

200207018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Claudia Lumy Yano

"Aspectos estruturais e ultra-estruturais de testículos de ratos submetidos ao tratamento com o cádmio e paracetamol"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Claudia Lumy Yano

e aprovada pela Comissão Julgadora.

M. A. Heidi Dolder

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular

Orientadora: Profa.Dra. Mary Anne Heidi Dolder

UNIDADE	100
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Y17a
V.	
T. Nº	47707
PROC.	837/02
C	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08-02-02
N.º CPO	

CM00162956-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Y17a **Yano, Claudia Lumy.**
Aspectos estruturais e ultra-estruturais de testículos de ratos submetidos ao tratamento com o cádmio e paracetamol/
Claudia Lumy Yano. –
Campinas, SP:[s.n.], 2001

Orientadora: Mary Anne Heidi Dolder
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Testículos. 2. Paracetamol. 3. Cádmio. I. Dolder, Mary Anne Heidi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 26/10/2001

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo


Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel


Assinatura

Prof. Dr. Amaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Assinatura

Dedico

Aos meus pais Kiokaso Yano e Norico
Yamauchi Yano pelo amor e carinho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Ainda que eu falasse as línguas
dos homens e dos anjos, e não
tivesse amor, seria como o metal
que soa ou como o sino que tine.
E ainda que tivesse o dom
de profecia, e conhecesse todos
os mistérios e toda a ciência, e
ainda que tivesse toda a fé, de
maneira tal que transportasse os
montes, e não tivesse amor, nada
seria.*

Agradecimentos

A Deus presente em todos os momentos;

A Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela orientação recebida e pela compreensão;

Ao Instituto de Biologia da UNICAMP;

Ao Departamento de Biologia Celular pela acolhida;

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP, pela ajuda e colaboração para a execução das análises em Microscópio Eletrônico de Varredura e Microscópio Eletrônico de Transmissão;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro, para que fosse possível a realização da tese de mestrado;

Aos meus pais Kiokaso Yano e Norico Yamauchi Yano pelo incentivo, dedicação e o amor que me proporcionaram alcançar essa vitória.

À minha família Batian Tochie Yamauchi, Fernando Yano, Darci, Massue, Neusa, Luiz, Mitsunori Yamauchi "in memoriam", e aos primos: Fábio, Luiz, Vander e Érica Yamauchi que sempre me apoiaram;

Às amigas: Karina Mancini, LÍlian Medeiros e Patrícia da Luz Moreira pela compreensão e amizade em uma fase especial de minha vida;

Aos amigos José Lino, Adelina Ferreira, Uyrá Zama, Karina Mancini e Laércio pelo companheirismo;

A Helene Perters e aos técnicos João Alves Batista de Oliveira do Departamento de Parasitologia e Norivaldo Celestino do Departamento de Anatomia pela grande ajuda nos momentos iniciais do trabalho;

Ao Sr. Pedro Oya e família pelo carinho;

À D. Mercedes Ramos e a amiga Christiane Lombello pela amizade e incentivo;

A todos os amigos e funcionários do Instituto de Biologia, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, dos Departamentos de Biologia Celular, Histologia e Anatomia do IB/UNICAMP.

ÍNDICE

Resumo.....	1
Abstract.....	3
I.Introdução.....	5
I.1. Cádmio - Aspectos gerais.....	8
I.2. Analgésicos - Aspectos gerais.....	11
I.3. Efeitos verificados pela contaminação com o cádmio.....	16
I.4. Efeitos verificados no uso do paracetamol.....	19
II. Objetivos.....	21
III. Materiais e Métodos.....	22
III. 1. Material Biológico.....	22
III. 2. Tratamentos.....	22
III. 3. Métodos.....	23
III. 4. Microscopia de Luz.....	23
III. 5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	24
III. 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	24
IV. Resultados.....	25
IV. 1. Resultados em Microscopias de Luz e Eletrônica de Varredura.....	25
IV. 2. Abreviações e Símbolos.....	29
IV. 3. Resultados em Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	42
IV. 4. Abreviações.....	46
V. Discussão.....	59
VI. Conclusões.....	71
VII. Referências Bibliográficas.....	72

Resumo

O cádmio é um poluente ambiental altamente tóxico, sendo ainda de caráter acumulativo. É considerado como um dos metais pesados mais largamente utilizados nas indústrias. Recentemente foi classificado como carcinogênico, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC).

Outra substância de interesse comercial e para a saúde pública é o paracetamol, analgésico e antipirético, amplamente utilizado sem prescrição médica. A toxicidade tem sido verificada mesmo em doses semelhantes à terapêutica, e estudos mostram sua genotoxicidade.

O presente trabalho teve por objetivo analisar as mudanças morfológicas dos testículos de ratos Wistar submetidos ao cádmio e paracetamol isoladamente e em associação.

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos adultos. Os animais foram submetidos ao tratamento com cloreto de cádmio em dose única de 3,0 μ moles/kg e/ou tratamento com paracetamol em dose única de 4,4 mmoles/kg de paracetamol. Os testículos dos animais foram analisados após 5, 10 e 15 dias nos tratamentos isolados e 5, 10, 15, 30, 50 e 70 dias no tratamento com ambas as substâncias.

No tratamento com cádmio, as lesões foram vistas nos túbulos seminíferos morfológicamente alterados e em degeneração. Os vasos sanguíneos estavam extremamente dilatados, resultando em edema. Em eletromicrografias observa-se a fragmentação de células de Sertoli e grande descamação celular no lúmen tubular. Espermátides morfológicamente alteradas foram encontradas, algumas com cromatina fracamente condensada ou não condensada.

Nos animais tratados com paracetamol as lesões foram menos acentuadas do que aquelas verificadas após o tratamento com o cádmio. Observou-se alguns túbulos morfológicamente alterados e em degeneração. Os vasos estavam bastante dilatados e alguns rompidos, com conseqüente edema. A fragmentação de células de Sertoli também foi vista neste tratamento, além de espermátides com variação na compactação da cromatina e com estrutura morfológica alterada. Observou-se grande desenvolvimento das organelas como Retículo Endoplasmático Rugoso, Complexo de Golgi e vacúolos com restos celulares, em espermátides redondas e no citoplasma residual das espermátides alongadas.

A associação do cádmio e paracetamol resultou em lesões mais acentuadas, com vários túbulos em degeneração. Diversas áreas, resultantes da degeneração de alguns túbulos foram preenchidas por edema. Os vasos encontraram-se extremamente dilatados sem aparente recuperação durante o período do experimento (70 dias). Espermátides foram mais fortemente alteradas e mostraram grande variação na condensação da cromatina. Espermátides com ausência de núcleo, mas contendo acrossomo e axonema encontram-se próximas a áreas com fragmentação dos prolongamentos de células de Sertoli. Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi bem desenvolvidos no citoplasma das espermátides, foram vistos próximos a vesículas com restos celulares.

Tanto o cádmio como o paracetamol, induzem o atraso na espermatogênese. Administrados em associação, observa-se a potencialização, inclusive pelo agravamento dos efeitos genotóxicos. Os tratamentos levam a uma provável diminuição na fertilidade.

Abstract

Cadmium is a highly toxic environmental pollutant, considered very serious because it is cumulative. It is one of the heavy metals most commonly used in industry. Recently, the International Agency of Cancer Research (IARC) classified this metal as carcinogenic.

Another substance of commercial importance, as well as for public health, is paracetamol, an analgesic and antipyretic medicine, widely used without medical prescription. Its toxicity has been verified even in doses similar to those therapeutically recommended, and studies have shown their genotoxicity.

This study was undertaken to analyze the morphological changes in the testicles of Wistar rats, which received cadmium and/or paracetamol, either isolated or in association.

For this research, 30 Wistar rats were used. The animals were submitted to a single dose of $3.0\mu\text{mol}/\text{kg}$ of cadmium chloride and/or $4.4\text{mmol}/\text{kg}$ of paracetamol. They were analyzed after 5, 10, and 15 days for the treatments with a single substance and 5, 10, 15, 30, 50, and 70 days for rats which received both substances.

In rats that received cadmium, the deleterious effect was seen by deformed and degenerating tubules. The blood vessels are strongly dilated, resulting in edema. The Sertoli cells appeared fragmented in electron micrographs and there were many immature cells freed in the tubules' lumen. Morphologically altered spermatids were found, some with poorly condensed chromatin.

In the animals treated with paracetamol, the lesions encountered were less serious than in the case of cadmium. A few deformed and degenerating tubules were observed.

The blood vessels were strongly dilated and some were ruptured, with large areas of edema in the proximity. Sertoli cell fragmentation was also encountered, near morphologically altered spermatids with various degrees of chromatin condensation. Unusually well developed organelles including the rough endoplasmic reticulum, Golgi complex and vacuoles containing cell debris were observed in the cytoplasm of young spermatids and in the excess cytoplasm being cast off by elongated spermatids.

The association of cadmium and paracetamol resulted in the most serious lesions, with many deformed or degenerating seminiferous tubules. The open areas left by tubule degeneration were filled by edema. The blood vessels were extremely dilated and no recuperation of this condition was seen for the duration of the experiment (70 days). Spermatids were more strongly altered, varying greatly as to chromatin condensation. Acrosomes without nuclei, but containing an axoneme were found near areas of Sertoli cell fragmentation. Unusually well developed endoplasmic reticulum and Golgi complex were recognized near vesicles with cell debris in the cytoplasm of all stages of spermatids.

Both cadmium and paracetamol delay spermatogenesis. Administered in association, a potencialization can be observed, with more serious genotoxic effects. The use of these substances in the doses used apparently results in lowered fertility.

I. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a contaminação ambiental por substâncias químicas decorrentes da atividade humana, em razão do processo de industrialização, urbanização, e introdução de defensivos na agricultura e pecuária, tornou-se importante causa de efeitos biológicos às vezes pouco reconhecidos (Pereira, 2000b).

Os metais pesados atingem o meio ambiente através de efluentes industriais, podendo contaminar a água e os alimentos. Entre os metais pesados de interesse na contaminação ambiental e também na saúde ocupacional está o cádmio (Pereira, 2000b). O acúmulo do metal cádmio como resultado da atividade humana foi encontrado em sedimentos de lagos, fornecendo um registro histórico (Forstner, 1976).

O cádmio é classificado como poluente ambiental altamente tóxico e acumulativo. Recentemente foi designado como carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC), segundo Waalkes *et al.* (1997) e Dalton *et al.* (2000).

A mais forte contaminação humana ocorreu no Japão, onde trabalhadores rurais foram contaminados pelo arroz plantado em campos irrigados a partir de efluentes de minas de chumbo, zinco e cádmio. Este evento estimulou o interesse pelo metal, pois envolvia exposições a baixos níveis de cádmio durante longo período. Os sintomas devido à contaminação caracterizaram-se por fortes dores nos ossos, fraturas, glicosúria, proteinúria, aminoacidúria e severa osteomalacia. A enfermidade recebeu o nome de "Itai-Itai", porém o cádmio só foi reconhecido como o agente responsável, dez anos após a citada doença (Doull *et al.*, 1975).

Outras pesquisas quanto à toxicidade crônica por cádmio foram realizadas no Ártico e noroeste Canadense, pois são altas as concentrações encontradas em animais selvagens que constituem a alimentação tradicional de povos indígenas (Chan *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998).

No Kazaquistão, foram encontrados altos índices de contaminação por cádmio na ração animal e carne de gado. São índices, que a longo prazo podem exceder níveis aceitáveis colocando em risco a saúde humana (Farmer & Farmer, 2000).

No organismo, os agentes químicos podem desencadear lesões por ação direta ou indireta. Na ação direta, os agentes químicos podem inibir enzimas, quebrar macromoléculas e exercer ação detergente sobre as membranas. No entanto, a maioria dos agentes químicos induz lesões por perturbarem o fornecimento de oxigênio às células ou interferirem com o mecanismo de produção e inativação de radicais livres (Pereira, 2000a).

A aspirina (ácido acetilsalicílico) e o paracetamol são os analgésicos mais disponíveis e utilizados em vários países. Até 1951 o paracetamol era utilizado sob prescrição médica nos Estados Unidos, sendo posteriormente liberado o seu uso (Flower *et al.*, 1981; Giri, 1993; Rannug *et al.*, 1995). O paracetamol é o princípio ativo de muitas drogas terapêuticas e é a alternativa preferida à aspirina, particularmente em pacientes com desordens de coagulação sanguínea e indivíduos com baixa tolerância à aspirina (Rannug *et al.*, 1995).

Como agente terapêutico, estima-se que 10 a 20 mil toneladas de paracetamol sejam consumidos anualmente. A fácil acessibilidade à droga subestima seu perigo potencial, sendo que o paracetamol não deve ser considerado como um inofensivo medicamento doméstico. Advertências devem ser feitas sobre seu papel, como causa comum de envenenamento letal em crianças, seu potencial de toxicidade, e o aumento do número de suicídios verificados nos últimos anos com altas doses de paracetamol (McGuigan, 1999).

Na União Européia a avaliação da segurança ambiental é de grande importância na legislação governamental química e de pesticidas. Esta preocupação se deve às mais diversas vias com que os produtos farmacêuticos humanos e veterinários entram no meio

ambiente. Teoricamente, calcula-se que o paracetamol alcance usinas de tratamento de águas de esgotos em quantidades entre 292 e 585 toneladas anualmente. Trabalhos sugerem que testes com as substâncias em questão sejam realizados, para identificar indústrias farmacêuticas potencialmente poluidoras e os seus fármacos devidamente rotulados (Henschel *et al.*, 1997).

Diante dos fatos mencionados acima, os efeitos ocasionados por poluentes ambientais associados ou não à prática de automedicação devem ser cuidadosamente investigados. Nesse caso, tanto para o cádmio como para o paracetamol isolados existem indícios dos efeitos deletérios dos mesmos sobre o processo de espermatogênese em animais experimentais.

No homem, a espermatogênese é um processo com uma seqüência de eventos coordenados e extraordinariamente complexos. Contudo, seu mecanismo de proliferação celular é bastante susceptível, nos diferentes estágios, a fatores externos tais como agentes químicos, como poluentes ambientais e fármacos (Jackson, 1964).

O estudo cinético da espermatogênese é um importante fator para a compreensão das mudanças bioquímicas que acompanham o controle celular durante a maturação nos testículos. De maneira complementar, o entendimento destas mudanças pode auxiliar no esclarecimento do modo de ação de novas drogas e assim pode ajudar a manter a espermatogênese normal (Fox & Fox, 1967).

O presente trabalho visa analisar as alterações morfológicas nos testículos de ratos, ocasionadas pelo cádmio e paracetamol, visto a importância econômica e finalidades inerentes.

I.1. Cádmio - Aspectos Gerais

O cádmio é um dos mais perigosos metais pesados encontrados na natureza. Apresenta-se associado a outros metais e é obtido a partir do refinamento do cobre e zinco (Doull *et al.*, 1975).

É um dos metais mais empregados e com maior diversidade de utilidade nas indústrias. Entre as inúmeras finalidades destacam-se: utilização nas indústrias de plástico, tintas, baterias (níquel-cádmio), ligas metálicas, processos de galvanização, eletroplaquetas utilizados em aparelhos de rádio e televisão, fios elétricos de telefone, produtos agrícolas (pesticidas e fungicidas), fabricação de filmes fotográficos, revestimento de ferro, cobre, aço, e protetor de raios-X (Luckey & Venugopal, 1977).

A vida média do cádmio no organismo é de difícil determinação. Contudo, a partir de evidências indiretas da ingestão diária e quantidades de cádmio corpóreo, estimou-se a vida média a partir de 10 a 30 anos, mostrando-se altamente acumulativo nos tecidos (Friberg *et al.*, 1974 apud Doull *et al.*, 1975; Flower *et al.*, 1981; Hew *et al.*, 1993).

O cádmio atinge maiores níveis em indivíduos com mais de 40 anos, porém, não se pode dizer que a sua distribuição e a idade do indivíduo indiquem o envolvimento deste metal na etiologia da infertilidade masculina nem em neoplasias glandulares. No entanto, estes distúrbios são encontrados com maior freqüência em homens de idades avançadas (Oldereid *et al.*, 1993).

Ocorrendo absorção do metal através de poeira ou por alimentos, este se liga às proteínas do plasma e aos eritrócitos depositando-se no fígado e rins, onde permanece por 20 a 30 anos. A afinidade preferencial por estes órgãos deve-se a uma proteína de

baixo peso molecular, rica em grupos de cisteína denominada de metalotionina (MT), cuja síntese é estimulada pela presença do metal (Pereira, 2000b).

Esta proteína de ligação ao cádmio, Cd-binding protein (Cd-Bp), foi originariamente isolada a partir do rim de cavalos por Margoshes & Valle (1957) que encontraram altas concentrações de zinco e cádmio nestas proteínas, que foram denominadas metalotioninas.

Entre as várias funções da metalotionina estão a de armazenagem do zinco, ação antioxidante e proteção contra o cádmio (Klaassen *et al.*, 1999).

Vários trabalhos têm mostrado que a metalotionina protege as células contra a toxicidade do cádmio e reduz sua genotoxicidade (Shiraishi *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1998).

