).

#### *Concentração de tióis não proteicos (glutathiona e outros tióis)*

O método utilizado foi baseado no trabalho de Sedlak e Lindsay (1968) e essa análise foi realizada com embriões 7 dias. Esse método baseia-se na precipitação

de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o DTNB gerando um produto que pode ser mensurado em espectrofotômetro.

Em 200µL de amostras congeladas da solução homogeneizada de embriões com sete dias de desenvolvimento foi adicionado 50 µL de ácido tricloracético 50%; para o branco foi utilizado 200 µL de PBS. Esse material foi centrifugado a 5.000 g por 10 min a 4°C e pipetado em duplicata na placa de 96 poços: 50 µL de branco, curva-padrão e amostras. Em seguida foi adicionado a todos os poços 230 µL de tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9 e, então, 20 µL de DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM. Após 5 min, a absorbância foi medida a 415 nm.

A análise dos dados foi realizada primeiramente com o cálculo da equação da reta a partir dos valores de absorbância da curva-padrão de GSH. A concentração de tióis foi expressa em nanomoles de tióis x mg de proteínas<sup>-1</sup>.

#### *Carbonilação de proteínas*

O método utilizado foi baseado no trabalho de Levine, Williams e Stadtman (1991). Foram analisados embriões com 7 dias. A carbonilação de proteínas pode ocorrer em função de estresse oxidativo, promovendo dano. A 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) reage com proteínas carboniladas formando um complexo que podem ser detectado a 358-370 nm.

Para utilizar esse método, foi necessário realizar a normalização das amostras com sete dias de desenvolvimento para a concentração de 2 mg.ml<sup>-1</sup> de proteína em PBS. Após normalização, 200 µL das amostras de embriões com sete dias de desenvolvimento foram misturadas a 500µL de meio de reação (2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) a 10 Mm em HCl 2M). Para o branco, esta solução foi substituída por HCl 2M somente. Após incubação a 35°C por 90 min, os tubos com o material foram colocados em gelo, adicionou-se ácido tricloracético a 28% (700 µL), misturou-se com o auxílio de vórtex e o material foi centrifugado a 9.000 g, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1 ml de etanol-acetato de etila (1:1), centrifugado novamente com a mesma velocidade e tempo. Esses últimos passos foram repetidos três vezes. O material, então, foi ressuspendido em 500 µL de hidrocloreto de guanidina 6 M e pipetado 200 µL do sobrenadante de cada amostra em duplicata na placa de 96 poços. A absorbância foi medida em 358 nm. Para o cálculo da concentração de carbonilas foi empregada o coeficiente de extinção molar para as hidrazonas =  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{A}$

concentração de carbonilas foi expressa em micromoles de carbonilas x mg de proteína<sup>-1</sup>.

### *Peroxidação lipídica*

O método utilizado foi baseado no método FOX (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992), que é um método simples e sensível para a determinação de peróxidos lipídicos. Essa análise foi realizada com embriões com 3 e 7 dias. O método baseia-se no princípio da rápida oxidação de Fe<sup>2+</sup> para Fe<sup>3+</sup> mediada por peróxidos em condições ácidas. Na presença do estabilizador hidroxitoluenobutilado, o laranja de xilenol forma um complexo com Fe<sup>3+</sup>, que pode ser mensurado em espectrofotômetro.

Nas amostras de embriões com três e sete dias de desenvolvimento ainda congeladas (200 µL), 800µL de meio de reação (Laranja de xilenol a 100 µM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 25 mM, Hidroxitoluenobutilado (BHT) a 4,0 mM e FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub>hexahidratado a 250 µM) foram adicionados. Para o branco, foi utilizado 200 µL de PBS. O material foi incubado durante 20 min à temperatura ambiente, centrifugado a 9000 g durante 10 min e então 200µL do sobrenadante foi pipetado em duplicata em placas de 96 poços para medida da absorbância a 560 nm. A concentração de hidroperóxidos foi calculada empregando o ε para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxido de cumeno ou butila de 4,3x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, sendo os resultados expressos em micromoles de hidroperóxidos x mg de proteína<sup>-1</sup>.

### *Catalase*

Para as análises da atividade da enzima catalase, o protocolo foi baseado em Aebi (1984). Foram feitos testes para essa análise em embriões com 3 e 7 dias. Para a padronização do protocolo para amostras de embriões de aves foram pipetados primeiramente 990 µL de meio de reação (Tampão Tris-HCl 50mM, EDTA 0,25 mM, pH 8,0; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 mM) em uma cubeta de quartzo, seguida de 10 µL de amostra. Esse material foi misturado por inversão e a absorbância foi medida imediatamente a 240 nm durante 1 min, com intervalos de leitura de 1 s. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de cubeta. Os testes para amostras de embriões com três dias de desenvolvimento foram realizados aumentando a quantidade de amostra e diminuindo a de tampão de reação, até chegar a 950 µL de meio de reação e 50 µL de amostras, não sendo detectada a atividade da enzima. Para

amostras de embriões com sete dias de desenvolvimento foi possível detectar atividade da enzima catalase utilizando 950  $\mu\text{L}$  de meio de reação e 50  $\mu\text{L}$  de amostras. Entretanto esse ensaio não foi realizado nesse trabalho para essas amostras de embriões com sete dias de desenvolvimento, devido ao número reduzido de alíquotas.

#### *Análises estatísticas*

Para o teste de mortalidade foi utilizado o teste de teste *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunn's multiple comparison test*.

Para as análises bioquímicas, foi utilizada ANOVA de uma via, teste *Dunnetts*, teste T e *testpower*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES ANÁTOMO-MORFOLÓGICAS

#### *Taxa de sobrevivência e ausência de embrião:*

Foram considerados ovos férteis aqueles que no momento da abertura continham embriões vivos (com o coração batendo) ou mortos. Não foi detectada diferença significativa na mortalidade dos embriões entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Ovos que apresentavam embriões vivos no momento da abertura, de acordo com o grupo e tempo de incubação (taxa de sobrevivência)

		PBS	CdCl <sub>2</sub> 5μM	CdCl <sub>2</sub> 50μM
3 dias	n°	11	15	26
	%	61,1%	41%	51%
7 dias	n°	21	22	33
	%	65,6%	53,7%	51,6%

Ovos em que não foi visualizado desenvolvimento do disco embrionário e/ou embrião foram considerados como sem embrião visível. O grupo contaminado com a menor concentração do cádmio apresentou maior número de ovos sem embrião visível em relação ao controle ( $p < 0,05$ ), conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Taxa de ovos que, no momento da abertura, não continha embrião. Os números entre parênteses são os totais analisados para cada grupo em cada dia.

		PBS	CdCl <sub>2</sub> 5μM	CdCl <sub>2</sub> 50μM
3 dias	% (n°)	28%* (25)	41,3%* (63)	34,6% (78)
7 dias	% (n°)	30,4%* (46)	50%* (82)	36,6% (101)

\* Os dados dos grupos PBS e CdCl<sub>2</sub> 5μM analisados entre os tempos de incubação demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação a ausência de embrião no momento da coleta.

#### *Embriões com três dias de desenvolvimento*

#### Estádios de desenvolvimento

Apenas embriões considerados vivos no momento da coleta foram analisados. Quarenta e sete embriões com 3 dias de incubação foram estadiados segundo Hamburger e Hamilton (1951) sendo observada a ocorrência de seis estádios

diferentes de desenvolvimento embrionário. Desses, os mais expressivos foram os estádios 17 e 18, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Estádios embrionários observados em embriões com três dias de desenvolvimento

Estádio (HH)	PBS	CdCl <sub>2</sub> 5µM	CdCl <sub>2</sub> 50µM
16	0%	4,3%	2,1%
<b>17</b>	<b>6,4%</b>	<b>19,1%</b>	<b>14,9%</b>
<b>18</b>	<b>6,4%</b>	<b>6,4%</b>	<b>14,9%</b>
19	6,4%	4,3%	2,1%
20	4,3%	2,1%	2,1%
21	0%	2,1%	2,1%

### Taxa de malformações

Verificou-se que embriões com três dias pertencentes ao grupo CONTAMINADO I (CdCl<sub>2</sub> 5µM) apresentaram maior incidência de malformações (44,44%), em relação aos indivíduos do grupo CONTAMINADO II (CdCl<sub>2</sub> 50µM) (11,1%). Já no grupo controle PBS foi observado uma taxa de alterações de 27,3% (Tabela 4).