Foi verificado que tanto a metalotionina constitutiva celular quanto a metalotionina induzida por drogas são importantes no processo de detoxificação do cádmio. A proteção mediada pela metalotionina presente no citosol é devido a sua alta afinidade pelo íon cádmio, reduzindo assim a quantidade de cádmio livre que é capaz de induzir danos às organelas (Goering *et al.*, 1984 apud Klaassen *et al.*, 1999).

A síntese da metalotionina é induzida pela sobrecarga corpórea de cádmio e também de outros metais como zinco, cobre, cobalto, níquel, mercúrio (Doull *et al.*, 1975). No fígado, o cádmio induz a síntese de metalotionina e forma um complexo juncional com esta proteína (Cd-MT). O complexo Cd-MT uma vez na circulação segue para os rins onde é absorvido pelos túbulos proximais e degradados pelos lisossomos liberando radicais livres de cádmio. Estes radicais livres de cádmio ligam-se a metalotionina, contudo, quando a liberação de radicais livres de cádmio excede a habilidade celular para sintetizar metalotionina o cádmio atinge sítios sensíveis ocasionando danos celulares (Clarkson, 1995).

Após o desaparecimento dos sintomas tóxicos do cádmio restaura-se a função renal e a formação Cd-binding proteins (Cd-Bp). O aumento de metalotioninas no fígado sugere a detoxificação do cádmio pelo seqüestro que o torna não disponível e inofensivo. Tal hipótese é reforçada pela baixa excreção de cádmio (Luckey & Venugopal, 1977).

A interpretação do mecanismo de toxicidade do cloreto de cádmio é complexa e ainda pouco entendido. Mudanças quanto à permeabilidade da membrana e alteração do metabolismo energético celular são considerados alguns dos mecanismos de toxicidade do cádmio nos tecidos (Luckey & Venupogal, 1977).

Pesquisas mostram que o zinco, importante metal que participa da estrutura e função de muitas proteínas, quando presente em quantidades adequadas na dieta, atenua os sintomas associados à toxicidade do cádmio nos tecidos (Millar, 1958, apud Fox & Fox, 1964). Estudos "in vitro" e "in vivo", também sugerem que a forma iônica do cádmio é requerida na morte celular programada (Ishido *et al.*, 1999).

Nos testículos, a inabilidade de induzir a síntese da proteína metalotionina detoxificante do metal cádmio leva a uma maior susceptibilidade tóxica (Mckenna *et al.*, 1996).

Não se conhece o mecanismo molecular para a toxicidade dos metais pesados em homens e animais de laboratório. Entretanto, a recente identificação e caracterização do gene (Cdm), responsável pela susceptibilidade à toxicidade do metal em camundongos deverão aumentar o conhecimento sobre este mecanismo de toxicidade (Dalton *et al.*, 2000).

I.2. Analgésicos - Aspectos Gerais

As drogas antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas são grupos heterogêneos de compostos sem relação química, mas que compartilham algumas ações terapêuticas e efeitos secundários. São compostos denominados "drogas tipo aspirina" por serem protótipos da aspirina (Flower *et al.*, 1981).

A aspirina é um composto que possui em sua fórmula química o grupo O-acetil, que pode ser quimicamente reativo e capaz de acetilar proteínas tais como albumina e também proteínas de plaquetas. De maneira geral, alguns dos efeitos potenciais como alergenidade e disfunção plaquetária devem-se a estas reações químicas (Flower *et al.*, 1981).

Devido ao potente e duradouro efeito de baixas doses de aspirina sobre a função plaquetária, têm-se sugerido a sua utilização no tratamento e profilaxia de enfermidades associadas à agregação de plaquetas como coronariopatias, infarto do miocárdio e trombose pós-operatória (Mocancada & Vane, 1978 apud Flower *et al.*, 1981).

A atividade terapêutica parece depender da inibição da via bioquímica responsável pela biossíntese de prostaglandinas, presentes em todas as células de mamíferos que contêm enzimas peroxissomais, com exceção dos eritrócitos (Shen, 1977).

As prostaglandinas são liberadas por inúmeras injúrias: mecânicas, térmicas, químicas e outros efeitos que provocam sintomas do processo inflamatório. Nos fenômenos inflamatórios as prostaglandinas, assim como outros mediadores da inflamação aumentam a permeabilidade vascular e produz vasodilatação levando a maior propensão ao edema (Ferreira *et al.*, 1974 apud Flower *et al.*, 1981).

A biossíntese de prostaglandinas envolve inúmeras etapas, desde o ácido graxo precursor, ácido araquidônico até a formação de prostaglandinas, por exemplo, da série E, a PGE₂. O ácido araquidônico sofre ciclização e oxigenação pela enzima ciclooxigenase, formando endoperóxidos intermediários instáveis de PGG₂ (ácido 15-hidroperóxi-9 α ,11 α -peroxidoprostano-5,13-dienóico). Este primeiro passo catalisado pela ciclooxigenase é inibido por drogas tipo aspirina, que acetilam a serina no sítio ativo da enzima (Smith *et al.*, 1985). Segundo o mecanismo de ação inibidora, drogas tipo aspirina bloqueiam a prostaglandina sintetase (Flower *et al.*, 1981).

Todas as drogas tipo aspirina são inibidoras irreversíveis da ciclooxigenase com algumas exceções. São drogas antipiréticas, analgésicas e antiinflamatórias, porém, existem diferenças importantes quanto à sua atividade como no caso do paracetamol (Flower *et al.*, 1981).

O paracetamol ou acetaminofeno (N-acetilpaminofeno) é o metabólito ativo do alquitram e fenacetina, substâncias utilizadas como analgésicas no século XIX. Foi usado pela primeira vez em 1893, mas sua popularidade data de 1949 (Flower *et al.*, 1981).

Com relação à aspirina, o paracetamol possui boa tolerância e pouca toxicidade, ocupando o lugar de "analgésico doméstico". É encontrado sob muitos nomes comerciais (Tempra, Tylenol), e a dosagem terapêutica recomendada é de 325 a 650 mg a cada quatro horas para adultos e 60 a 120 mg dependendo da idade/peso para crianças (Flower *et al.*, 1981).

O paracetamol é considerado fraco inibidor da biossíntese de prostaglandinas, e alguns trabalhos sugerem que ela pode ser mais efetiva contra as enzimas do sistema nervoso central (SNC) do que contra do sistema nervoso periférico (SNP). Isto pode explicar em parte a capacidade para reduzir a febre (ação central) e sua fraca atividade antiinflamatória (Flower *et al.*, 1981).

Em doses terapêuticas, o paracetamol é uma droga bem tolerada, no entanto, podem ocorrer reações adversas como erupções cutâneas eritematosas, febre e lesões nas mucosas. O efeito adverso mais sério foi verificado em sobredose de paracetamol, através de necrose hepática potencialmente fatal, necrose renal e coma hipoglicêmico (Flower *et al.*, 1981).

Paracetamol (Tylenol), atua através de lesão oxidativa e por ligação covalente à proteína. A substância é detoxificada no fígado através da sulfatação, glicuronização e também é convertido em um metabólito tóxico pelo citocromo P-450 (Robbins *et al.*, 1996).

O paracetamol é metabolizado pela ação das enzimas peroxissomais hepáticas e na ingestão de altas doses, ocorre N-acetilação seguido de desidratação espontânea e formação de N-acetil-p-benzoquinonaimina, metabólito considerado responsável pela hepatotoxicidade (Pumford & Halmes, 1997). Trabalhos verificam que em grandes doses de paracetamol, os metabólitos acumulam-se na célula devido à depleção da enzima glutathiona (GSH) e ligam-se covalentemente às proteínas e aos ácidos nucléicos, aumentando a toxicidade farmacológica e levando à necrose maciça das células hepáticas (Robbins *et al.*, 1996).

Recentes estudos indicam que a longa utilização do paracetamol em doses terapêuticas aumenta os riscos de doenças crônicas renais (Sandler *et al.*, 1989 apud Rannug *et al.*, 1995). Pesquisas têm revelado que proteínas, que se ligam covalentemente a metabólitos xenobióticos, ocorrem em órgãos alvos de toxicidade. Tal seletividade de ligação pode vir a ter influência homeostática sobre íons ou outras respostas celulares as quais contribuem para a toxicidade da droga, a hipersensibilidade ou auto-imunidade (Cohen *et al.*, 1997).

Drogas tipo aspirina podem ter efeitos indesejáveis sobre a fertilidade masculina, uma vez que o líquido seminal humano é provavelmente a mais rica fonte natural de prostaglandinas. Existem, grupos de homens subfértéis em que a concentração de prostaglandinas no líquido seminal é baixa, sendo correlacionada com a fertilidade (Flower *et al.*, 1981).

Na evolução das espécies, os organismos desenvolveram sistemas enzimáticos capazes de metabolizar substâncias exógenas, especialmente as mais lipossolúveis, tomando-as polares e de fácil eliminação. Os agentes químicos após a biotransformação podem ter sua atividade reduzida ou aumentada. É o caso dos medicamentos, que exercem seus efeitos terapêuticos através dos metabólitos (Clarkson, 1995).

Os sistemas enzimáticos, responsáveis pela biotransformação das substâncias, estão localizados no Retículo endoplasmático liso (REL), e podem ser enquadradas em dois grupos: Reações de fase I, que convertem agentes químicos apolares em metabólitos mais polares por oxidação, redução ou hidrólise. O metabólito originado pode ser inativo (como agente lesivo ou terapêutico), ou pode ser mais ativo do que o produto original. Reações de fase II conjugam as substâncias ou seus metabólitos com um produto endógeno, formando um complexo geralmente solúvel em água e de fácil excreção. A conjugação se faz geralmente com ácido glicurônico, acetatos, sulfato ou aminoácidos (Pereira, 2000a).

As reações de oxidação da fase I sofrem a ação de monooxidasas (também chamadas de oxidases de função mista) que exigem NADPH (agente redutor) e o oxigênio molecular (agente oxidante). Estas monooxidasas pertencem à família de isoenzimas conhecidas como citocromo P450 e se localizam na membrana do REL; neste encontra-se também a citocromo P450 redutase, que fica associada a uma flavoproteína e/ou ao NADPH. Além do citocromo P450, existem outras oxidases nas células que atuam nos processos de biotransformação, como as hemeperoxidases, xantina-oxidases, e aldeído-desidrogenase (Pereira, 2000a).

A capacidade de biotransformação de um organismo é variável e influenciada por vários fatores. Como o sistema de biotransformação do REL pode ser induzido, a ação de um agente químico pode ser modificada pela ação concomitante com outro (Pereira, 2000a).

A possibilidade de uma droga alterar a intensidade dos efeitos farmacológicos de outra é denominado de interação potencial de drogas. Os resultados são o aumento ou a diminuição dos efeitos de uma ou ambas as drogas, constituindo um efeito desejável, indesejável ou inesperado (Flower *et al.*, 1981).

Com relação à espermatogênese, as drogas podem agir de diferentes modos: 1) inibição da seqüência de desenvolvimento normal (danos cinéticos); 2) ação direta sobre um tipo celular resultando em subsequente morte (danos celulares); 3) interferência com a morfologia celular resultando em mudanças nas fases testiculares (danos morfológicos); 4) mudanças manifestadas durante a clivagem do ovo fertilizado

pelo espermatozóide afetado sem nenhuma interferência na cinética do sistema; 5) ação resultando em mudanças genéticas na progênie sem nenhuma interferência com a cinética da espermatogênese ou desenvolvimento embrionário (danos genéticos tardios); e 6) efeito sobre a matriz estrutural dos tecidos testiculares incluindo células de Leydig e Sertoli (danos na matriz) (Fox & Fox, 1967).

I.3. Efeitos verificados pela contaminação com cádmio

É de conhecimento que os testículos com suas células germinativas em processo de divisão, são bastante susceptíveis à ação do cádmio (Parížek & Zárór, 1956).

Parížek & Zárór (1956) foram os primeiros a relatar minuciosamente o efeito do sal de cádmio sobre o tecido testicular. Desde então, numerosas pesquisas têm sido realizadas sobre o assunto. Foi comprovada a esterilidade em ambos os sexos com o excesso de cádmio (Aoki & Hoffer, 1978).

Chiquione (1965), verificou que injeção intratesticular de cádmio causa danos em gônadas de várias espécies e parada permanente da espermatogênese. Afirma ainda que dose subcutânea de 0,02 mmoles de CdCl₂/kg causa atrofia testicular em ratos.

Vários casos de envenenamento agudo por cádmio têm sido documentados. Muitos são por inalação de altas concentrações do metal, enquanto outros resultam do consumo de alimentos contaminados (Nordberg, 1999).

A consequência da inalação excessiva do pó ou fumaça de cádmio é a perda da capacidade ventilatória, com conseqüente aumento do volume residual nos pulmões, característica de enfisema (Lauwerys *et al.*, 1974 apud Doull *et al.*, 1975).

A intoxicação aguda por cádmio resulta em atrofia ou degeneração, necrose hemorrágica, injúria vascular, aumento da permeabilidade, elevada pressão intratesticular, diminuição do fluxo sanguíneo regional, mudanças no metabolismo energético e pinocitose do endotélio testicular (Chiquione, 1964; Gunn *et al.*, 1963; Kar *et al.*, 1960; Sacerdote *et al.*, 1983 apud Norlan *et al.*, 1986).

A toxicidade crônica pelo cádmio causa danos quanto a mineralização óssea, aumentando as concentrações de cálcio no fígado.

Os efeitos a longo período de exposição também foram observados em trabalhadores de indústrias, como relatado na complexa doença itai-itai reportado no Japão (Kjellström, 1992 apud Nordberg, 1999).

Danos renais podem ser encontrados pela intoxicação crônica por cádmio, devido à exposição ao pó de óxido de cádmio em fábricas de baterias. Verificou-se que quanto maior a duração da exposição, maior a incidência de danos renais resultando em proteinúria, glicosúria hipercalcúria, e aminoacidúria. Proteinúria é ocasionado a partir de danos da reabsorção glomerular de proteínas, devido ao aumento da permeabilidade tubular, alteração do metabolismo mitocondrial, e inibição das peptidases responsáveis pela decomposição de imunoglobulinas. A importância do tempo de exposição é em parte devido ao alto caráter acumulativo do cádmio (Friberg, 1948; Friberg, 1957; Kazantzis *et al.*, 1963; Piscator, 1966; Adams *et al.*, 1969; Vigliani, 1969; Jones *et al.*, 1971 apud Doull *et al.*, 1975).

Estudos em microscopia eletrônica dos rins mostraram um aumento no número de lisossomos e mitocôndrias, proporcional às concentrações de cádmio. Isto sugere a estimulação do processo de detoxificação e também alteração do metabolismo energético (Nishizumi, 1972 apud Luckey & Venupogal, 1977).

Mudanças induzidas por cádmio são acompanhadas pela alta concentração deste nos testículos. São caracterizados primeiramente por isquemia local, resultante do aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos testiculares e mudanças no metabolismo energético (Setchel & Waites, 1970).

Entre os inúmeros efeitos observados em animais de laboratório expostos ao cádmio, verificam-se: danos aos túbulos renais, placenta, necrose testicular, danos estrutural e funcional no fígado, osteomalacia, tumor testicular, mal formação teratogênica, anemia, hipertensão, edema pulmonar, enfisema pulmonar crônico e deficiência de ferro, cobre e zinco. Alguns desses efeitos foram observados em exposição acidental de seres humanos a vapores de óxido de cádmio presentes na fumaça de cigarro (Ragan & Mast, 1990).

O cádmio também é claramente um agente tumorigênico. Trabalhos realizados com células de Leydig propõe que a inibição da produção andrógena estimule um "feedback" no eixo pituitária-hipotálamo-testículo, aumentando o hormônio luteinizante, e causando lesões proliferativas, degenerativas e de hipofuncionamento dos testículos (Waalkes *et al.*, 1997).

Diversas pesquisas têm verificado que o cádmio aumenta a peroxidação de lipídios e inibe a atividade do superóxido dismutase (SOD), desencadeando danos celulares após longa exposição (Yiin *et al.*, 1999; Koizume *et al.*, 1992; Patra *et al.*, 1999; El-Missiry & Shalaby, 2000).

Valverde e colaboradores (2000), observaram que danos ao DNA em relação a uma única inalação de cloreto de cádmio, mantém a mesma magnitude, ou em alguns casos diminuem em relação a inalações subseqüentes, possivelmente devido ao mecanismo de desintoxicação que induz a formação da metalotionina.

A indução da apoptose pelo cádmio foi demonstrada "in vivo" em ratos machos Wistar, e as mudanças características de apoptose foram encontradas em vários órgãos como rim, próstata, vesícula seminal, epidídimo e testículos (Yan *et al.*, 1997).

Em animais, os efeitos verificados são preocupantes e os resultados obtidos sugerem a investigação dos possíveis efeitos sobre o homem.

I.4. Efeitos verificados no uso do paracetamol

Nos últimos anos, várias pesquisas "in vitro" e "in vivo" indicam o efeito genotóxico do paracetamol próximo a concentrações terapêuticas (Brunborg *et al.*, 1995).

Ensaio citogenéticos com o paracetamol "in vivo" como "in vitro" indicam que o fármaco pode induzir significativamente trocas de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos em mamíferos. O paracetamol mostrou forte clastogenicidade em células V79 "in vitro" em concentrações acima de 1.0mM (Muller *et al.*, 1991 apud Giri, 1993).

Os resultados de Kocisova *et al.* (1988) e Hongslo *et al.* (1990) mostraram o aumento de alterações cromossômicas "in vivo" com dose terapêutica de paracetamol, em 24 horas (Giri, 1993). O paracetamol pode induzir trocas de cromátides irmãs pela interação com enzimas importantes para a replicação ou reparo do DNA. A indução de danos cromossômicos parece ser devido à inibição específica de ribonucleotídeo redutase, pela destruição de um radical livre de tyrosyl, localizado em uma pequena subunidade da enzima (Hongslo *et al.*, 1990).

Para concentrações de paracetamol acima de 0,1mM em culturas de linfócitos foi observada a inibição da síntese de replicação do DNA, além de quebras das cromátides, cromossomos e aberrações cromossômicas, que são efeitos secundários à inibição da síntese de DNA (Hongslo *et al.*, 1991).

Em cultura de células HL-60 foi verificada a inibição da proliferação celular, ou seja, detenção do ciclo celular. Houve inibição da síntese de DNA e aumento no número de células com condensação nuclear e fragmentação, indicando apoptose na fase S, no caso de doses de paracetamol acima das terapêuticas (Wiger *et al.*, 1997; Hongslo *et al.*, 1994).

Doses hepatotóxicas de paracetamol resultaram em necrose das células do fígado, túbulo proximal renal, bronquiolar e do epitélio olfatório (Hart *et al.*, 1995). Placke *et al.* (1987), após aplicação de paracetamol encontraram células espermáticas multinucleadas e degeneradas nos testículos. Os efeitos da hepatotoxicidade em relação a esta droga podem ser visualizados através de alterações como: vesiculação, vacuolização celular e degeneração da membrana plasmática.

Uma das questões que permanecem abertas a futuros estudos é se o dano inicial ao DNA será reparado ou se a célula morrerá antes que as mutações possam ser introduzidas na população (Giri, 1993).

II. Objetivos

-Analisar as alterações estruturais e ultra-estruturais nos testículos de ratos Wistar submetidos ao cádmio e/ou paracetamol.

-Verificar a possível potencialização das lesões induzidas pelo cádmio com a administração do paracetamol.

-Analisar a possibilidade de atenuações das lesões promovidas pelo cádmio e paracetamol, após interromper a administração da droga.

III. Materiais e Métodos

III.1. Material Biológico

Foram utilizados 30 ratos machos adultos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Unicamp, com idade de dois meses no início do experimento e pesando aproximadamente 300 g no momento do sacrifício. Os animais foram distribuídos casualmente, sendo mantidos em condições de laboratório com água e ração *ad libitum*.

III.2. Tratamentos

Foram realizados 03 tratamentos distintos e um grupo Controle, descritos a seguir:

- a)- cloreto de cádmio (n = 6)
- b)- paracetamol (n = 6)
- c)- cádmio + paracetamol (n = 12)
- d)- grupo Controle (n = 6)

O cloreto de cádmio foi administrado intraperitonealmente, conforme Cabral (1996), em dose única de 3,0 μ moles/kg e o paracetamol em única dose oral de 4,4 mmoles/kg. A dosagem de ambas as drogas baseou-se na dosagem mínima utilizada por Cabral (1996),

que utilizou dose única de 2,5 μ moles/kg de cloreto de cádmio e três doses de 4,4 mmoles/kg de paracetamol.

Os animais do grupo controle receberam solução fisiológica via oral e intraperitoneal, assim como os animais do tratamento "c" que receberam o cádmio e paracetamol.

Os animais destinados aos tratamentos "a", "b" e "d", foram sacrificados aos 5, 10 e 15 dias após a inoculação das drogas, e os animais do tratamento "c" foram sacrificados: 5, 10, 15, 30, 50 e 70 dias após a inoculação das drogas. Dois animais foram sacrificados em cada intervalo, para todos os tratamentos.

III. 3. Métodos

Ao final de cada tratamento, os animais foram pesados, anestesiados com éter etílico, perfundidos com cloreto de sódio (1 N), e fixados com Karnovsky modificado (4% de paraformaldeído, 0,5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio a 0,1M; PH= 7.2). Os testículos foram dissecados e um deles foi processado para microscopia eletrônica de transmissão e o outro dividido à metade sendo cada qual processado para microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz.

III. 4. Microscopia de Luz

Os testículos foram fixados em Bouin durante 24 horas e lavados em álcool amoniacal. Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em banhos de xilol e incluídos em resina Paraplast (Oxford - Labware, St. Louis, M.O., U.S.A).

Cortes de 5 μ m de espessura foram distendidos em banho-maria e montados em lâminas histológicas albuminizadas. As lâminas secas com os cortes foram passados por banhos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol e lavados em água

corrente. Posteriormente os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, desidratados em séries crescentes de etanol, passados por banhos de xilol e montados em Entelan.

III. 5. Microscopia Eletrônica de Varredura

Os testículos foram fixados em Karnovsky (4% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído e 0,1M de tampão fosfato, PH= 7.2) por 48 horas e lavados em tampão fosfato de sódio (0,1M). Posteriormente, os testículos foram submetidos a banhos de sacarose nas concentrações de 0,5M; 1,0M; 1,5M; 2,0M; 2,5M e 3,0M, no período de 48 horas cada banho. Após os banhos de sacarose, o material foi fraturado em nitrogênio líquido, lavado em tampão fosfato (0,1M), pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e desidratado em série crescente de acetona. Posteriormente, foram realizados o ponto crítico e "sputtering" do material.

III. 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os testículos foram fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão fosfato 0,1M; PH= 7.2), durante 24 horas e lavados em tampão fosfato 0,1M. O material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio 1%, submetido à solução de ácido tânico 2%, e desidratado em série crescente de acetona. Finalmente, o material foi infiltrado e incluído em resina Epon 812.

IV. Resultados

IV. 1. Resultados em Microscopias de Luz e Eletrônica de Varredura

Nos cortes de animais controles não foram observados mudanças significativas após 5, 10 e 15 dias do início do experimento. O epitélio seminífero mantém a estratificação típica de células em graus progressivos de desenvolvimento como demonstrado na Fig. 1 A, após 5 dias. Túbulos em diferentes fases de desenvolvimento, circundados por tecido intersticial discreto e vascularizado, estão exemplificados em baixo aumento após 10 dias do tratamento (Fig. 1 B). Observou-se um aumento na quantidade de células descamadas na luz de alguns túbulos, 15 dias após o experimento (Fig. 1 C).

Nos animais tratados com dose única de $3,0\mu\text{moles/kg}$ de cádmio observaram-se alguns túbulos com epitélio reduzido, em degeneração e abundante descamação de células imaturas na luz tubular (Fig. 2 A). Alguns túbulos fortemente afetados, com total descaracterização morfológica, além de tecido intersticial aparentemente fibroso e vasos dilatados, foram evidentes após 5 dias do tratamento (Fig 2 B).

Ocorreram regiões onde os túbulos apresentaram desprendimento de células da camada basal em direção à luz tubular, e também túbulos em degeneração e tecido intersticial formando uma camada espessa (Fig. 2 C). A maioria dos túbulos apresentou a luz repleta de tipos celulares imaturos, provenientes de descamação celular. Os capilares e vasos sanguíneos encontraram-se dilatados e observou-se edema no tecido intertubular. A

presença de reentrâncias formadas a partir do desprendimento de células da camada basal foi evidente com 10 dias do tratamento (Fig. 2 D).

Após 15 dias do tratamento, observou-se uma recuperação na estrutura dos túbulos seminíferos e diminuição de células descamadas na luz em relação às alterações observadas nos animais com 5 e 10 dias do tratamento. Túbulos com quantidades maiores de espermatozoides e citoplasma residual foram evidenciados neste tempo de tratamento. Presença de vasos dilatados, tecido intersticial aparentemente fibroso, e edema também foram observados (Figs. 2 E e 2 F).

Em microscopia eletrônica de varredura foram observados 5 dias após o tratamento com o cádmio, alguns túbulos morfologicamente deformados e a presença de vasos dilatados (Fig. 6 A). Demonstrado em maior aumento (Fig. 6 B), observou-se a vasodilatação.

Os animais tratados com dose única de 4,4 mmoles/kg de paracetamol apresentaram lesões na forma de túbulos seminíferos deformados, com desprendimento de células basais, e também edema intertubular e vasodilatação (Figs. 3 A e 3 B).

Muitos túbulos com características típicas de diversas fases de desenvolvimento e grande quantidade de citoplasma residual sendo eliminado pelas espermátides foram evidentes a partir de 10 dias do tratamento (Figs. 3 C1 e 3 C2). Contudo, túbulo em degeneração, tecido intersticial aparentemente fibroso, e edema também foram observados (Fig. 3 C2). Um vaso fortemente afetado com conseqüente edema foi observado 10 dias após a administração do paracetamol (Fig. 3 C1). Em maior aumento observa-se túbulo com desprendimento de células da camada basal (Fig. 3 D).

Com 10 e 15 dias após o tratamento encontrou-se, com menor freqüência, túbulos estruturalmente desorganizados. Vasos fortemente afetados e grandes espaços intertubular preenchidos por edema e elementos fibrilares foram observados após 15 dias do tratamento. Alguns túbulos foram vistos morfologicamente alterados e outros apresentaram muito citoplasma residual e descamação (Fig. 3 E). Foram observadas áreas testiculares com túbulos sensivelmente afetados, caracterizados por reentrâncias da camada basal no epitélio germinativo (Fig. 3 F).

Observações ao microscópio eletrônico de transmissão de varredura, 10 dias após o tratamento com o paracetamol, mostram túbulos sem aparente alteração e tecido intersticial bem desenvolvido, mantendo-se um espaçamento regular entre os túbulos (Fig. 6 C). Vasos dilatados, como demonstrado na Fig. 6 D, foram observados.

Nos animais tratados com cádmio + paracetamol, as lesões apresentaram-se mais acentuadas. Foram observados após 5 dias do tratamento, túbulos com total descaracterização morfológica, desprendimento de células da camada basal com conseqüente formação de reentrâncias para o interior dos túbulos, e grandes espaços edematosos. O tecido intersticial aparentemente fibroso e vasodilatação também foram observados (Figs. 4 A e 4 B).

Após 10 dias, alguns túbulos apresentaram maior descamação de células imaturas na luz tubular e conseqüente epitélio seminífero reduzido. Os vasos apresentaram-se espessos e dilatados, com grandes espaços intertubulares preenchidos por edema (Fig. 4 C). Presença de túbulos em degeneração e desprendimento de células basais com conseqüente formação de reentrâncias foram observados após 5 dias do tratamento (Fig. 4 D).

Com 15 dias do tratamento não foram observadas células descamadas na luz dos túbulos. No entanto, túbulos morfológicamente alterados, tecido intersticial aparentemente fibroso, e vasos extremamente dilatados e rompidos foram observados próximos a grandes áreas edematosas (Figs. 4 E e 4 F).

Apenas com 30 dias, observou-se uma recuperação na estrutura do tecido seminífero, onde muitos túbulos apresentaram organização típica em camadas, existindo alguns poucos ainda com morfologia atípica. Vasos apresentaram-se extremamente dilatados e edema intertubular foram observados (Figs. 5 G e 5 H).

Com 50 dias do tratamento, foram verificadas áreas ainda com túbulos apresentando desprendimento de células da camada basal, e grandes espaços preenchidos por edema (Fig. 5 I). Túbulos com epitélio bem desenvolvido e grande quantidade de citoplasma residual ainda ligados aos espermatócitos no final da maturação foram observados após 50 dias do tratamento, além de vasodilatação e edema (Fig. 5 J).

Nos testículos estudados após 70 dias, ainda observaram-se algumas áreas com túbulos descaracterizados morfolologicamente e em degeneração. Os vasos encontram-se dilatados com muito edema circundante (Fig. 5 K). Apesar da aparente recuperação de muitos túbulos com epitélio seminífero bem desenvolvido, áreas com túbulos morfolologicamente alterados foram vistos. Áreas preenchidas por edema, elementos fibrilares, e restos celulares encontraram-se ainda presentes 70 dias após o tratamento (Fig. 5 L).

Em microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se túbulos morfolologicamente atípicos (Fig. 6 E), assim como apresentando desprendimento de células da camada basal. Espaços maiores foram observados entre o tecido intersticial e os túbulos seminíferos, possivelmente uma evidência de edema. Os vasos sangüíneos continuam dilatados (Fig. 6 F).

IV. 2. Abreviações e símbolos

ep= epitélio estratificado

a= acrossomo

v= vaso

i= tecido intersticial

d= descamação

e= edema

s=espermatozóides

c= citoplasma residual

r= reentrâncias

ř= elementos fibrilares

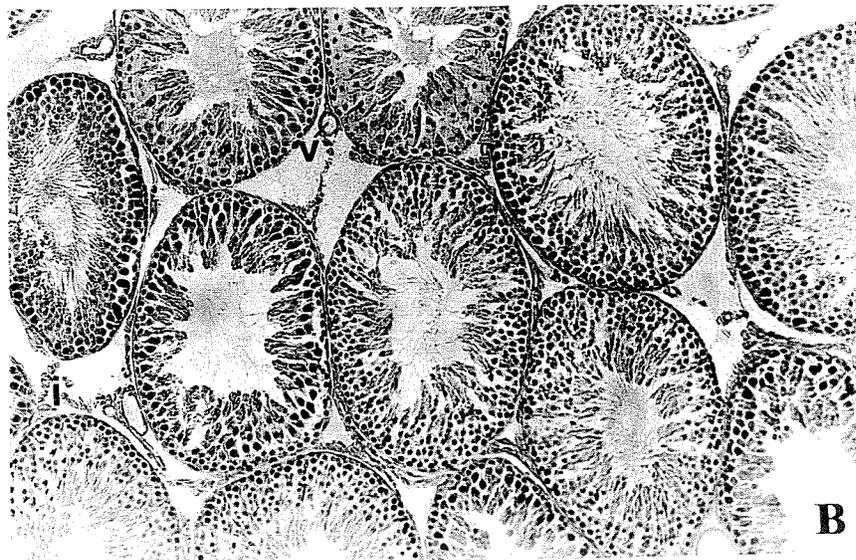
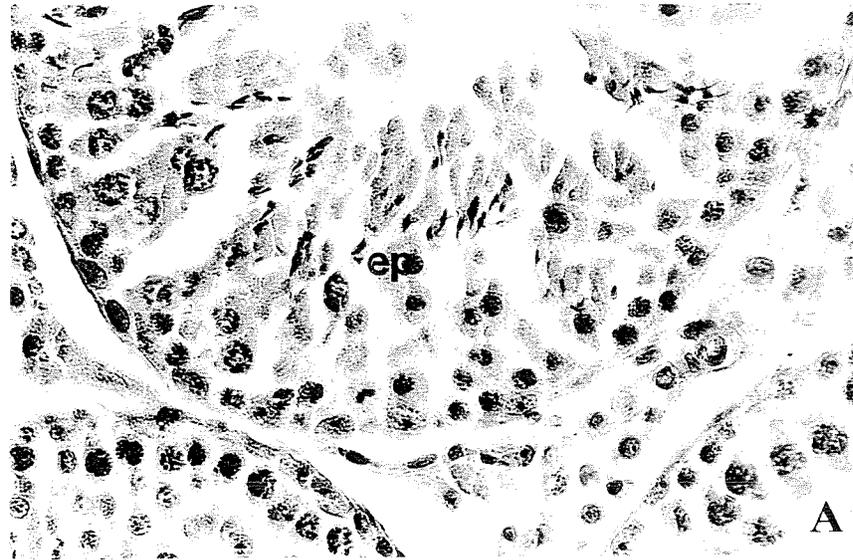
(★) túbulos em degeneração

(*) túbulos morfológicamente alterados

Prancha 1: Cortes transversais de túbulos seminíferos de animais controle (A) 5 dias; (B) 10 dias; (C) 15 dias.