Tabela 4. Incidência de embriões com três dias de desenvolvimento que apresentaram malformações. Porcentagem em relação ao total analisado por grupo.

	PBS	CdCl <sub>2</sub> 5µM	CdCl <sub>2</sub> 50µM
Embriões analisados	11	<b>18</b>	18
Embriões malformados	3	<b>8</b>	2
Malformados (%)	27,3%	<b>44,44%</b>	11,11%

As malformações mais frequentes encontradas nos embriões analisados com 3 dias de desenvolvimento foram falha no fechamento da parede do corpo e malformações cefálicas como alterações no telencéfalo, diencéfalo e mesencéfalo. Além disso, foram observadas anoftalmia (ausência de olhos), microftalmia (atrofia ocular) e malformações de arcos faríngeos. Todas as variações de malformações observadas em embriões com 3 dias estão ilustradas na Figura 9. Na Tabela 5 estão listadas todas as malformações observadas e a incidência de cada uma delas.

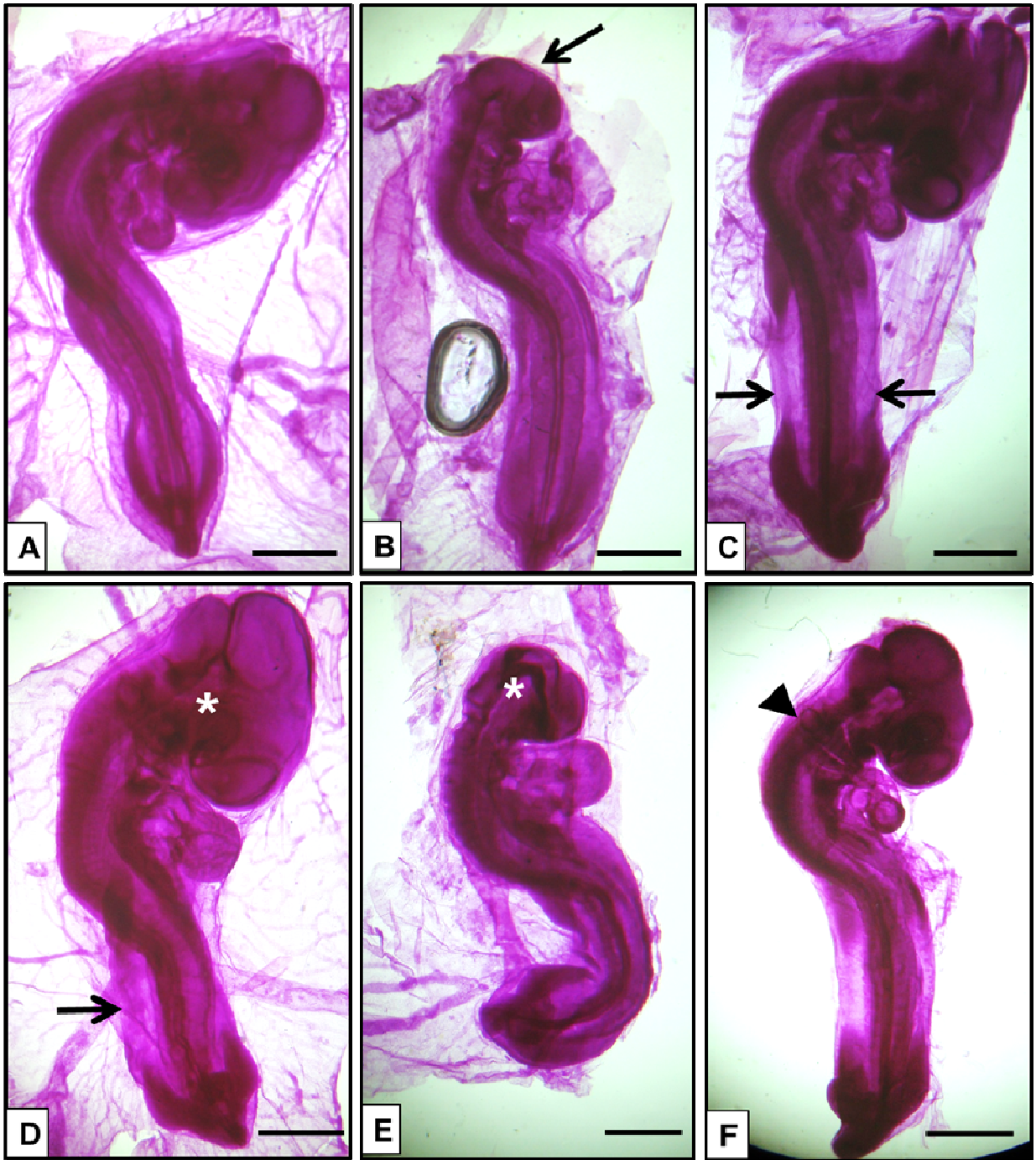


Figura 9 A: Embriões com 3 dias de incubação; **A.** Embrião controle, sem malformações observadas; **B.** Embrião com microcefalia (seta); **C.** Embrião com parede do corpo aberta (setas) **D.** Embrião apresentando microftalmia (\*) e parede do corpo aberta (seta); **E.** Embrião apresentando anoftalmia (\*) e curvatura inversa; **F.** Embrião apresentando arcos faríngeos malformados (ponta de seta). Barra = 1 mm.

Tabela 5. Todas as malformações observadas em embriões com três dias de desenvolvimento, expressas numericamente.

Alterações	PBS (11)		CdCl <sub>2</sub> 5µM (18)		CdCl <sub>2</sub> 50µM (18)	
	n°	%	n°	%	n°	%
<b>Parede do corpo aberta</b>	<b>2</b>	<b>11,8%</b>	<b>6</b>	<b>35,3%</b>	-	-
<b>Região cefálica alterada</b>	<b>1</b>	<b>5,9%</b>	<b>2</b>	<b>11,8%</b>	<b>2</b>	<b>11,8%</b>
Anoftalmia	-	-	-	-	1	5,9%
Microftalmia	-	-	1	5,9%	-	-
Malformações de arcos faríngeos	-	-	1	5,9%	-	-
Cabeça mais desenvolvida que o corpo	-	-	1	5,9%	-	-

%. Valor da porcentagem sobre todos os embriões analisados em cada grupo injetado.

### *Embriões com sete dias de desenvolvimento*

#### Estádios de desenvolvimento

A análise de 94 embriões com 7 dias de incubação demonstrou a ocorrência de cinco estádios de desenvolvimento diferentes. No grupo PBS, o principal estágio observado foi o 30 e para o grupo CdCl<sub>2</sub> 5 e 50µM foram, respectivamente, os estádios 28 e 31-31/32, conforme tabela 6.

Tabela 6. Estádios embrionários dos embriões com 7 dias de incubação

Estádio	PBS	CdCl <sub>2</sub> 5µM	CdCl <sub>2</sub> 50µM	
Indeterminado				
*	1,3%	5,1%	6,4%	
28	2,6%	<b>10,3%</b>	5,1%	
29	1,3%	6,4%	5,1%	
30	<b>6,4%</b>	7,7%	6,4%	
31	3,8%	7,7%	<b>9%</b>	
*	31/32	3,8%	<b>9%</b>	Embriões onde

não foi possível determinar o estágio de desenvolvimento em que se encontravam, devido ao grande número de malformações.

#### Frequência de malformações

Dos embriões de 7 dias analisados, no grupo contaminado na menor dose (CdCl<sub>2</sub> 5µM) foi observado maior número de embriões malformados (77,4%) do que no grupo contaminado na maior dose (CdCl<sub>2</sub> 50µM) (71%), conforme Tabela 7. O

grupo de embriões controle foi o que apresentou menos frequência de malformações (46,7%).