- (A)** Epitélio seminífero (ep) estratificado com células germinativas em desenvolvimento. 470 x
- (B)** Túbulos seminíferos em diferentes fases de desenvolvimento, tecido intersticial (i) e vasos (v). 120 x
- (C)** Túbulos com presença de descamação de células imaturas na luz (d). 240 x

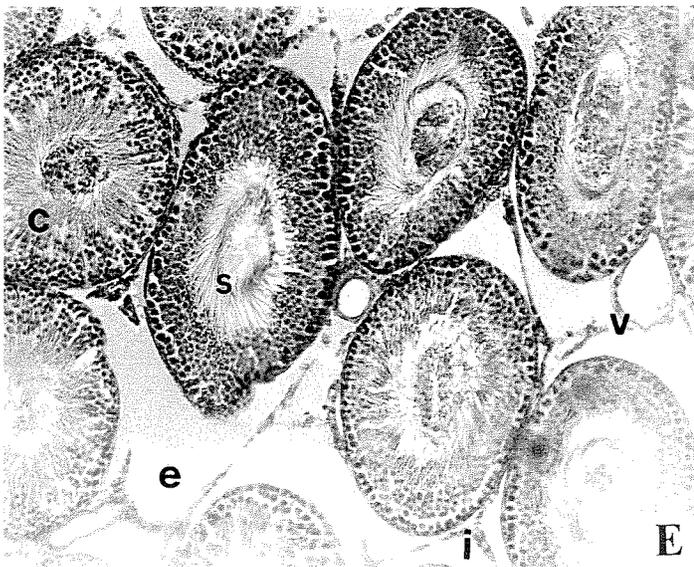
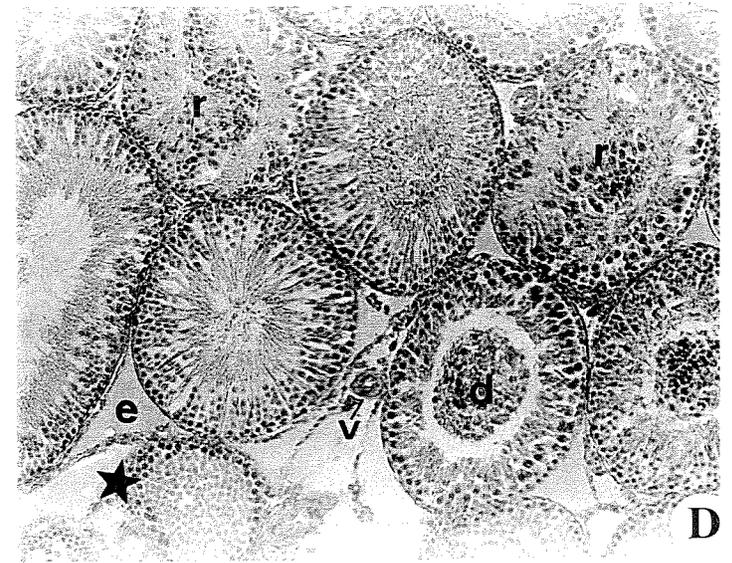
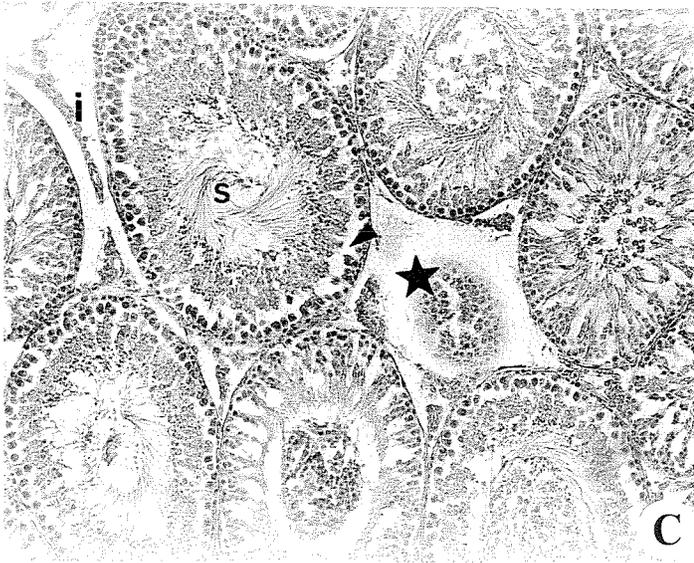
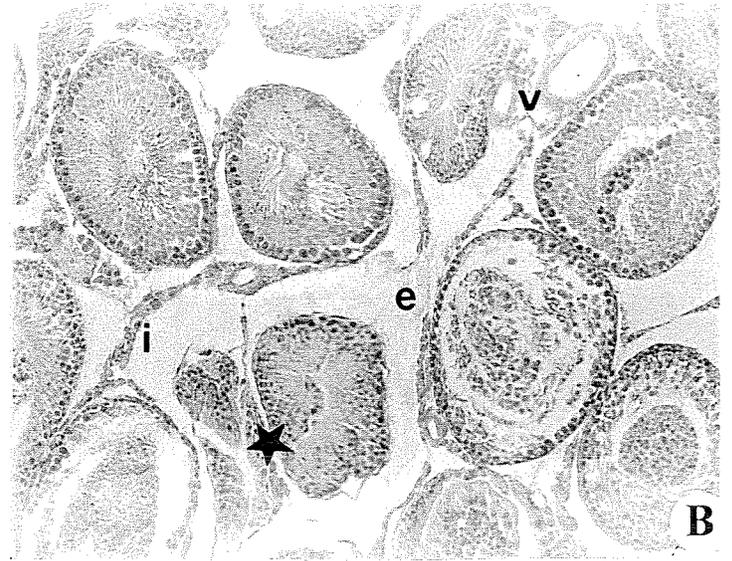
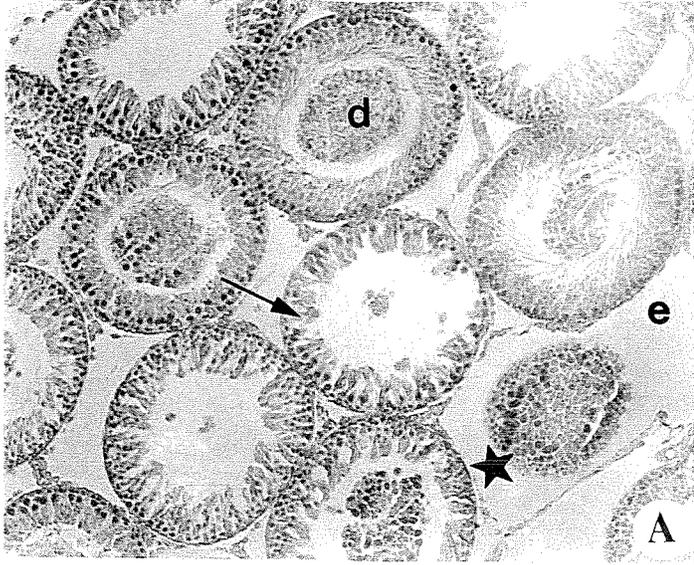
Prancha 1



Prancha 2: Cortes transversais de túbulos seminíferos de animais tratados com Cádmio, observados após (A-B) 5 dias; (C-D) 10 dias; (E-F) 15 dias.

- (A-B)** Túbulos apresentando epitélio reduzido (seta) e descamação (d). Notar áreas com túbulos em degeneração (★), vasos dilatados (v) e áreas com edema (e).
A,B=120x
- (C-D)** Desprendimento de células da camada basal (ponta de seta) causando reentrância de células em fases iniciais (r), áreas com túbulos em degeneração (★), vasos dilatados (v), tecido intersticial (i) e edema (e). Notar presença de espermatozóides (s). C,D= 120 x
- (E-F)** Túbulo em degeneração (★) enquanto outros contêm grande quantidade de espermatozóides (s) e áreas com muito citoplasma residual retida pelo espermatozóide. Tecido intersticial (i) evidente, vasos dilatados (v) e edema (e). E-F=120 x

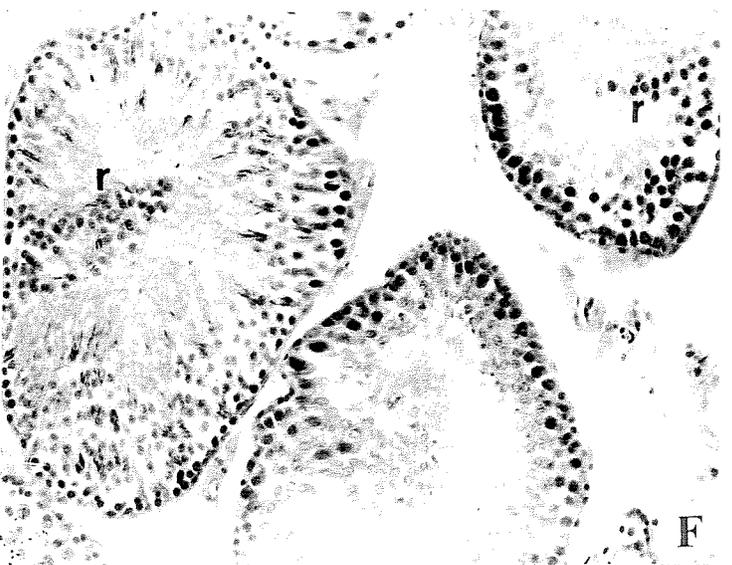
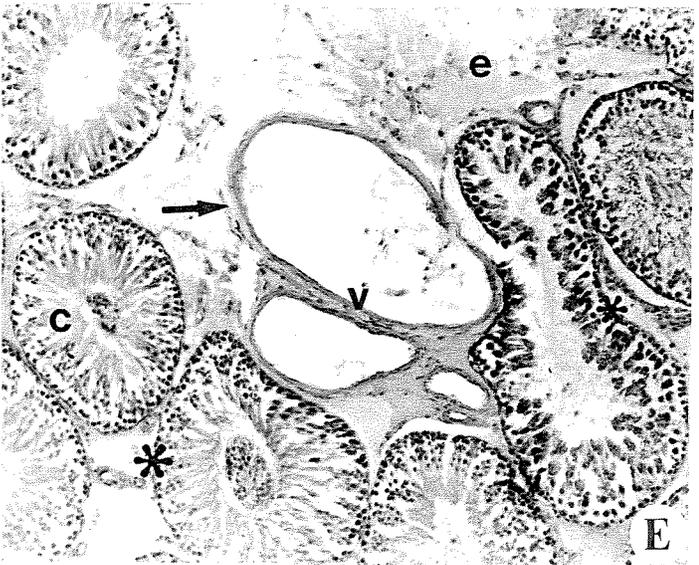
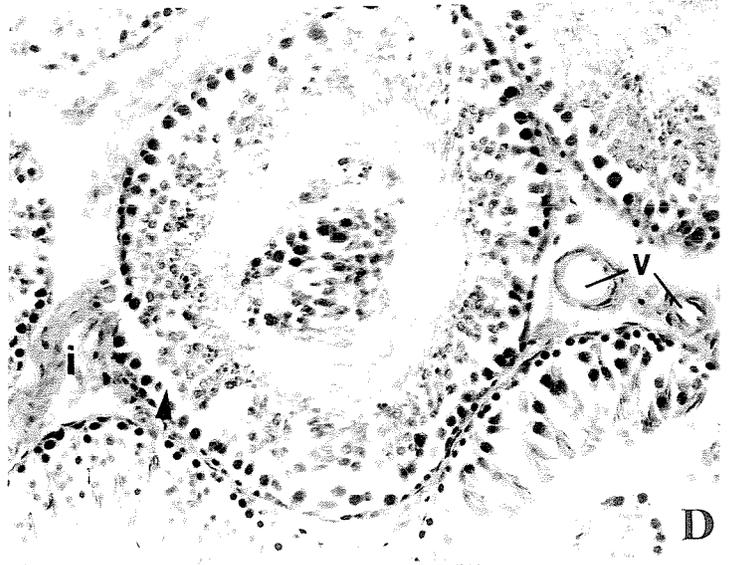
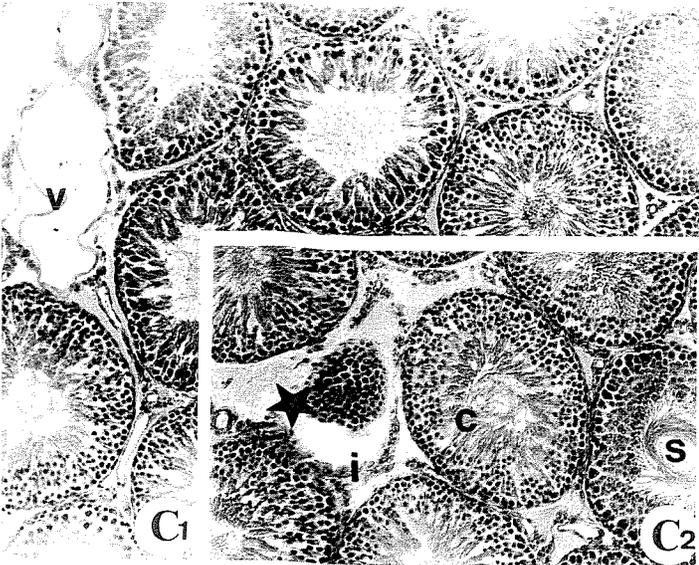
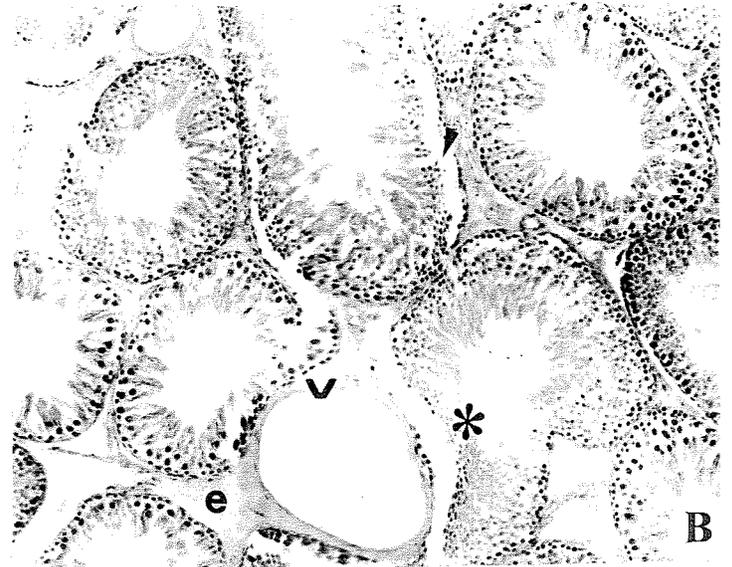
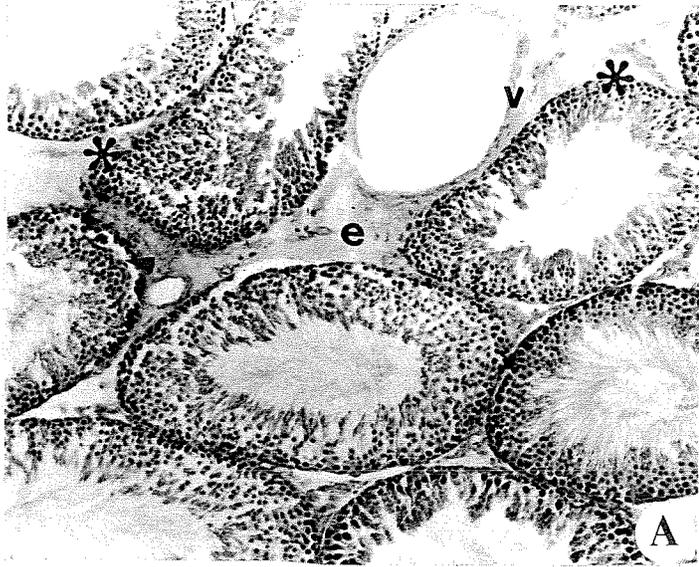
Prancha 2



Prancha 3: Cortes transversais de túbulos seminíferos de animais tratados com Paracetamol e observados após (A-B) 5 dias; (C-D) 10 dias; (E-F) 15 dias.

- (A-B)** Túbulos com desprendimento de células da camada basal (ponta de seta). Alguns túbulos são morfológicamente alterados (*). Notar vasos fortemente dilatados (v) com paredes finas e edema em áreas próximas (e). A-B=120 x
- (C-D)** **(C1)** Vaso deformado (v). **(C2)** Túbulos com presença de citoplasma residual (c) e espermatozóides (s). Notar túbulo em degeneração (★), e o aumento de tecido intersticial (i). **(D)** Túbulo com desprendimento de células imaturas da camada basal (ponta de seta), vasos dilatados (v) e tecido intersticial aparentemente fibroso (i). C1, C2=120 x e D=240 x.
- (E-F)** Túbulos com alteração morfológica (*) e grande quantidade de citoplasma residual (c). Alguns túbulos sensivelmente afetados, caracterizados por reentrâncias celulares no epitélio germinativo (r). Notar a presença de vaso alterado (seta) e edema (e). E=120 x e F=240 x

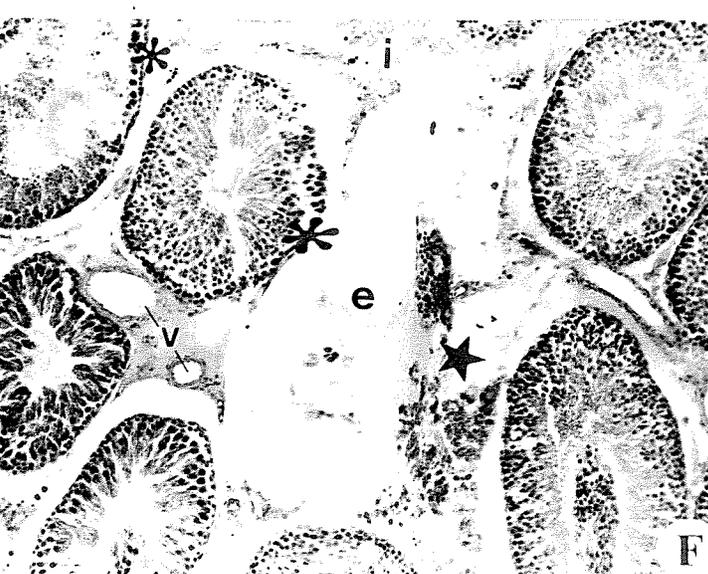
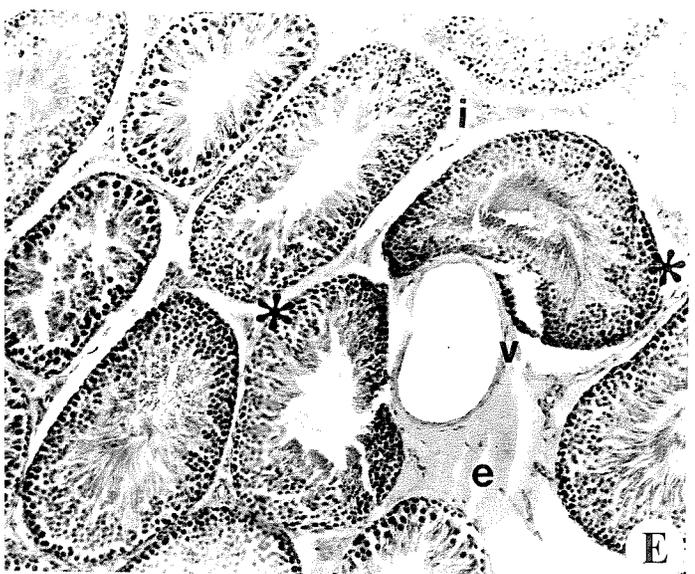
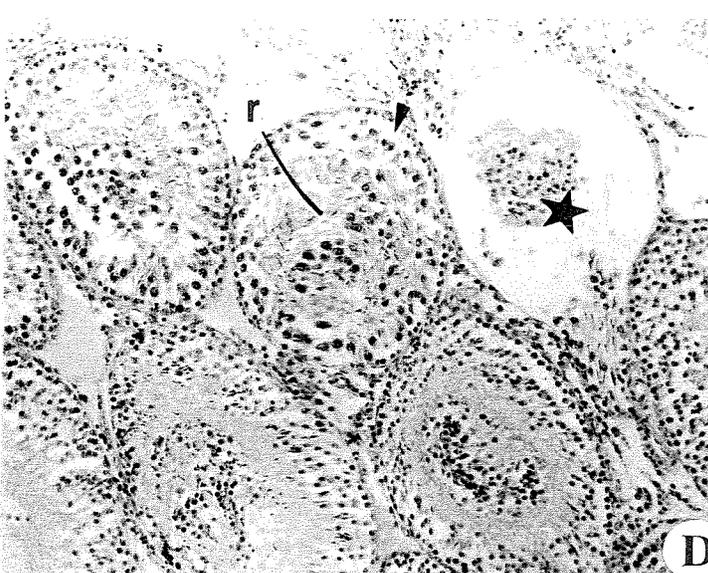
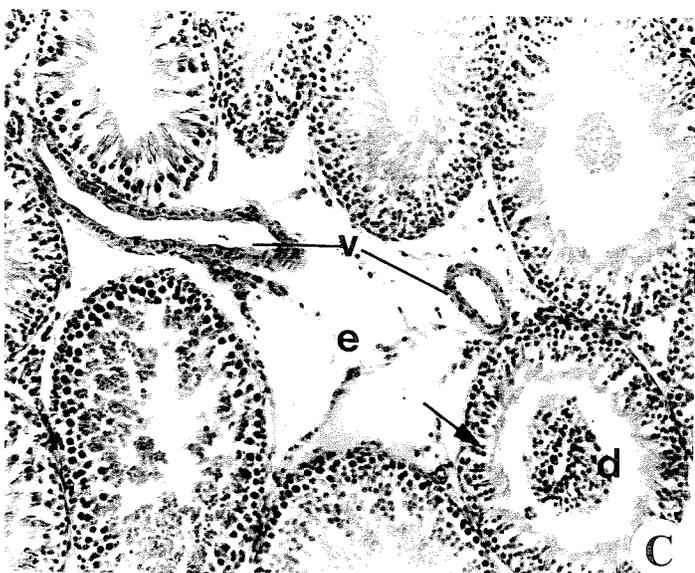
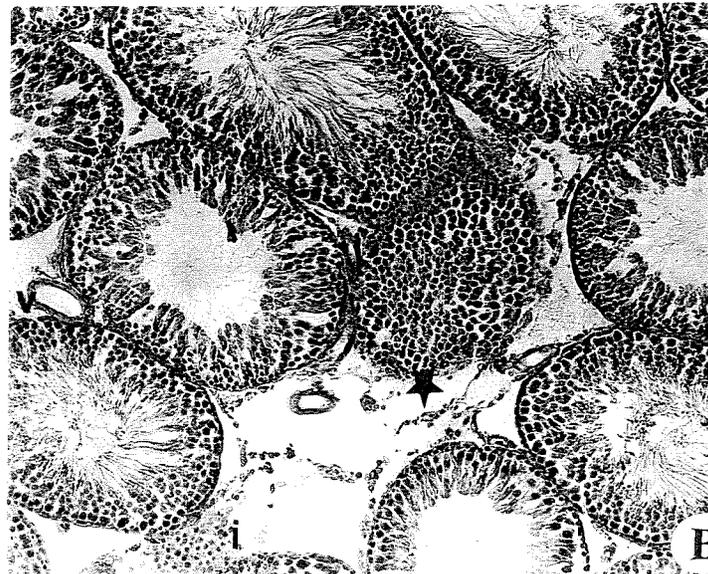
Prancha 3



Prancha 4: Cortes transversais de túbulos seminíferos de animais tratados com Cádmio + Paracetamol, sendo observado após (A-B) 5 dias; (C-D) 10 dias; (E-F) 15 dias.

- (A-B)** Túbulos com desprendimento de células da camada basal (ponta de seta) formando reentrâncias (r), e outros em degeneração (★). Vasos dilatados (v), edema (e) e tecido intersticial (i). A,B=120 x
- (C-D)** Túbulos com epitélio reduzido (seta) e em degeneração (★). Desprendimento de células da camada basal (ponta de seta) formando reentrâncias (r). Notar descamação celular na luz do túbulo (d), formação de edema (e) e vaso de parede espessa (v). C,D=120 x
- (E-F)** Grande área de edema (e), próximo a túbulos com alteração morfológica (*), e em fase final de degeneração (★). Vasos dilatados e rompidos (v). E,F=120 x

Prancha 4



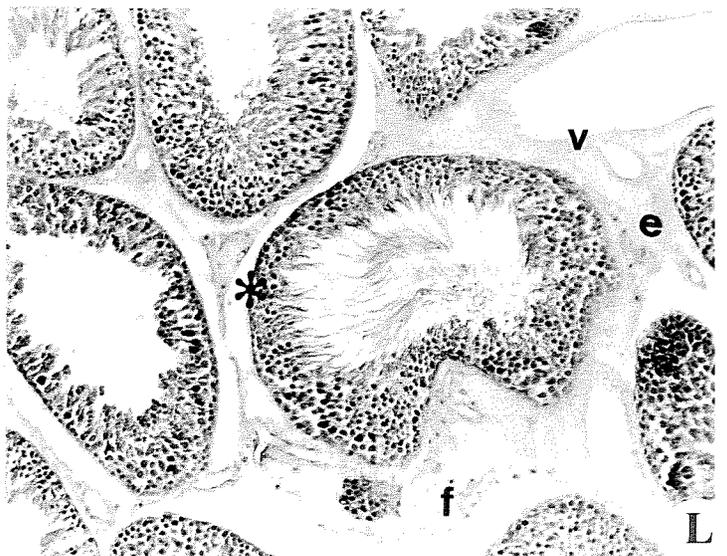
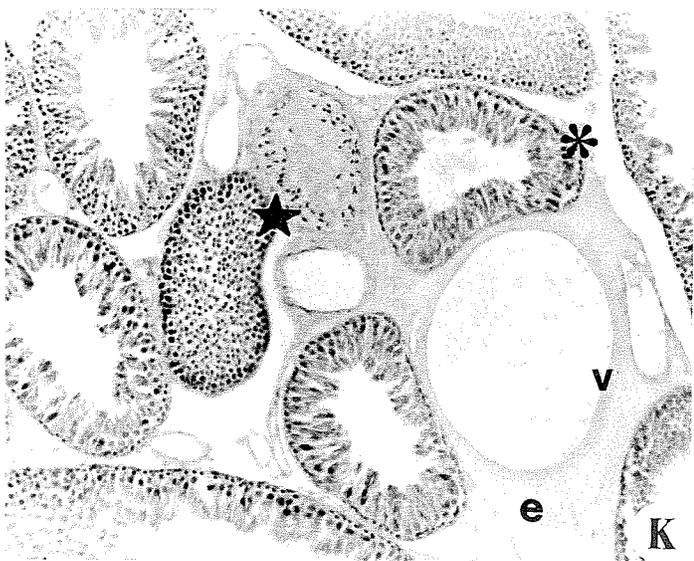
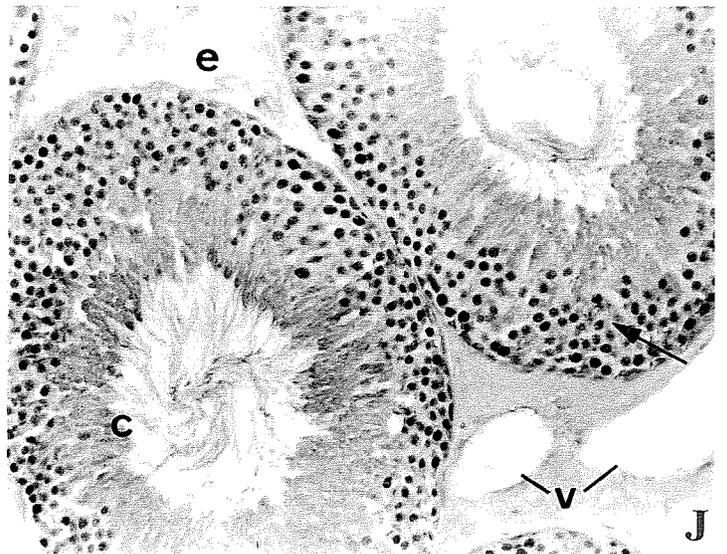
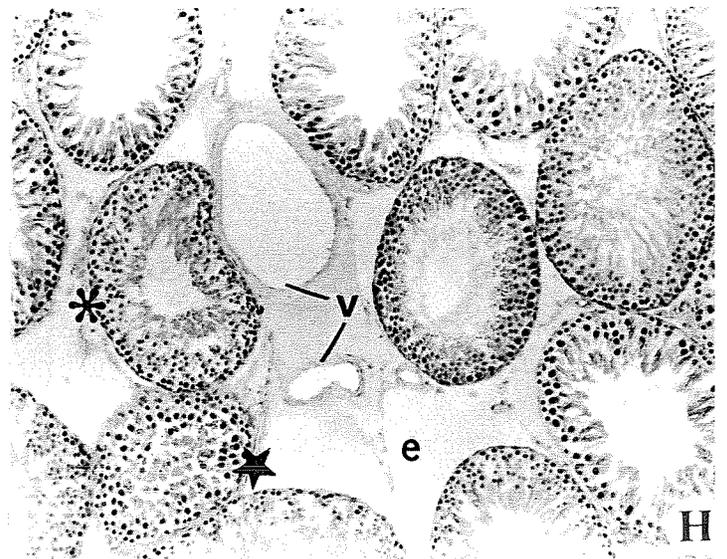
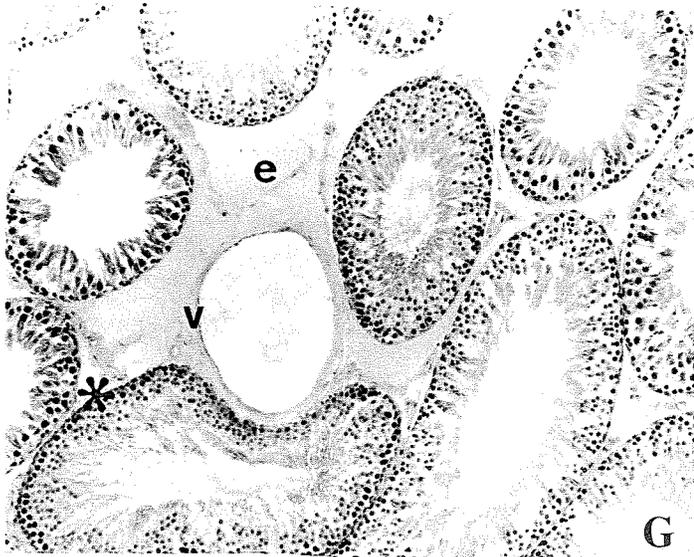
Prancha 5: Cortes transversais de túbulos seminíferos de animais tratados com Cádmio+Paracetamol, observados após (G-H) 30 dias; (I-J) 50 dias; (K-L) 70 dias.

(G-H) Túbulos deformados (*) e em degeneração (★), vasos dilatados (v). Notar grandes áreas com edema (e). G,H=120 x

(I-J) Túbulos com desprendimento de células da camada basal (ponta de seta) e túbulos com epitélio seminífero alto (seta), grande quantidade de citoplasma residual (c). Notar grandes espaços preenchidos por edema (e) e vasos (v). I=120 x e J=240 x

(K-L) Túbulos em degeneração (★) e deformados (*). Notar vaso extremamente dilatado (v), edema (e) e elementos fibrilares (f). K,L=120 x

Prancha 5



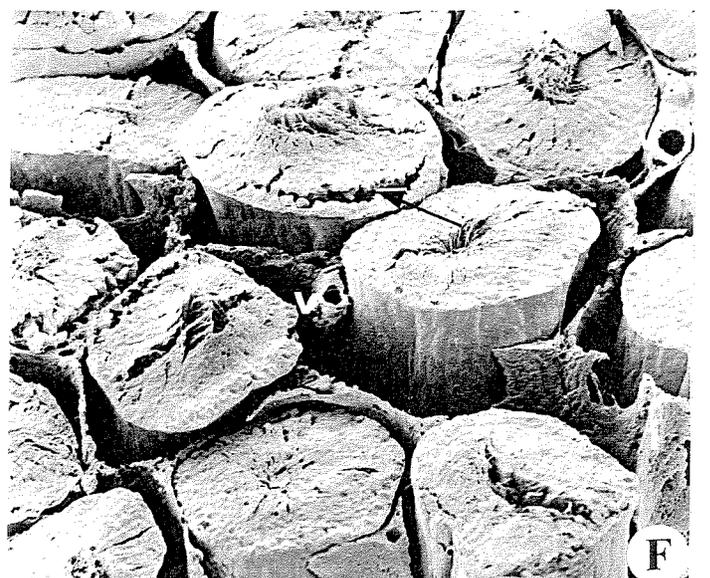
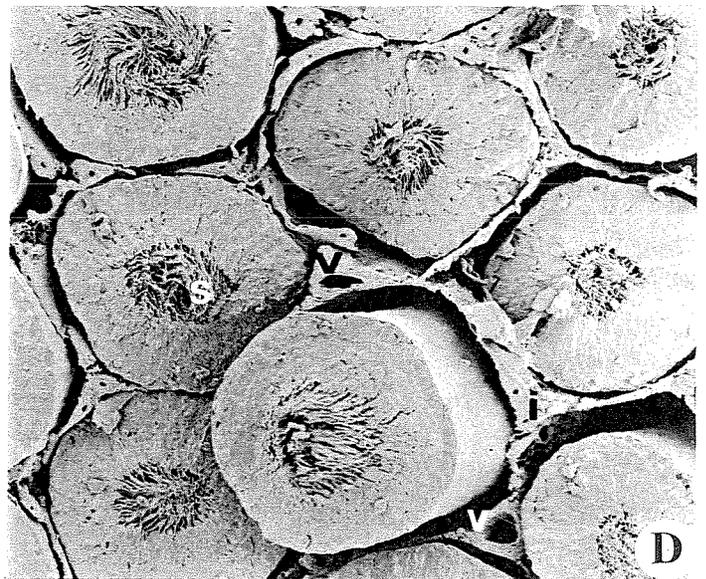
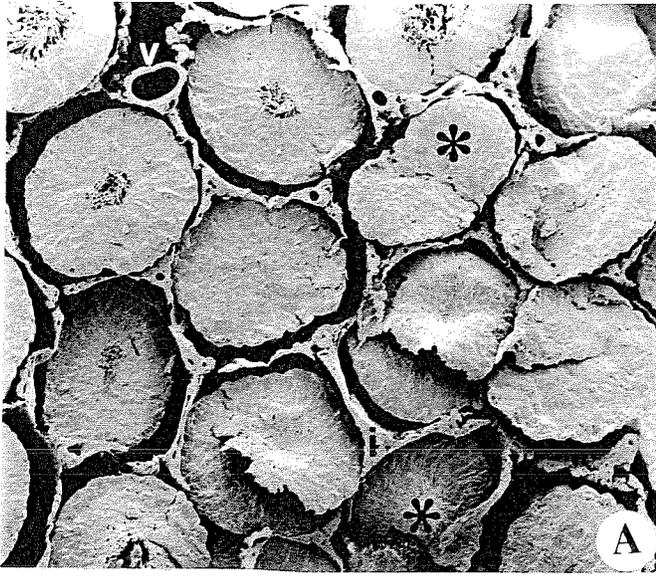
Prancha 6: Microscopia Eletrônica de Varredura de túbulos seminíferos de animais tratados com Cádmio, 5 dias (A-B); Paracetamol, 10 dias (C-D); Cádmio+Paracetamol, 15 dias (E-F).