Tabela 7. Incidência de embriões com sete dias de desenvolvimento em que foram observadas malformações.

	PBS	CdCl <sub>2</sub> 5µM	CdCl <sub>2</sub> 50µM
Embriões analisados	15	<b>31</b>	31
Embriões malformados	7	<b>24</b>	22
Malformados (%)	46,7%	<b>77,4%</b>	71%

As malformações mais frequentes encontradas nos embriões incubados por 7 dias foram gastrosquise (falha no fechamento da parede do corpo), malformações na região cefálica e anoftalmia (ausência de olhos), que foi observada tanto unilateral ou bilateral. Também foi observado malformação na região caudal, curvatura corporal alterada, amelia (ausência de membros), hipopigmentação da retina, meromielia (asa atrofiada), hemorragia, microftalmia e também embriões totalmente alterados, apresentando malformação generalizada. As malformações observadas em embriões com 7 dias de desenvolvimento estão expressas numericamente na Tabela 8, e ilustradas nas Figuras 10 e 11.

Tabela 8. Todas as malformações observadas em embriões com sete dias de desenvolvimento, expressas numericamente.

Alterações	PBS (15)		CdCl <sub>2</sub> 5µM (31)		CdCl <sub>2</sub> 50µM (31)	
	n°	%	n°	%	n°	%
<b>Gastrosquise</b>	<b>5</b>	<b>5,1</b>	<b>7</b>	<b>17,2</b>	<b>5</b>	<b>15,2</b>
<b>Região cefálica alterada</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>7,1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Anoftalmia	-	-	3	3	4	4
Região caudal malformada	-	-	3	3	5	5,1
Curvatura corporal alterada	-	-	2	2	2	2
Amelia (pernas)	1	1	-	-	2	2
Hipopigmentação da retina	-	-	1	1	2	2

Amelia (asa)	1	1	-	-	1	1
Meromielia(asa)	-	-	2	2	-	-
Hemorragia	-	-	1	1	1	1
Microftalmia	-	-	-	-	1	1
Malformações gerais	-	-	1	1	-	-

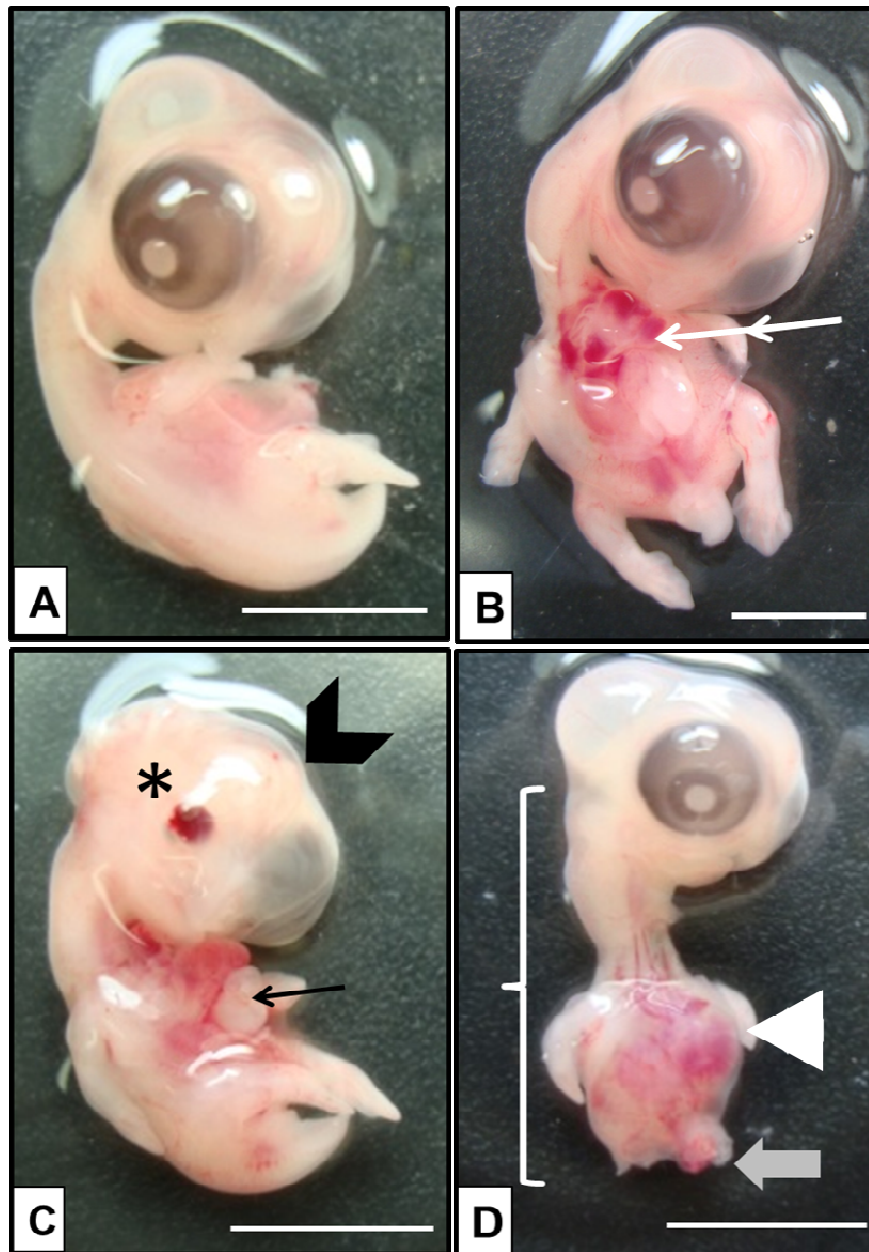


Figura 10. Embriões com 7 dias de desenvolvimento **A.** Embrião controle, sem malformações observadas; **B.** Embrião apresentando gastrosquise (seta); **C.** anoftalmia unilateral (\*), alterações cefálicas (ponta de seta) e gastrosquise (seta) **D.** Embrião apresentando região caudal malformada (seta maior), curvatura corporal alterada (chaves) e meromielia (ponta de seta). Barra = 1 cm