(A-B) Túbulos deformados (*), e túbulo com muitos espermatozóides (s) na luz. Vasos dilatados (v) e tecido intersticial evidente (i). A=190 x e B=630 x

(C-D) Vasos dilatados (v) e envolvido pelo tecido intersticial evidente (i). Espermatozóides (s) podem ser identificados nos túbulos. C=260 x e D= 300 x

(E-F) Túbulo deformado (*), desprendimento de células da camada basal (seta), vaso dilatado (v) e tecido intersticial (i) fibrilar. E=425 x e F= 230 x

Prancha 6



IV. 3. Resultados em Microscopia eletrônica de transmissão

Nos animais controles após 5 dias do início do experimento, verificou-se a presença de células de Sertoli com seus prolongamentos celulares envolvendo espermatogônias, espermatócitos e espermatídes avançadas ou alongadas na região basal dos túbulos seminíferos (Figs. 7 A e 7 B).

Na região intermediária notou-se a presença de várias espermatídes redondas em fase inicial com notável complexo de Golgi, e os prolongamentos de células de Sertoli envolvendo estas células e as espermatídes alongadas, após 10 dias do tratamento (Fig. 7 C). Em alguns locais adluminais, os prolongamentos de células de Sertoli foram vistas fragmentadas entre as espermatídes (Fig. 7 D).

Na região adluminal observaram-se gotículas lipídicas no citoplasma de espermatídes alongadas em vários planos de corte, e axonemas com filamentos densos periféricos presentes na peça intermediária da cauda (Fig. 7 E). Alguns axonemas e espermatídes alongadas ainda imersas no seu citoplasma em processo de eliminação, juntamente com as gotículas lipídicas aparecem, em animais controles após 15 dias do tratamento (Fig. 7 F).

Em animais tratados com única dose de 3,0 μ moles/Kg de cádmio foram observados, após 5 dias do tratamento, o afastamento entre as células, deixando grandes espaços celulares onde o contato é mantido apenas através de complexos juncionais em determinados locais (Fig. 8 A). Anormalidades como áreas com espermatídes morfológicamente alteradas, núcleos de espermatídes alongadas não condensados e prolongamentos de células de Sertoli fragmentados foram vistos (Fig. 8 B1, 8 B2).

Após 10 dias, algumas espermatídes foram encontradas próximas ao corpo celular de células de Sertoli na região basal (Fig. 8 C), e espermatídes alongadas com alteração da peça intermediária ocorrem após este período (Fig. 8 D).

Após 15 dias, a região adluminal apresentou espermátides alongadas aparentemente normais e axonemas deformados ainda com bastante citoplasma remanescente (Fig. 8 E). Locais menos afetados com espermátides avançadas normais, presença de gotículas lipídicas, e Complexo de Golgi foram observados circundados por prolongamentos de célula de Sertoli fragmentados (Fig. 8 F).

Em animais tratados com dose única de 4,4 mmoles/kg de paracetamol verificou-se a presença na região basal do epitélio, de células de Sertoli cujo citoplasma é rico em Retículo Endoplasmático Rugoso e gotículas lipídicas. O fenômeno de perda de contato observado entre as células foi menos intenso (Fig. 9 A). Na região intermediária, espermátides formando o acrossomo e espermátides alongadas estão presentes entre células de Sertoli fragmentadas (Fig. 9 B).

Após 15 dias do tratamento a fragmentação dos prolongamentos de células de Sertoli na região basal dos túbulos seminíferos foi evidente, próxima à espermatogônias e espermatócitos (Fig. 9 C). O núcleo de espermátides com a cromatina pouco condensada foi observada penetrando na região do corpo da célula de Sertoli, próxima a gotículas lipídicas (Fig. 9 D).

Na região intermediária foram verificadas, muitas células com o Complexo de Golgi bem desenvolvido, e prolongamentos de células de Sertoli bastante fragmentados (Fig. 10 E). Um Complexo de Golgi bem desenvolvido foi observado próximo ao Retículo Endoplasmático Rugoso, em maior aumento (Fig. 10 F).

Na região adluminal foram observadas espermátides alongadas cuja peça intermediária ainda encontra-se envolvida por grande quantidade de citoplasma com Retículo Endoplasmático, Complexo de Golgi e gotículas de lipídios. As células de Sertoli são fragmentadas entre espermátides morfológicamente alteradas (Fig. 10 G). Retículo Endoplasmático Rugoso desenvolvido e presença de grandes vacúolos foram vistos em maior aumento (Fig. 10 H).

Lacunas entre células foram observadas em vários locais. Na região intermediária do epitélio seminífero, verificou-se a presença de lacuna parcialmente revestida por célula de Sertoli, e espermátides alongadas com alteração morfológica da peça intermediária (Fig. 10 I). Algumas espermátides bastante afetadas foram vistas com cromatina não

condensada e o acrossomo incompleto. Verificou-se também, a presença de Complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático no citoplasma residual (Fig. 10 J).

No tratamento com cádmio + paracetamol foi verificado após 5 dias, a fragmentação de células de Sertoli, espermátocito separado das células vizinhas e presença de grande gotícula lipídica (Fig. 11 A). Na região intermediária foi observada a presença de espermátides em fase inicial com Complexo de Golgi (Fig. 11 B1), assim como espermátides totalmente deformadas (Fig. 11 B2).

Em 10 dias, verificou-se também a fragmentação da célula de Sertoli na região basal, e a presença de espermátocito que mantém contato com a célula de Sertoli apenas através de algumas junções. Malformações nucleares foram verificadas, como em espermátides com ausência de núcleo, sendo evidente apenas o acrossomo (Fig. 11 C), e espermátides alongadas com núcleo não condensado (Fig. 11 D1). Na região intermediária da camada do epitélio seminífero observou-se a presença de grandes vesículas com restos celulares, e o Complexo de Golgi bem desenvolvido (Fig. 11 D2). O Retículo Endoplasmático Rugoso e Complexo de Golgi apresentaram-se desenvolvidos em vários tipos celulares (Fig. 11 D3).

Próximo à região adluminal foram vistas espermátides em fase inicial com Complexo de Golgi e espermátides alongadas em diferentes planos de corte sem alterações morfológicas (Fig. 11 E1). Espermátides alongadas normais em corte longitudinal juntamente com espermátides com ausência de núcleo sendo evidente apenas o acrossomo e o axonema encontram-se presentes (Fig. 11 E2). Várias espermátides alongadas sem condensação cromatínica também ocorrem nestas amostras (Figs. 11 F1 e 11 F2).

Após 30 dias, a região intermediária do epitélio seminífero mostrou-se sem alterações com presença de espermátides redondas e em fase de alongamento (Fig. 12 G1). Uma espermátide alongada morfológicamente alterada também foi observada (Fig. 12 G2).

Algumas espermátides com alteração no acrossomo, e axonema com grande quantidade de citoplasma residual foram vistas com 50 dias da administração do cádmio + paracetamol (Fig. 12 H).

Ainda com 70 dias, a região basal do epitélio seminífero apresentou alterações como célula de Sertoli fragmentada e evidente separação das células, próxima a uma célula de Sertoli com perda nuclear (Fig. 12 I). Na região intermediária foram observadas espermátides redondas e alongadas normais (Fig. 12 J).

Fragmentação de células de Sertoli entre espermátides alongadas envolvidas em grande quantidade de citoplasma residual e repletas de gotículas lipídicas, foram observadas na região adluminal (Fig. 12 K). Logo abaixo desta camada foram observadas algumas espermátides com alteração no acrossomo ao lado de células normais (Fig. 12 L).

IV. 4. Abreviações

l= lipídios

c= citoplasma residual

a= acrossomo

lc= lacuna

G= Complexo de Golgi

S= célula de Sertoli

rr= Retículo Endoplasmático Rugoso

sa= espermátides alongadas

si= espermátides redondas

sg= espermatogônia

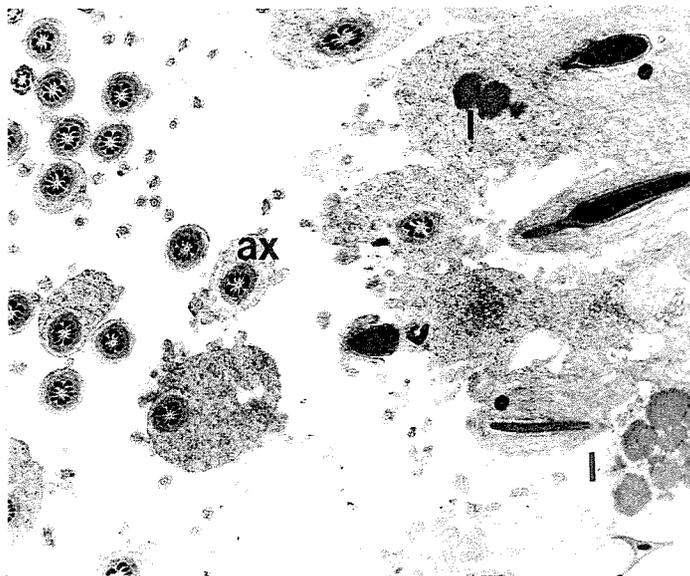
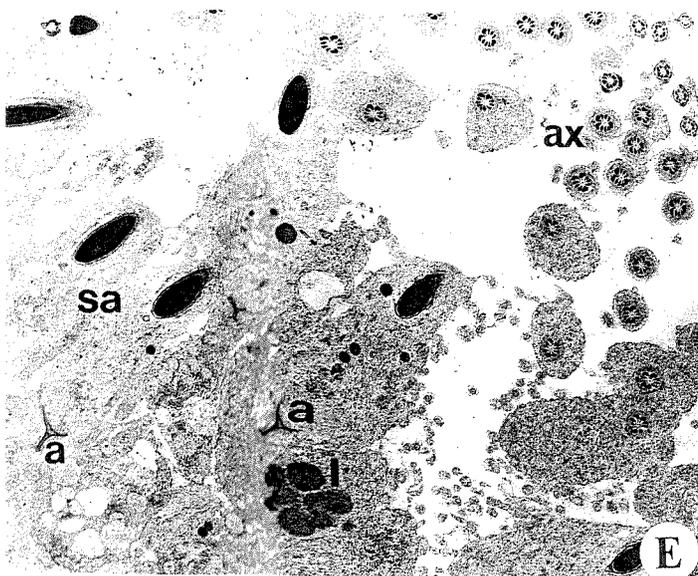
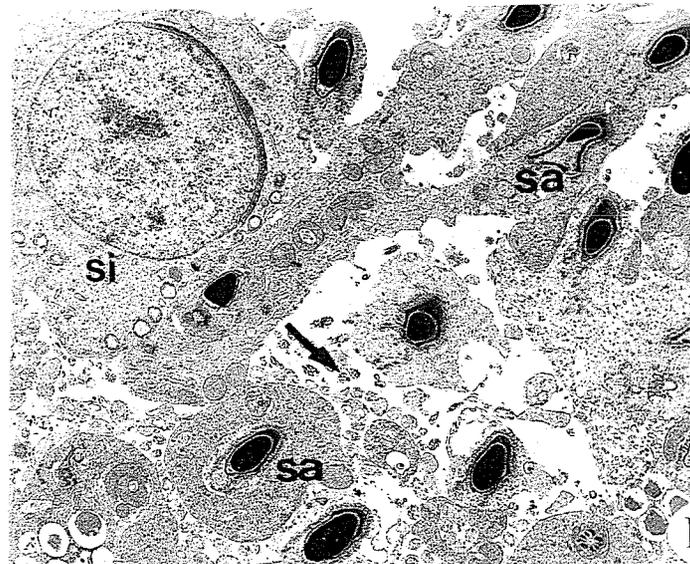
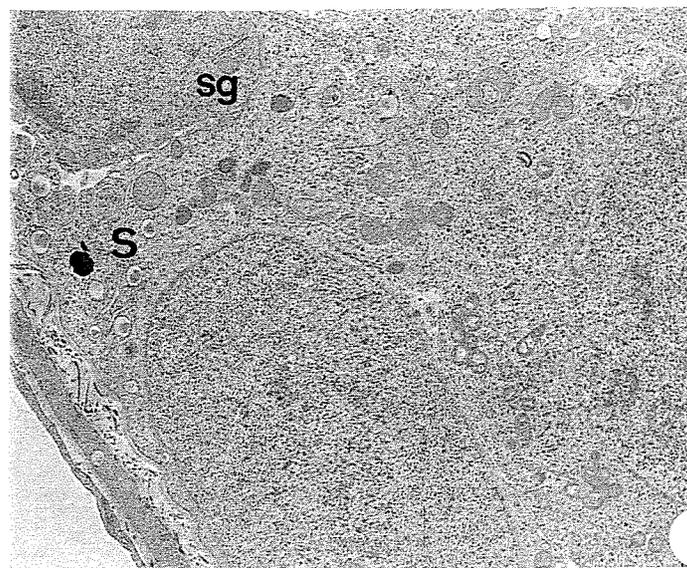
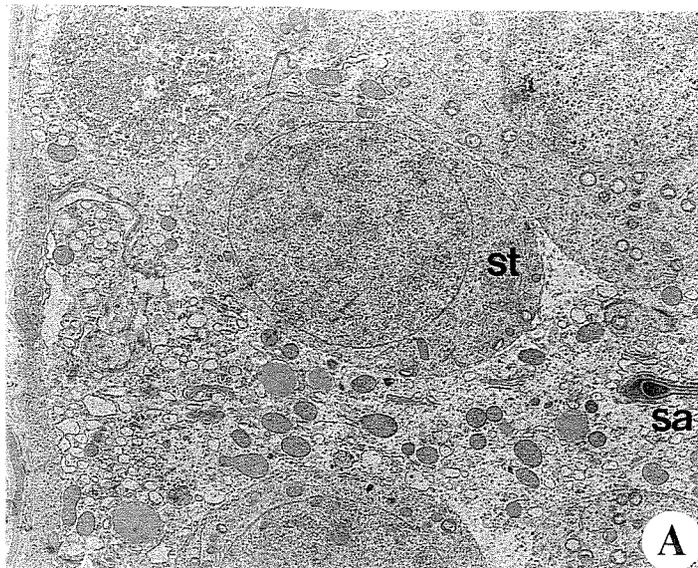
st= espermatócito

ax= axonema

Prancha 7: Cortes transversais de túbulos seminíferos de animais controles, observados após 5 dias (A-B); 10 dias (C-D), 15 dias (E-F).