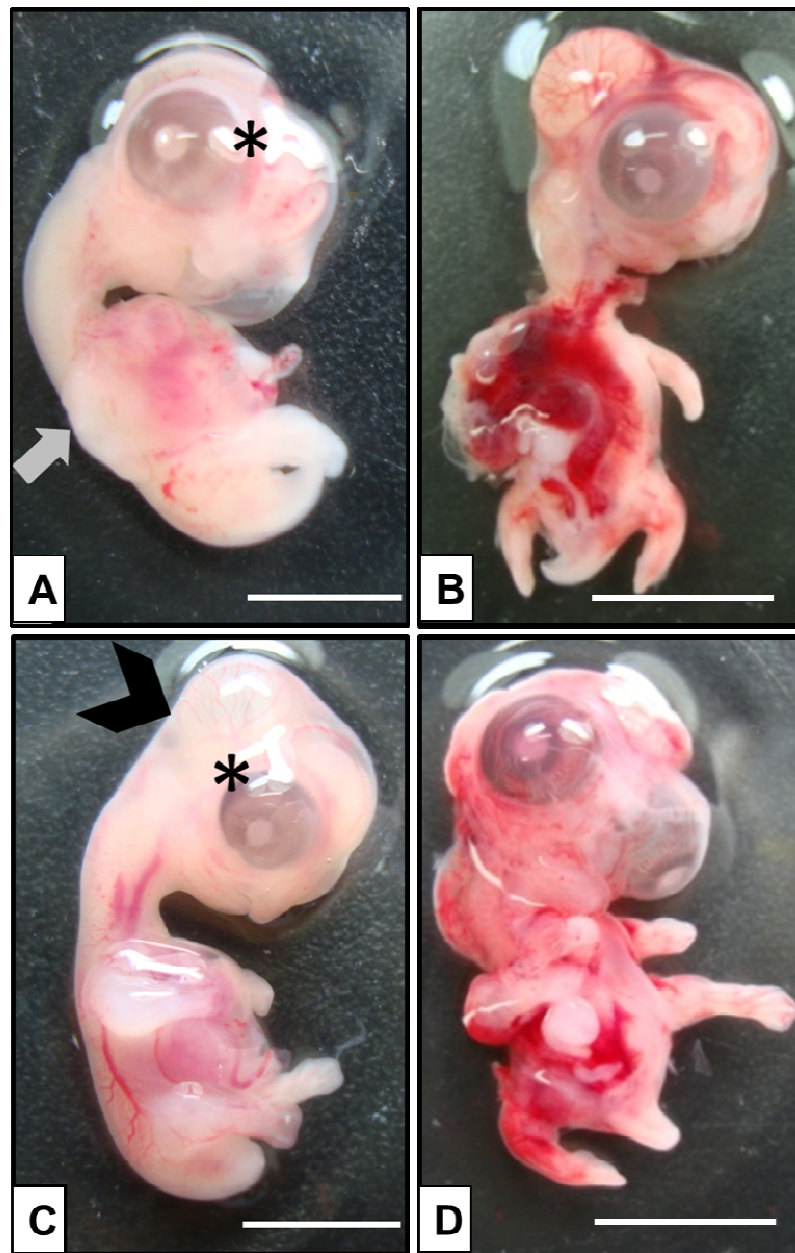


Figura 11. **A.** Embrião apresentando hipopigmentação da retina (\*) e amelia (asa) (seta); **B.** Embrião apresentando hemorragia; **C.** Microftalmia (\*) e alterações cefálicas (ponta de seta); **D.** Embrião com malformações generalizadas e hemorragia. Barra = 1 cm.

#### *Principais resultados obtidos através das análises anátomo-morfológicas*

Na tabela 9 é possível observar quais grupos obtiveram valores mais expressivos para as diferentes análises com embriões de 3 e 7 dias de desenvolvimento (Tabela 9).

Tabela 9) Síntese dos resultados obtidos, dando ênfase apenas para o grupo que apresentou valores mais expressivos das análises nos diferentes tempos

		Maior mortalidade	Maior frequência de malformações	Principais malformações
3 dias	CdCl <sub>2</sub> 5 µM	X	X	Parede do corpo aberta e alterações cefálicas
	CdCl <sub>2</sub> a 50 µM			
7 dias	CdCl <sub>2</sub> 5 µM		X	Gastrosquise e alterações cefálicas
	CdCl <sub>2</sub> a 50 µM	X		

## 4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### Concentração de tióis não proteicos (glutathiona (GSH) e outros tióis)

Os resultados da análise estatística realizada através de *Oneway Anova* juntamente com o método *Dunnett's* para comparar com o grupo controle, indicam que não há diferença significativa ( $p=0,2953$ ) entre os níveis de GSH encontrados em embriões com sete dias de desenvolvimento levando em consideração todos os grupos (Figura 12).

Foi realizado ainda a análise de poder estatístico (*statistical power*), que indicou que o "n" necessário por grupo, para os valores terem diferenças estatisticamente significativas, é de 125,14 embriões, sendo que para essa análise foram utilizados 12 embriões do grupo PBS, 19 do grupo contaminado na menor concentração e 20 do grupo contaminado na maior concentração.

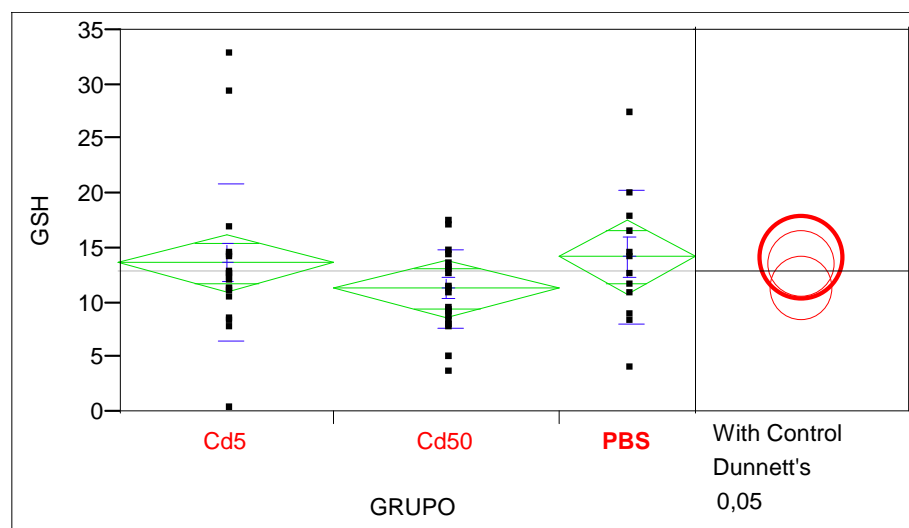


Figura 12: Análise estatística da comparação dos níveis de GSH em embriões de galinha com sete dias de desenvolvimento. Cada losango verde representa um dos grupos injetados e o desvio padrão dos valores encontrados; a linha verde central dos losangos representa a média dos valores; os

outros pontos representam valores fora da variação. Cada círculo indica cada um dos grupos, a sobreposição desses indica que não há diferença significativa entre esses, porém a não sobreposição representa diferença significativa. O círculo com linha mais grossa representa o grupo controle.

### *Carbonilação de proteínas (PCO)*

Com os resultados das análises estatísticas para a análise de carbonilação de proteínas em embriões com 7 dias de desenvolvimento pode-se observar que existe diferença significativa entre o grupo controle e o grupo contaminado com a menor concentração ( $\text{CdCl}_2$  a  $5\mu\text{M}$ ), onde  $p=0,0133$ . Porém não existe diferença significativa entre o grupo contaminado na maior concentração (Figura 13).

A análise do poder estatístico ainda indica que o número de embriões necessários para mostrar diferença significativa seria de 34 embriões por grupo contaminado. Para essa análise, foram utilizados 12 embriões do grupo PBS, 19 do grupo contaminado na menor concentração e 18 do grupo contaminado na maior concentração.

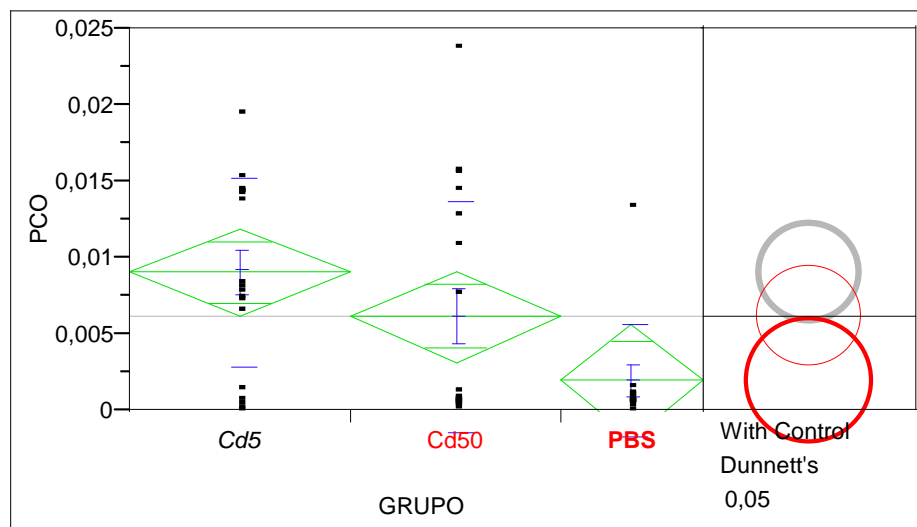


Figura 13: Análise estatística da comparação dos níveis de PCO em embriões de galinha com sete dias de desenvolvimento. Cada losango verde representa um dos grupos injetados e o desvio padrão dos valores encontrados; a linha verde central dos losangos representa a média dos valores; os outros pontos representam valores fora da variação. Cada círculo indica cada um dos grupos, a sobreposição desses indica que não há diferença significativa entre esses, porém a não sobreposição representa diferença significativa. O círculo com linha mais grossa representa o grupo controle.

### *Peroxidação lipídica (LPO)*

Como para essa análise bioquímica foram utilizados embriões com três e sete dias de desenvolvimento, as análises estatísticas foram feitas separadamente (uma para 3 dias e outra para 7 dias) e uma comparação dos dois tempos de incubação (qual foi utilizado o teste T).

É possível observar na Figura 14 que a LPO em embriões com três dias de desenvolvimento é significativamente diferente nos grupos contaminados em relação ao grupo controle. No grupo controle os valores são maiores.

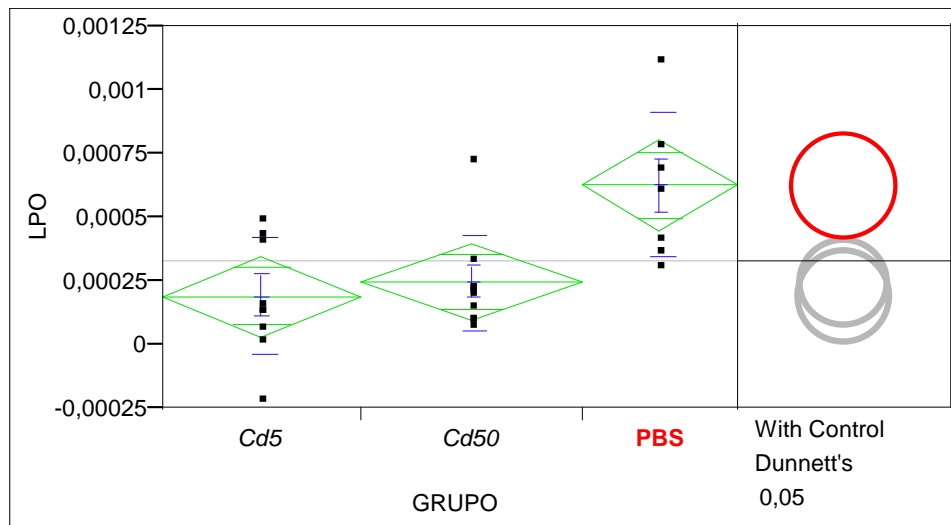


Figura 14: Análise estatística da comparação dos níveis de LPO em embriões de galinha com três dias de desenvolvimento. Cada losango verde representa um dos grupos injetados e o desvio padrão dos valores encontrados; a linha verde central dos losangos representa a média dos valores; os outros pontos representam valores fora da variação. Cada círculo indica cada um dos grupos, a sobreposição desses indica que não há diferença significativa entre esses, porém a não sobreposição representa diferença significativa. O círculo com linha mais grossa representa o grupo controle.

Com as análises estatísticas para embriões com 7 dias de desenvolvimento pode-se comprovar que existe diferença significativa entre os grupos contaminados com 5 $\mu$ M e 50 $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> ( $p=0,0056$ ). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos contaminados e o grupo controle PBS (Figura 15). A análise do poder estatístico indicou que o número de embriões necessário por grupo para existir diferença significativa deveria ser de 26,7 embriões. Para essa análise, foram utilizados 7 embriões do grupo PBS, 19 do grupo contaminado na menor concentração e 20 do grupo contaminado na maior concentração.

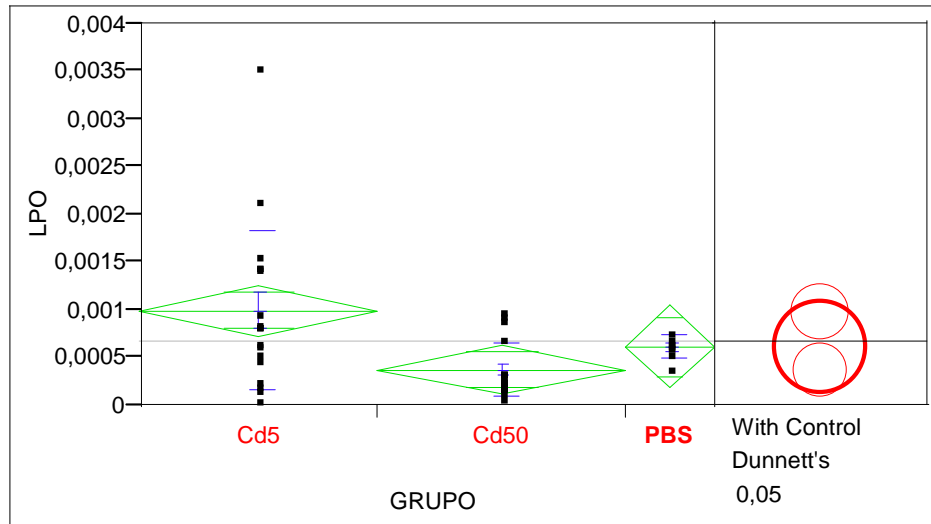


Figura 15: Análise estatística da comparação dos níveis de LPO em embriões de galinha com sete dias de desenvolvimento. Cada losango verde representa um dos grupos injetados e o desvio padrão dos valores encontrados; a linha verde central dos losangos representa a média dos valores; os outros pontos representam valores fora da variação. Cada círculo indica cada um dos grupos, a sobreposição desses indica que não há diferença significativa entre esses, porém a não sobreposição representa diferença significativa. O círculo com linha mais grossa representa o grupo controle.

A análise realizada comparando o tempo de incubação com a análise de LPO demonstra que a LPO aumenta de acordo com o tempo de incubação, já que os valores encontrados são estatisticamente diferentes ( $p=0,0115$ ), como observada na Figura 16. Para essa análise, foram comparados 26 embriões com 3 dias e 46 embriões com 7 dias.

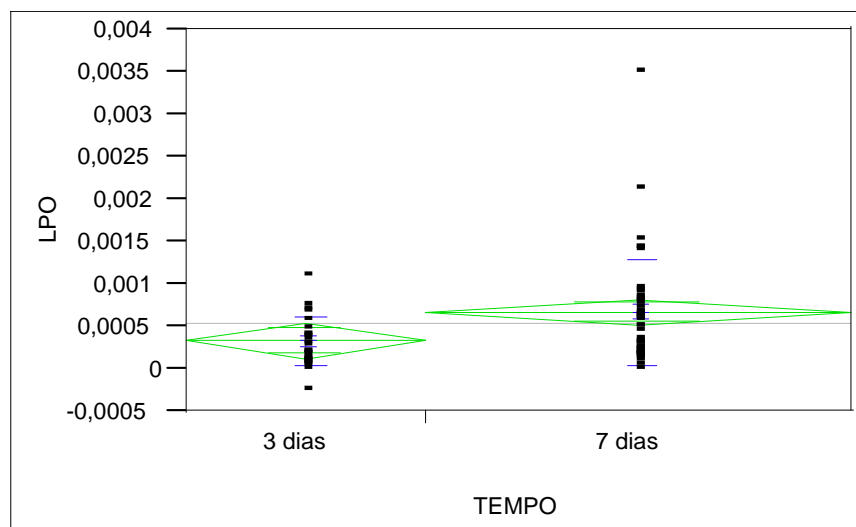


Figura 16: Análise estatística da comparação dos valores encontrados na análise de LPO em embriões por tempo de incubação. Cada losango verde representa os valores dentro do desvio padrão de cada um dos tempos de incubação.

### *Catalase*

A atividade da enzima catalase não pode ser mensurada para embriões com três dias de desenvolvimento pois o método utilizado atualmente em nosso laboratório não é sensível para captar sua atividade nessas amostras. Porém utilizando as amostras de embriões com sete dias de desenvolvimento foi possível observar a atividade da enzima.

### *Correlação*

A análise de comparação entre análises bioquímicas demonstrou que os valores encontrados na análise da LPO, quando comparados com os valores encontrados na análise da GSH, apresentam uma correlação de 86%. Ainda, quando comparados os valores encontrados para PCO com os valores da LPO, apresentam uma correlação de 77%. As outras análises de correlação não apresentaram valores tão demonstrativos quanto esses.