- (A-B)** Epitélio seminífero com a presença de espermatogônia (sg), espermatócitos (st), célula de Sertoli (S), e espermátide alongada (sa). A,B=4960 x
- (C-D)** Região intermediária com espermátides alongadas (sa) e espermátides redondas (si), com Complexo de Golgi em vários planos de corte. Fragmentação de célula de Sertoli (seta) entre espermátides alongadas. C=2970 x e D=4960 x
- (E-F)** Gotículas lipídicas (l), espermátides alongadas (sa), acrossomos (a), e axonemas (ax) com fibras densas axiais periféricas envolvidas por bainha fibrosa, e alguns com citoplasma presentes na região adluminal. E=3840 x e F=4960 x

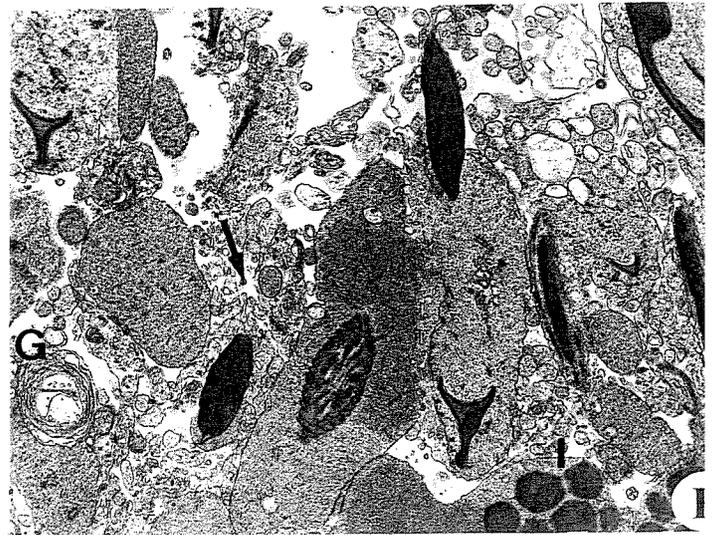
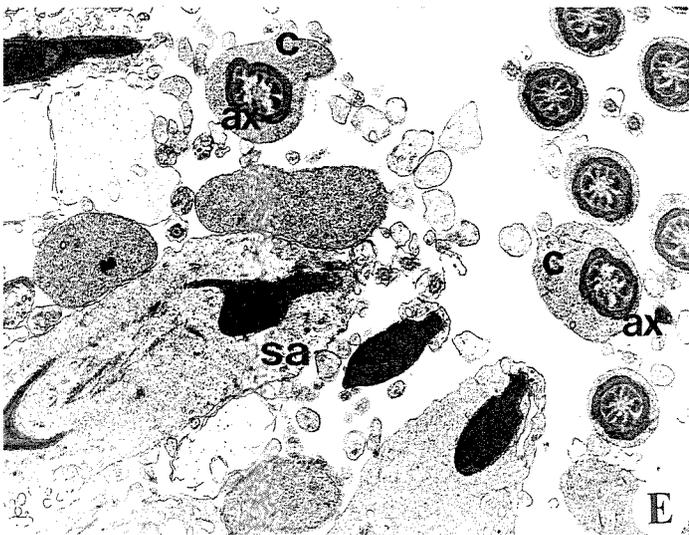
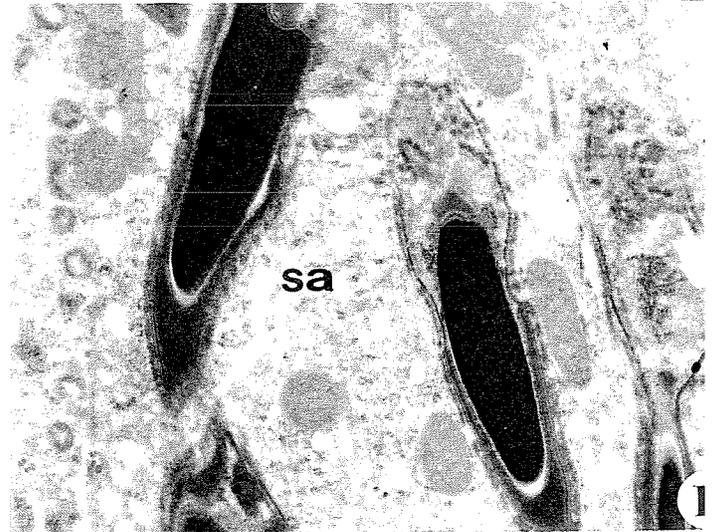
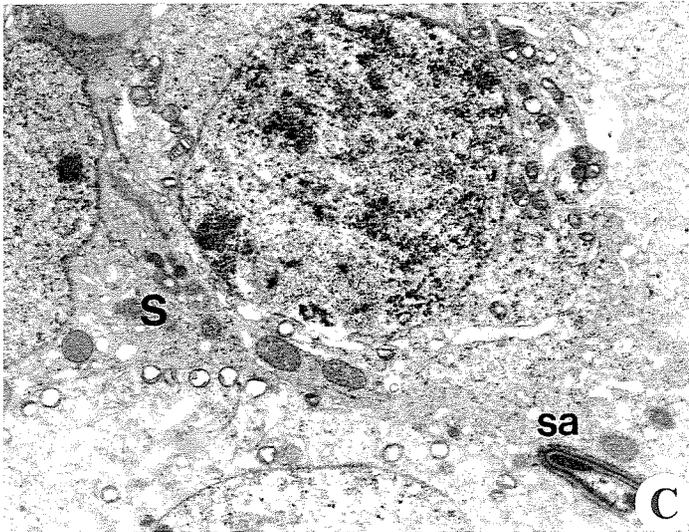
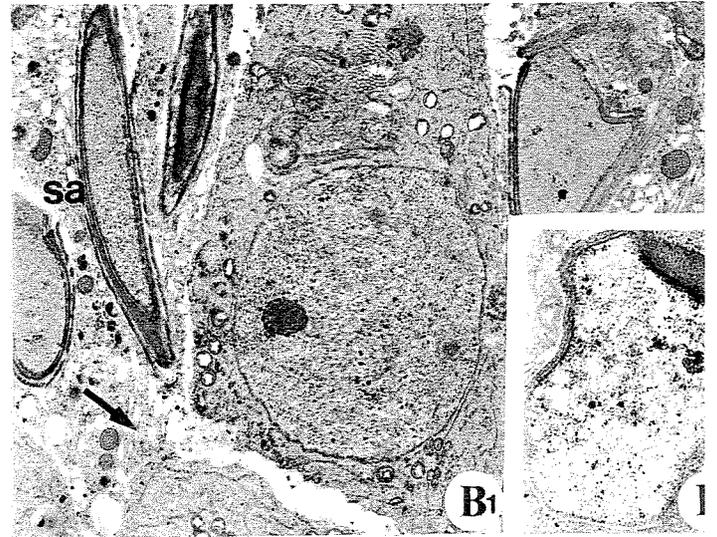
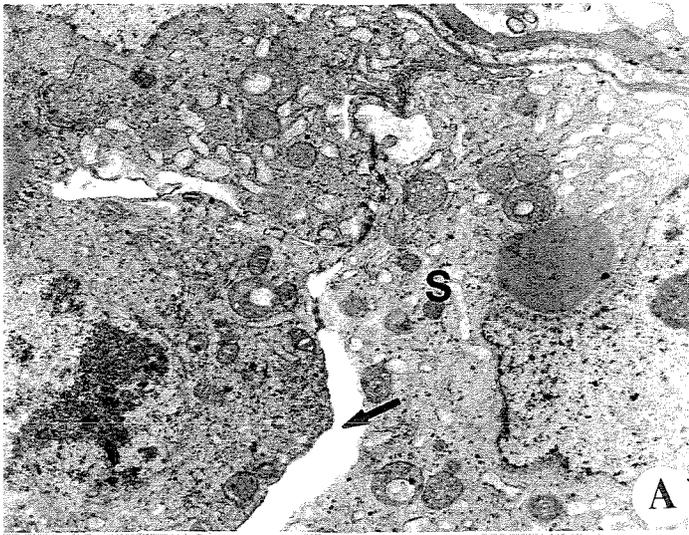
Prancha 7



Prancha 8: Cortes transversais de animais tratados com cádmio, observados após 5 dias (A-B); 10 dias (C-D); 15 dias (E-F).

- (A-B)** Região basal com a presença de grandes espaços entre as células (seta), próximos à região nuclear de célula de Sertoli (S). **(B1)** Espermatídes alongadas (sa) com ausência de condensação cromatínica, presentes entre células de Sertoli fragmentadas (seta) próximos à região adluminal. **(B2)** Espermatíde redonda com alteração morfológica e ausência de condensação cromatínica; acrossomo (a). A, B 2=7900 x e B 1=4700 x
- (C-D)** Região basal com espermatídes alongadas (sa) próximas ao núcleo de célula de Sertoli (S). Espermatídes com alteração na peça intermediária (sa), presentes próximas à região adluminal. C=6100 x e D=13200 x
- (E-F)** Região adluminal com espermatídes alongadas (sa), em diferentes planos de corte, axonemas (ax) alterados morfológicamente, e presença de grande quantidade de citoplasma residual ao redor (c). Notar fragmentação de célula de Sertoli (seta) e a presença de gotículas lipídicas (l) e Complexo de Golgi (G). E, F=7900 x

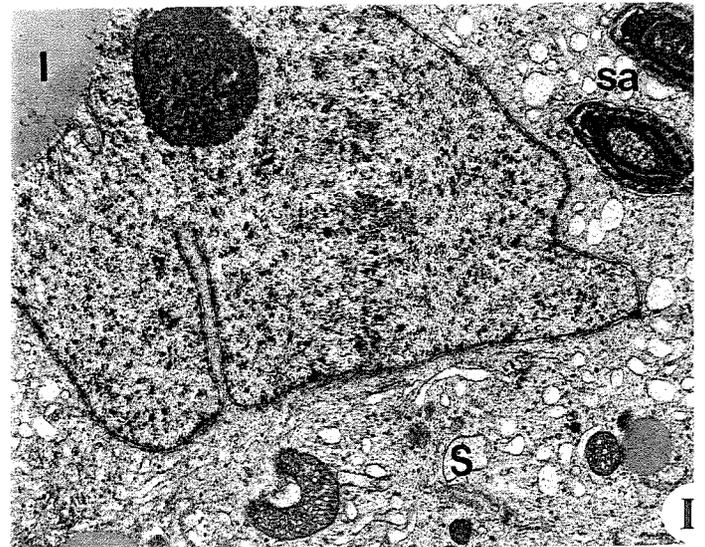
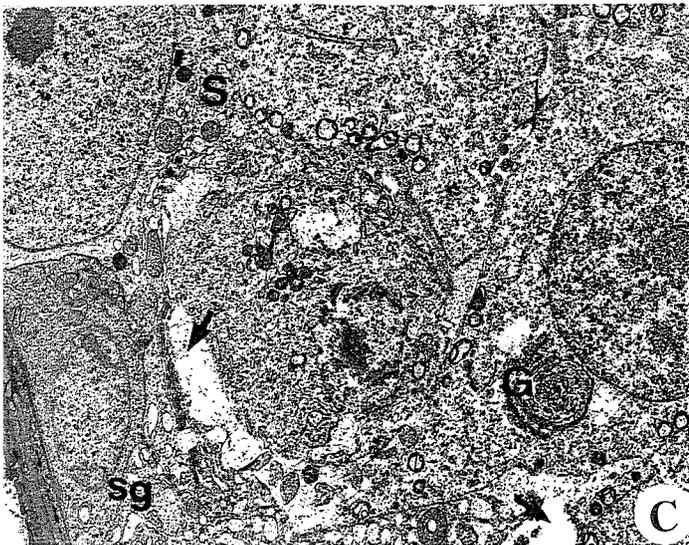
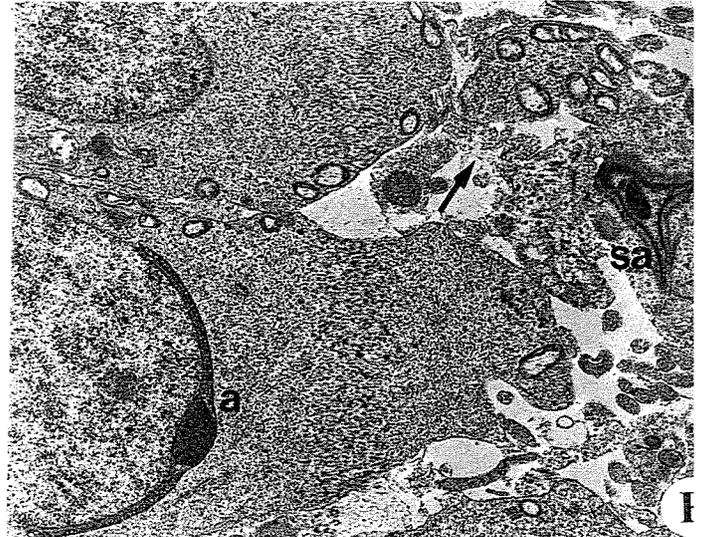
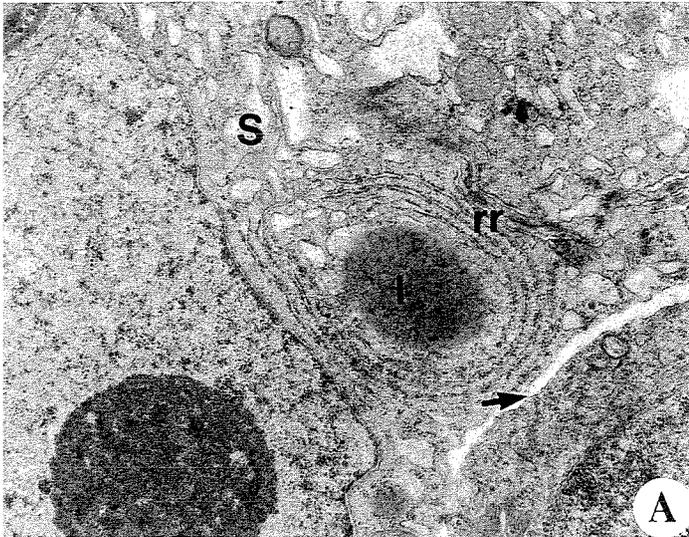
Prancha 8



Prancha 9: Cortes transversais de animais tratados com paracetamol, observados após 5 dias (A-B) e 15 dias (C-D).

- (A-B)** Região basal com a presença de célula de Sertoli (S), Retículo Endoplasmático Rugoso (rr) e gotícula lipídica (I). Notar discreta separação entre as células (seta). Também podem ser vistas espermátides alongadas (sa) e espermátides com acrossomo (a) em formação, entre prolongamentos de célula de Sertoli fragmentada (seta). A=13200 x e B=6100 x
- (C-D)** Região basal com célula de Sertoli (S), espermatogônia (sg) e espermatócitos com Complexo de Golgi (G). Notar os espaços entre as células (seta). Espermátides alongadas (sa) com condensação cromatínica irregular encontram-se próximas a corpo da célula de Sertoli (S) e gotícula lipídica (I). C=4700 x e D=7900 x

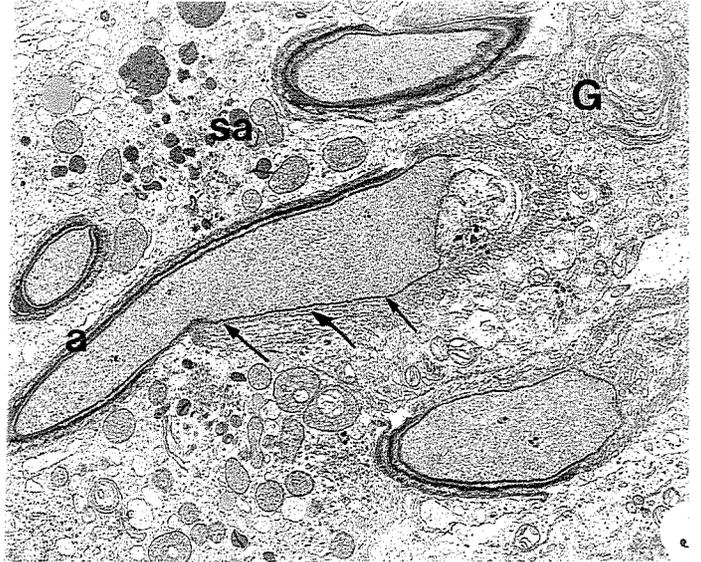
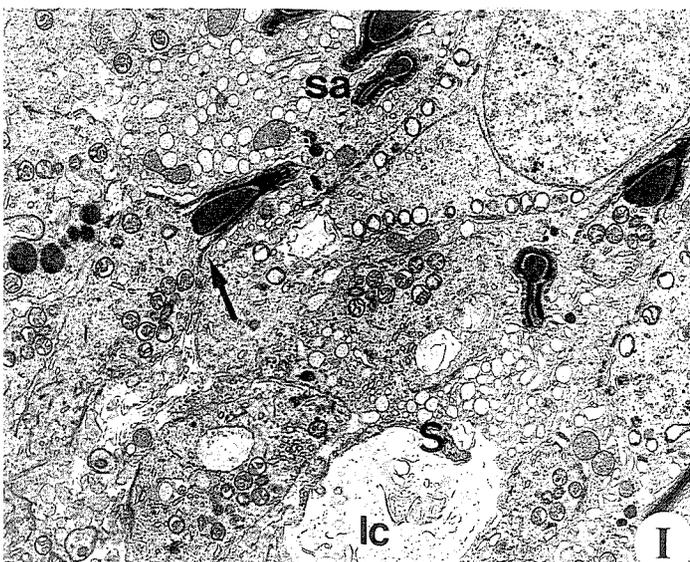
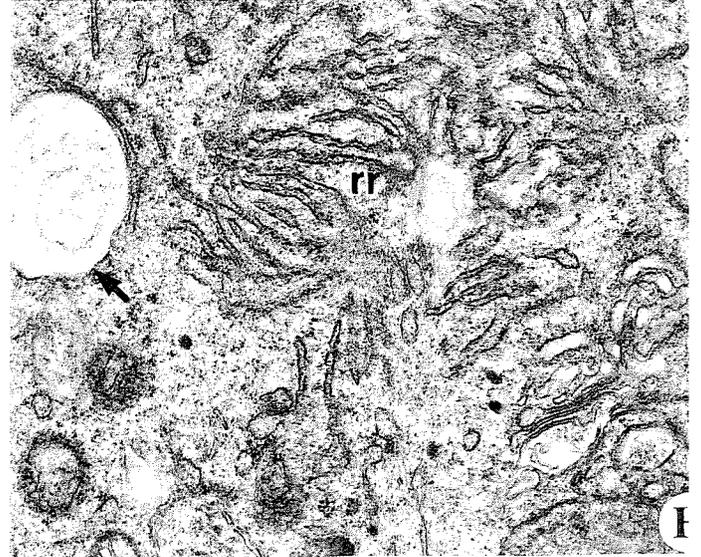
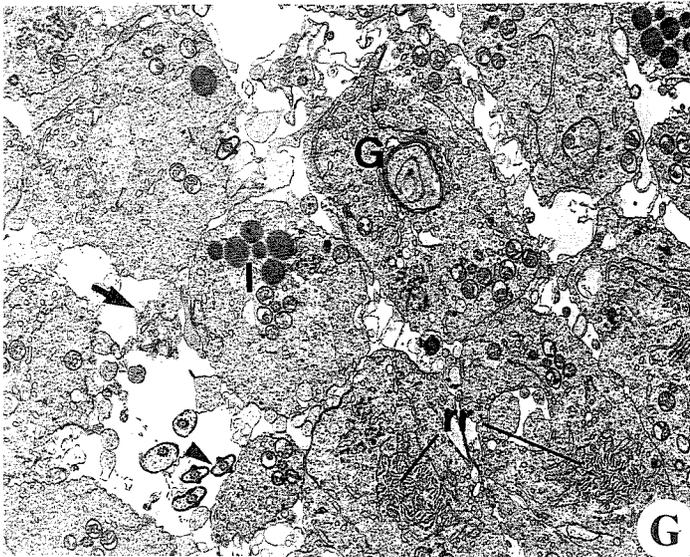
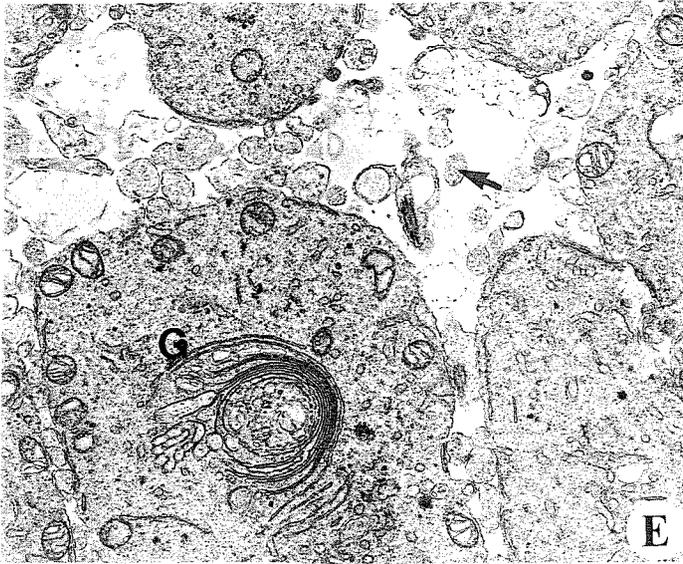
Prancha 9