## 5. DISCUSSÃO

### *Locale momento da injeção do contaminante*

Nossos resultados mostram que o melhor local para a injeção do contaminante é a câmara de ar, em concordância com Yamamoto et al. (2012), que também demonstraram, para embriões com 2 e 3 dias de desenvolvimento, haver melhor dispersão do contaminante na câmara de ar.

Injetar o contaminante na câmara de ar antes da incubação (dia zero) melhora as chances do embrião entrar em contato com o contaminante desde o início do seu desenvolvimento.

Portanto, o método de injeção deste presente trabalho, na câmara de ar e no dia zero, é a melhor maneira para demonstrar os efeitos tóxicos do cádmio no embrião de ave pois simula uma exposição que poderia já ocorrer a partir do momento da oviposição.

Este fato também é relatado por Dewitt, Meyer e Henshel (2005), que observaram que injetar contaminantes no quarto dia de incubação diminui a mortalidade em comparação aos embriões injetados no dia zero (momento de início da incubação). Isso pode se dar pelo fato que no quarto dia de desenvolvimento os embriões já passaram pelo primeiro período crítico de desenvolvimento. Os autores ainda destacam que a injeção no dia zero melhor se assemelha a um caso de exposição ambiental, demonstrando ser esse o melhor método a ser utilizado em estudos de toxicologia.

Outros trabalhos utilizando embriões de ave, utilizam método diferente, injetando o contaminante após 60h de incubação e no embrião fora do ovo (cultura *ex ovo*) (THOMPSON et al., 2010).

### *Mortalidade, ausência de embrião no momento da coleta e malformações*

Nesse trabalho não foi observado aumento do efeito em função do aumento da concentração do contaminante, pois não houve diferença significativa entre a incidência da mortalidade dos embriões contaminados e a do grupo controle nos dois tempos de incubação. Thompson e Bannigan (2001) encontraram resultados diferentes, pois analisando embriões de ave com 60 h de incubação contaminados com acetato de cádmio (CdAc) a 0,089  $\mu\text{M}$  (valor próximo da maior concentração utilizada neste trabalho), observaram aumento da mortalidade e

anomalias até essa dose, e diminuição de anomalias com administração de doses maiores.

Com relação à ausência de embriões no momento da abertura dos ovos, foi observada diferença significativa em número entre o grupo controle PBS e o grupo contaminado com a menor concentração de Cd, demonstrando que a interrupção do desenvolvimento do embrião de ave nas primeiras horas aumenta quando expostos ao contaminante na menor concentração. As taxas de ausência de embriões não foram citadas em trabalhos utilizando embriões de ave contaminados com cádmio, como THOMPSON e BANNINGAN (2001, 2007, 2008), não sendo assim possível a comparação desse resultado.

Apesar dos dados de mortalidade não demonstrarem diferença significativa, houve maior frequência de malformações no grupo contaminado na menor concentração, seguido do grupo contaminado na maior concentração, em ambos os tempos.

Em embriões com 7 dias de incubação foram observadas mais variações de malformações quando comparadas às observadas nos embriões com 3 dias de incubação. Isto talvez ocorra pois embriões com 7 dias apresentam estruturas maiores e em maior número que embriões com 3 dias, facilitando a observação.

As principais malformações encontradas neste trabalho foram gastrosquise e alterações na região cefálica, embora ausência de estruturas essenciais, como olho(s) e membros também tenha sido observada. Yamamoto et al. (2012) observaram, tanto em embriões expostos ao cádmio por 48 quanto por 72 horas, alterações predominantemente na região cefálica. Em humanos adultos, a exposição de Cd promove danos no Sistema Nervoso Central (SNC), com sintomas incluindo dores de cabeça e tonturas, diminuição da visão, neuropatias periféricas, diminuição de equilíbrio e da capacidade de concentração (VIAENE et al., 2000).

Além do cádmio, outros metais podem induzir malformações em embriões de ave, como o chumbo (RIVERO, 2005), o metilmercúrio (CARVALHO, 2007), o acetato de cobre (STUPAK, 2010), e o cloreto de manganês (DEBIASI, 2011). Esses metais podem interferir nos mecanismos da morfogênese do cerebelo e no comportamento, diminuição do peso corporal, peso encefálico medular, alterações no fechamento da parede do corpo e na região cefálica, gerar falhas no desenvolvimento e alterações morfológicas.

Em geral, as malformações encontradas neste trabalho demonstram que a toxicidade do cádmio poderia desencadear dificuldades para realizar atividades necessárias para sua sobrevivência, como procura por alimento e locomoção. Desta forma, um embrião de ave contaminado por cádmio que, por ventura chegasse ao final de seu desenvolvimento embrionário e eclodisse do ovo, enfrentaria sério risco de sobreviver, aumentando ainda mais a incidência de mortalidade causada pela contaminação.

Neste trabalho foram utilizados embriões de ave com dois tempos de desenvolvimento, sendo possível analisar a progressão das malformações de três para sete dias. Por isso, é possível relacionar a falha no fechamento da parede do corpo encontrado em embriões com três dias com a gastrosquise em embriões com sete dias. Em humanos, defeitos na parede do corpo ocorrem em um a cada 20.000 nascidos vivos. Ao utilizar embriões de ave contaminados com acetato de cádmio, Thompson e Bannigan (2007) também observaram essa malformação, que foi considerada com característica consistente com a onfalocele humana. Uma das teorias para explicar a origem da gastrosquise em humanos, que também é uma falha no fechamento da parede do corpo, é a ocorrência de um efeito teratogênico precoce (GANDARA, 2002).

Como visto anteriormente, os estádios iniciais das aves podem ser comparados com o início do desenvolvimento de outras espécies, como o humano. Isso aumenta a importância desse modelo e dos efeitos teratogênicos encontrados nos embriões contaminados. Por ser possível essa comparação do desenvolvimento das aves com o humano até o 4º dia de incubação, podemos extrapolar que malformações encontradas em embriões com 3 dias de desenvolvimento contaminados com cádmio, poderiam ocorrer em embriões humanos até as primeiras semanas de gestação caso entrassem em contato com a mesma concentração utilizada neste trabalho.

Em estudos com humanos foi observado maior concentração de cádmio na placenta conforme o número de cigarros fumados. Foi observada também uma concentração de cádmio na placenta significativamente maior em mulheres fumantes quando comparadas com não fumantes (BUSH et al., 2000). Porém, o valor médio encontrado de cádmio no feto é 50% menor do que encontrado no sangue de mulheres fumantes, de acordo com LAUWERYS et al. (1978), indicando que a

placenta desempenha um papel de barreira para a passagem do cádmio, embora a correlação entre concentração de cádmio e feto seja estatisticamente significativa.

No caso das aves, os ovos podem ser expostos a diferentes contaminantes naturalmente no ambiente. Os contaminantes podem penetrar pela casca porosa dos ovos e interferir no desenvolvimento do embrião (VÁRNAGY, 1985 *apud* KERTÉSZ; HLUBIK, 2002). Além disso, a contaminação poderia ocorrer da mãe para o embrião, caso essa estivesse exposta a grandes concentrações e bioacumulasse o contaminante, que seria mobilizado de alguma forma até o ovócito ou ovo na época de reprodução, expondo, assim, o embrião ao contaminante.

#### *Estádios de desenvolvimento*

Apesar de ter sido encontrado diferentes estádios de desenvolvimento em embriões analisados com três e sete dias, não foi observado atraso no desenvolvimento dos embriões contaminados quando comparados aos grupos controle, assim como demonstrado por Yamamoto et al. (2012). Porém, esses dados não corroboram os relatados por Thompson et al. (2005), que indicam que o atraso no desenvolvimento embrionário dos embriões de galinha pode ocorrer como uma das consequências da exposição ao cádmio.

#### *Sistema antioxidante*

Apesar de não ter sido possível mensurar a atividade da enzima catalase para amostras de embriões com três dias de desenvolvimento em nossos ensaios, esta foi observada em amostras de embriões com sete dias de desenvolvimento. Isso pode ser um indício de que esse sistema antioxidante em embriões de ave está em processo de desenvolvimento em embriões com esses tempos. Desse modo, os embriões mais jovens apresentariam esse sistema antioxidante menos robusto que aqueles com mais dias de desenvolvimento, sendo, portanto, mais sensíveis a certos grupos de contaminantes para os quais as defesas celulares dependam da catalase.

Foi observada diferença significativa nos valores das análises de LPO, para os grupos controle e contaminados, nas amostras de embriões incubados por três dias. No grupo controle, a LPO é maior que os grupos contaminados. Isso poderia indicar um aumento das defesas celulares capaz de neutralizar hidroperóxidos lipídicos ou evitar a iniciação e propagação da peroxidação lipídica no grupo exposto

ao cádmio, ou simplesmente uma falha em processos geradores de peroxidação dos lipídios. Já em embriões com sete dias de desenvolvimento, não foi encontrado diferença significativa quando comparados o grupo controle e contaminados. Entretanto, a LPO aumenta significativamente em função do tempo, ou seja, é maior em embriões com 7 dias do que com 3 dias, para todos os grupos. Apesar de parecer que nos primeiros dias de desenvolvimento exista uma defesa contra a LPO induzida por cádmio, com sete dias de desenvolvimento, não há diferença entre os grupos. Por ter sido a única análise realizada com embriões com três e sete dias de desenvolvimento e por demonstrar dados ambíguos, outras análises bioquímicas devem ser realizadas. Além disso, as análises já realizadas com embriões com sete dias devem ser realizadas com os de três dias de desenvolvimento para melhor elucidar os efeitos tóxicos do cádmio neste modelo experimental. Em embriões de galinha contaminados com chumbo foi observado que os níveis de LPO diminuíram com a idade nos tecidos analisados, entretanto, também foi observado que ocorreu um acúmulo dose-dependente de chumbo, indicando que o chumbo pode ter a capacidade de induzir a peroxidação lipídica (SOMASHEKARAIHAH; PADMAJA; PRASAD, 1992).

THOMPSON et al. (2010) observaram que embriões de ave contaminados com cádmio após 60h de incubação apresentaram um aumento na LPO após a administração de cádmio. O estresse oxidativo induzido pelo cádmio ocorreu após 4 horas de exposição e, com esse tempo, as malformações se tornaram visíveis microscopicamente, indicando que esse mecanismo está envolvido com alterações histológicas. Porém, verificaram que o estresse oxidativo pode não estar diretamente relacionado com o desenvolvimento da malformação no fechamento da parede do corpo de embriões de ave.

As análises de GSH para embriões com sete dias de desenvolvimento indicam que o cádmio não induz a alteração de seus níveis, demonstrando que talvez esse não seja um sistema relacionado com a toxicidade do cádmio nas concentrações e tempo utilizados. Porém, no trabalho de Somashekaraiah, Padmaja e Prasad (1992) com embriões de galinha contaminados com chumbo, os níveis de GSH aumentaram em todos os tecidos analisados após 72h de exposição.

Com as análises de PCO para embriões com sete dias de desenvolvimento, pode-se observar que o cádmio promove danos a proteínas de embriões contaminados na menor concentração quando comparados ao grupo controle, já que

seus níveis são aumentados no grupo contaminado na menor concentração. Esse resultado é indicativo de que o Cd poderia estar causando efeitos tóxicos ao danificar proteínas, direta ou indiretamente, mas não os lipídios.

Ainda, foi observada uma alta correlação entre os valores encontrados na LPO quando comparados com os valores encontrados para a GSH e entre os valores encontrados na PCO com os valores da LPO. Isso pode demonstrar que esses sistemas atuam de maneiras parecidas ou até juntos, frente a uma contaminação por cádmio, nas concentrações e tempos utilizados nesse trabalho.

Os resultados observados por Surai, (1999) indicam que os diferentes tecidos do embrião exibem diferentes estratégias no que se refere à aquisição da capacidade de defesa antioxidante, durante o seu desenvolvimento. De acordo com a autora, o sistema antioxidante que o embrião de ave no dia zero apresenta são aqueles que estão acumulados na gema de ovo, que são resultado da transferência a partir da dieta materna. Com o início do desenvolvimento, o sistema antioxidante deverá ser desenvolvido com síntese endógena de enzimas como a catalase e de sistemas não enzimáticos como a glutatona. Isso irá desempenhar um papel importante na proteção do tecido contra a peroxidação lipídica, principalmente (SURAI; NOBLE; SPEAKE, 1996). Como neste trabalho foi analisado o sistema redox de embriões contaminados em seus estágios iniciais de desenvolvimento, observa-se que o sistema antioxidante do embrião de ave nos estágios iniciais ainda é imaturo. Provavelmente essa maturação ocorra após o nascimento, assim como ocorre em mamíferos, podendo alterar as respostas celulares em períodos críticos do desenvolvimento (FANTELLI, 1996 *apud* SURAI, 1999). Sendo assim, alguns sistemas podem aparecer alterados nos diferentes tempos analisados.

Durante o desenvolvimento do embrião deve haver um equilíbrio entre geração de radicais livres e a defesa antioxidante nos tecidos que é necessário para o desenvolvimento embrionário normal e viabilidade do nascimento da ave (SURAI, 1999). Portanto, foi observado que alguns desses sistemas são alterados pela contaminação ao cádmio, isso pode estar relacionado aos seus efeitos tóxicos no embrião de galinha, como a interrupção precoce do desenvolvimento do embrião e efeitos teratogênicos.

## 6. CONCLUSÃO

- A injeção do contaminante na câmara de ar antes da incubação simula um real caso de exposição ambiental, pois o contaminante entra em contato desde o início de desenvolvimento do embrião.

- Apesar de não induzir um aumento da mortalidade, o cádmio tem efeito na interrupção precoce do desenvolvimento do embrião no grupo contaminado na menor concentração ( $\text{CdCl}_2$  a  $5 \mu\text{M}$ ). Além disso, o cádmio tem efeito teratogênico sobre os embriões de ave já nos estádios iniciais do desenvolvimento (3 e 7 dias), causando malformações e, muitas vezes, ausência de estruturas essenciais para o correto desenvolvimento do embrião, como olhos e membros. Em embriões contaminados com  $\text{CdCl}_2$  a  $5 \mu\text{M}$  houve uma maior incidência de indivíduos malformados. Embriões incubados por 7 dias apresentaram mais variações de malformações em relação aos grupos incubados por 3 dias. As malformações mais frequentemente observadas em todos os grupos foram a gastrosquise e alterações na região cefálica.

- A análise da atividade enzimática da catalase demonstra que embriões com 3 dias de desenvolvimento apresentam um sistema de defesa antioxidante menos robusto do que aqueles com 7 dias. A LPO aumenta de acordo com o tempo de incubação. O cádmio induz o aumento da PCO. A correlação entre os valores de LPO x GSH e PCO x LPO demonstra que esses sistemas estão inter-relacionados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSSON, E. Long-term sampling of air-borne cadmium dust in an alkaline battery factory. **Work Environ. Health**, v. 5, p. 178–187, 1979.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AKESSON, A. et al. Cadmium-Induced Effects on Bone in a Population-Based Study of Women. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 6, p. 830–834, 2 fev. 2006.
- AKESSON, A.; JULIN, B.; WOLK, A. Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study. **Cancer research**, v. 68, n. 15, p. 6435–41, 1 ago. 2008.
- 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.
- BERNARD, A. Cadmium & its adverse effects on human health. **The Indian journal of medical research**, v. 128, n. 4, p. 557–64, out. 2008.
- BONDY, S. C. Oxygen generation as a basis for neurotoxicity by metals. **Toxicology of Metals**, p. 699–706, 1996.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio. 1976.
- BUSH, P. G. et al. A Quantitative Study on the Effects of Maternal Smoking on Placental. p. 247–256, 2000.
- CARDOSO, L. M. N.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos**. volume 6 ed. Salvador: [s.n.]. v. 6p. 122
- CARVALHO, M. C. DE. **Efeitos neurotóxicos da exposição perinatal ao metilmercúrio Gallus domesticus**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- CHENG, S. H. et al. Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. v. 19, n. 12, p. 3024–3031, 2000.
- DEBIASI, M. M. **Análise morfológica da ação do cloreto de manganês durante o desenvolvimento embrionário inicial de Gallus gallus**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2011.

- DEWITT, J. C.; MEYER, E. B.; HENSHEL, D. S. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 48, n. 2, p. 270–7, fev. 2005.
- DOI, T. et al. Epigenetic effect of cadmium on global de novo DNA hypomethylation in the cadmium-induced ventral body wall defect (VBWD) in the chick model. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 120, n. 2, p. 475–80, abr. 2011.
- ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 1, n. 6, p. 529–39, dez. 2001.
- FANTEL, A. G. Reactive oxygen species in developmental toxicity: Review and hypothesis. **Teratology**, v. 53, p. 196–217, 1996.
- FERRARO, T. et al. Food Phytochemicals for Cancer Prevention II. **American Chemical Society: Washington, DC**, p. 4, 1994.
- FERREIRA, J. M. D. B.; FERREIRA, A. C. A sociedade da informação e o desafio da sucata eletrônica. **Revista de ciências exatas e tecnologia**, v. III, n. 3, p. 157–170, 2008.
- GANDARA, C. A. T. **Modelo experimental parao estudo da gastrosquise em embriões de galinha**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- GODT, J. et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. **Journal of occupational medicine and toxicology (London, England)Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., & Groneberg, D. a. (2006). The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. Journal of occu**, v. 1, p. 22, jan. 2006.
- GOTO, Y. et al. EMBRYOS CULTURED IN VITRO. **FREE**, v. 15, p. 69–75, 1993.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179–80, 1 abr. 2000.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. Series of normal stages in the development of the chick embryo. **Developmental dynamics**, v. 88, n. 1, p. 195:231–272, 1951.
- HEN CHOW, E. S.; CHENG, S. H. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 73, n. 1, p. 149–59, maio. 2003.
- HERMES-LIMA, M. Oxigen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: [s.l: s.n.]. p. 319–368.
- IARC. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. **IARC Scientific Publications**, v. 58, p. 119–237, 1993.

- IL'YASOVA, D.; SCHWARTZ, G. G. Cadmium and renal cancer. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 207, n. 2, p. 179–86, 1 set. 2005.
- JABLONKA-SHARIFF, A.; OLSON, L. M. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 460–8, jan. 1997.
- JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–9, 1 maio. 1992.
- JIN, T.; LU, J.; NORBERG, M. Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. **Neurotoxicology**, v. 19, p. 529–535, 1998.
- JOHNSON, M. D. et al. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. **Nature medicine**, v. 9, n. 8, p. 1081–4, ago. 2003.
- JOHRI, N.; JACQUILLET, G.; UNWIN, R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. **Biometals**, v. 23, n. 5, p. 783–92, out. 2010.
- JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65–87, 10 maio. 2011.
- KERTÉSZ, V.; HLUBIK, I. Plasma ALP activity and blood PCV value changes in chick fetuses due to exposure of the egg to different xenobiotics. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 117, n. 2, p. 323–7, jan. 2002.
- LAUWERYS, R. et al. Placental Transfer of Lead, Mercury, Cadmium, and Carbon Monoxide in Women. **Environmental research**, v. 15, p. 278–289, 1978.
- LEMOS, V. A. et al. Flow injection preconcentration system using a new functionalized resin for determination of cadmium and nickel in tobacco samples. **Journal of hazardous materials**, v. 155, n. 1-2, p. 128–34, 30 jun. 2008.
- LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free radical biology & medicine**, v. 37, n. 12, p. 1921–42, 15 dez. 2004.
- LEVINE, B. R. L.; WILLIAMS, J. O. Y. A.; STADTMAN, E. R. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. v. 186, 1991.
- LIMA-VERDE, A. I. B. et al. Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero. **Medicina Veterinária**, n. 1, p. 81–88, 2007.
- MOORE, K.; PERSAUD, T. **Embriologia Clínica**. 5a. ed. [s.l.] Editora Guanabara Koogan S.A., 1994.
- NAGATA, C. et al. Urinary Cadmium and Serum Levels of Estrogens and Androgens in Postmenopausal Japanese Women. p. 705–708, 2005.
- NAWROT, T. et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. **The lancet oncology**, v. 7, n. 2, p. 119–26, fev. 2006.

- NAWROT, T. S. et al. Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. **Biometals**, v. 23, n. 5, p. 769–82, out. 2010.
- ORTOLANI-MACHADO, C. F. et al. Métodos para a manipulação e o preparo de embriões e larvas. In: OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; GROTZNER, S. R. (Eds.). **Técnicas e métodos para a utilização prática em microscopia**. 1. ed. Curitiba: Editora Santos, 2012. p. 237–294.
- PARZYCK, D. C. et al. Fetal effects of cadmium in pregnant rats on normal and zinc deficient diets. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 19, n. 2, p. 206–14, fev. 1978.
- PETERS, J. L. et al. Cadmium exposure in association with history of stroke and heart failure. **Environmental research**, v. 110, n. 2, p. 199–206, fev. 2010.
- PIASEK, M. et al. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 15, n. 6, p. 673–81, 2001.
- RIVERO, L. B. D. **Exposição de embriões de Gallus domesticus ao acetato de chumbo e seus efeitos sobre a histologia cerebelar e o comportamento no período pós-natal inicial**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. v. 205, p. 192–205, 1968.
- SOMASHEKARAI AH, B. V.; PADMAJA, K.; PRASAD, A. R. K. Lead-induced lipid peroxidation and antioxidant defense components of developing chick embryos. **Free radical biology & medicine**, v. 13, p. 107–114, 1992.
- STOHS, S. J. et al. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Chromium and Cadmium Ions. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 20, n. 2, p. 77–88, 2001.
- STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free radical biology & medicine**, v. 18, n. 2, p. 321–336, 1994.
- STUPAK, C. **Padronização de Metodologia da Exposição do Cobre durante o Desenvolvimento Embrionário de Aves**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2010.
- SUNDERMAN, F. W.; PLOWMAN, M. C.; HOPFER, S. M. Embryotoxicity and teratogenicity of cadmium chloride in *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure. **Association of Clinical Scientists**, 1991.
- SURAI, P. F. Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes. **British Poultry Science**, v. 8, n. January, p. 397–405, 1999.
- SURAI, P. F.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1304, p. 1–10, 1996.

- THOMPSON, J. et al. Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 20, n. 4, p. 539–48, 2005.
- THOMPSON, J. et al. Evidence against a direct role for oxidative stress in cadmium-induced axial malformation in the chick embryo. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 3, p. 390–8, 15 mar. 2010.
- THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. G. Effects of cadmium on formation of the ventral body wall in chick embryos and their prevention by zinc pretreatment. **Teratology**, v. 64, n. 2, p. 87–97, ago. 2001.
- THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. G. Omphalocele induction in the chick embryo by administration of cadmium. **Journal of pediatric surgery**, v. 42, n. 10, p. 1703–9, out. 2007.
- THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. G. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 25, n. 3, p. 304–15, abr. 2008.
- VÁRNAGY, L. The teratogenicity of pesticides (in Hungarian). In: A Biológia Aktuális Problémái. **Medicina Könyvkiadó, Budapest**, v. 32, p. 9–38, 1985.
- VIAENE, M. K. et al. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium : a cross sectional epidemiological study. p. 19–27, 2000.
- WAISBERG, M. et al. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, v. 192, n. 2-3, p. 95–117, nov. 2003.
- WELLS, P. G. et al. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 207, n. 2 Suppl, p. 354–66, 1 set. 2005.
- WHO. **Cadmium - World Health Organization** Environmental health criteria 134. **Anais...** Geneva: 1992
- YAMAMOTO, F. Y. et al. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–55, set. 2012.