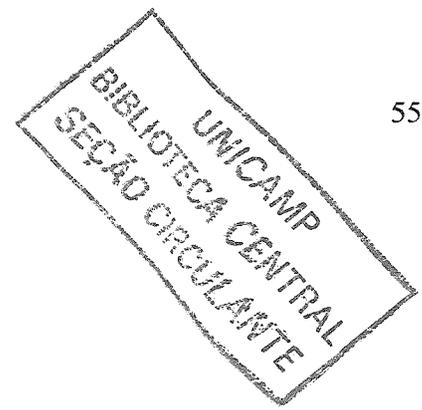


Prancha 10: Cortes transversais de animais tratados com paracetamol, observados após 15 dias (E-J).

- (E-F)** Espermátides alongadas com Complexo de Golgi (G) bem desenvolvido, Retículo Endoplasmático Rugoso (rr), e prolongamentos de células de Sertoli fragmentados (seta). E=7900 x e F=22000 x
- (G-H)** Células de Sertoli fragmentadas (seta), entre flagelos morfologicamente alterados (ponta de seta). Espermátides com grande quantidade de Retículo Endoplasmático Rugoso (rr) e Complexo de Golgi (G) bem desenvolvidos e grande vacúolo (seta). G=4700 x e H=22000 x
- (I-J)** Região intermediária com a presença de espermátides alongadas (sa) com alteração morfológica na peça intermediária (seta). Uma lacuna (lc), com restos celulares, parcialmente envolvidos por prolongamento de célula de Sertoli (S). Notar espermátides alongadas, com núcleo sem condensação cromatínica, além de acrossomo (a) incompleto a partir de determinada região (setas). Presença de Complexo de Golgi (G) e Retículo Endoplasmático Rugoso (rr) em espermátides alongadas. I=4700 x e J=5300 x

Prancha 10

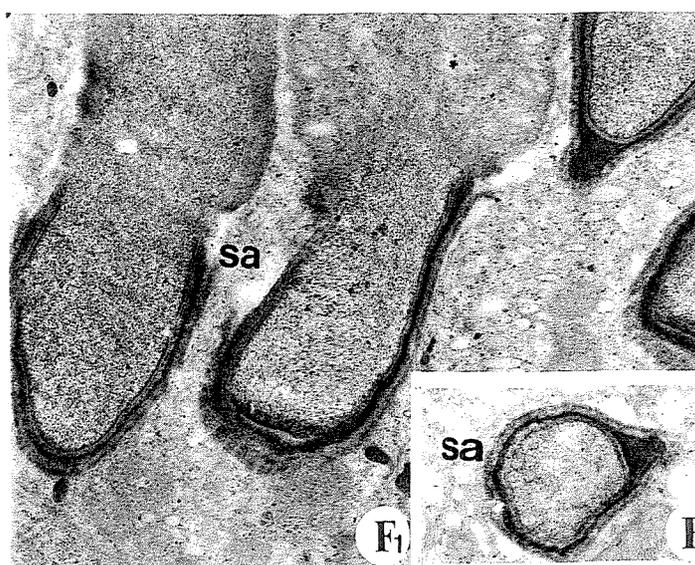
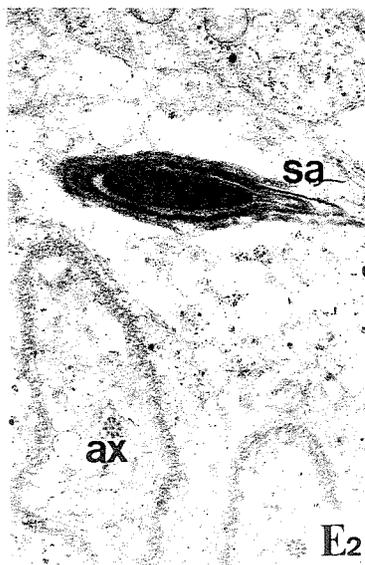
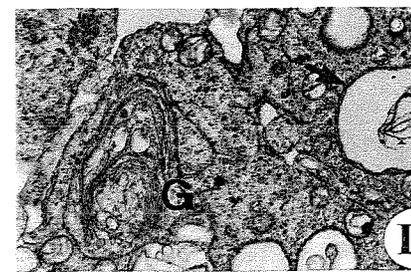
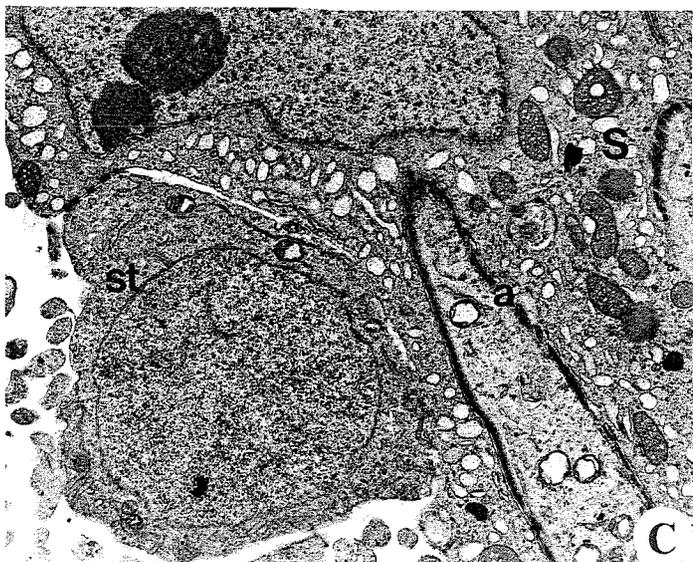
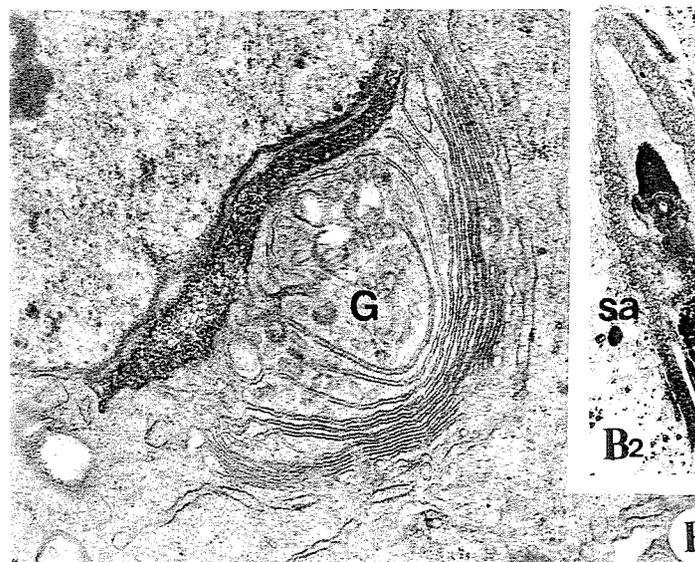
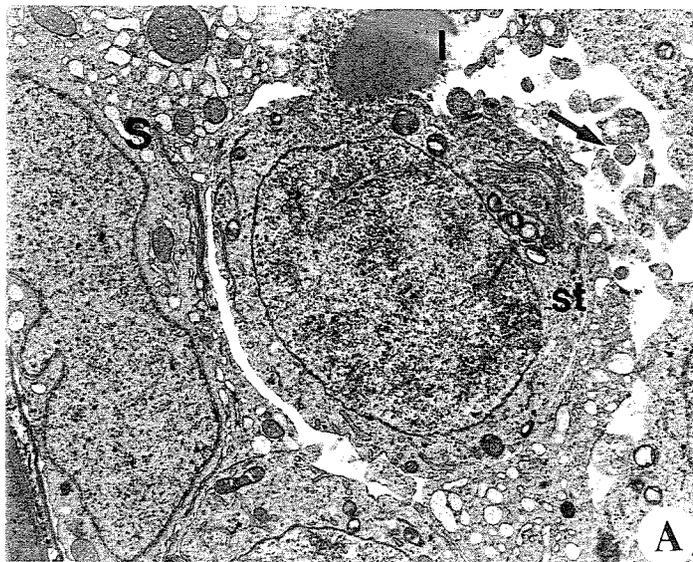




Prancha 11: Cortes transversais de animais tratados com cádmio + paracetamol, observado após 5 dias (A-B); 10 dias (C-D); 15 dias (E-F)

- (A-B)** Região Basal com célula de Sertoli (S), grande gotícula lipídica (l) e espermatócito (st). Notar fragmentação de célula de Sertoli (seta). **(B1)** Espermátide em fase inicial com Complexo de Golgi (G). **(B2)** Espermátide morfológicamente alterada (sa). A=6130 x, B 1=28450 x e B 2=10220 x
- (C-D)** Região basal com núcleo de célula de Sertoli (S), espermatócito (st) e espermátide com ausência de núcleo. **(D1)** Espermátides alongadas (sa) com alteração morfológica e com variação na condensação da cromatina. **(D2)** Região intermediária do epitélio, com Complexo de Golgi (G) e várias vesículas com restos celulares (seta). **(D3)** Complexo de Golgi (G) e Retículo Endoplasmático Rugoso (rr) bem desenvolvidos. C,D 2=7900 x, D 1=13200 x e D 3=10220 x
- (E-F)** Espermátide em fase inicial com Complexo de Golgi (G) e acrossomo (a) de espermátide alongada. Espermátide alongada (sa) próxima à região adluminal. Notar acrossomo com axonema (ax) e ausência de núcleo (E 1 - E 2). Várias espermátides alongadas (sa) morfológicamente alteradas e com ausência de condensação cromatínica (F 1 - F 2). E 1=6130 x ; E 2,F 1 e F 2=10220 x

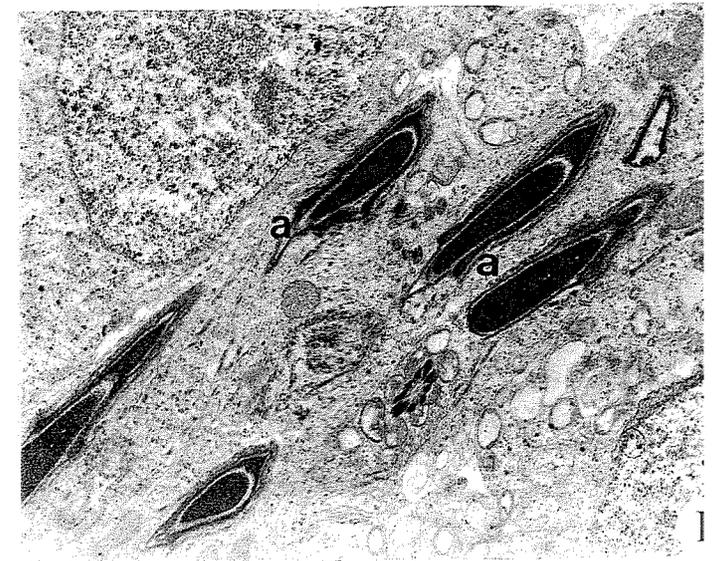
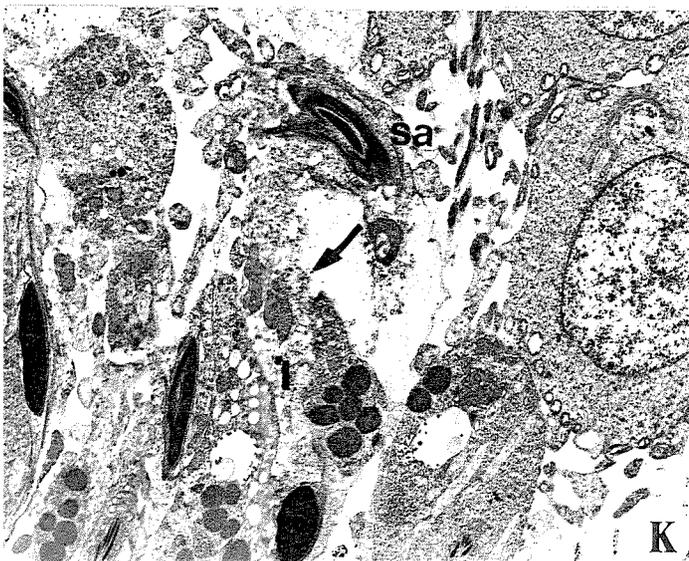
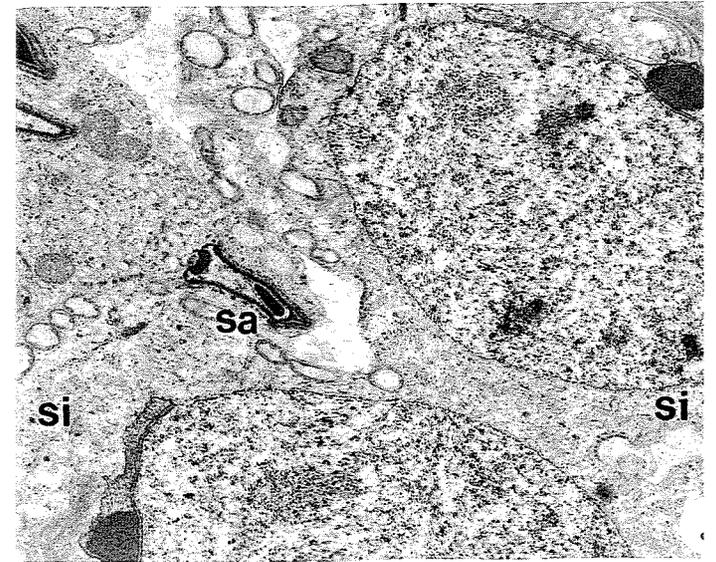
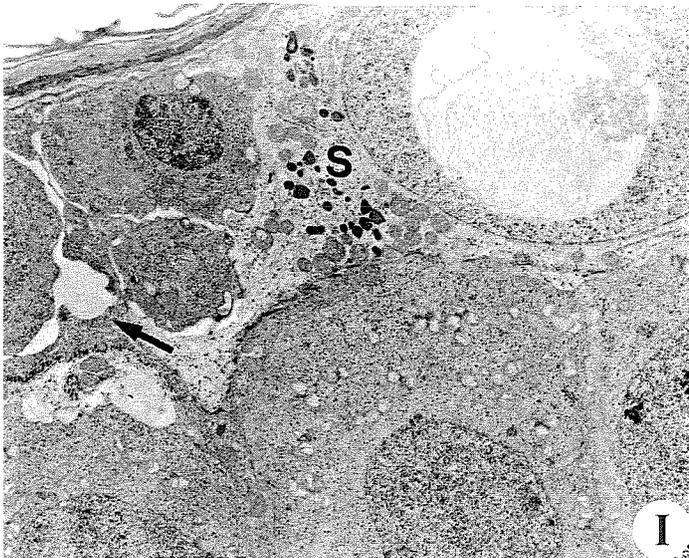
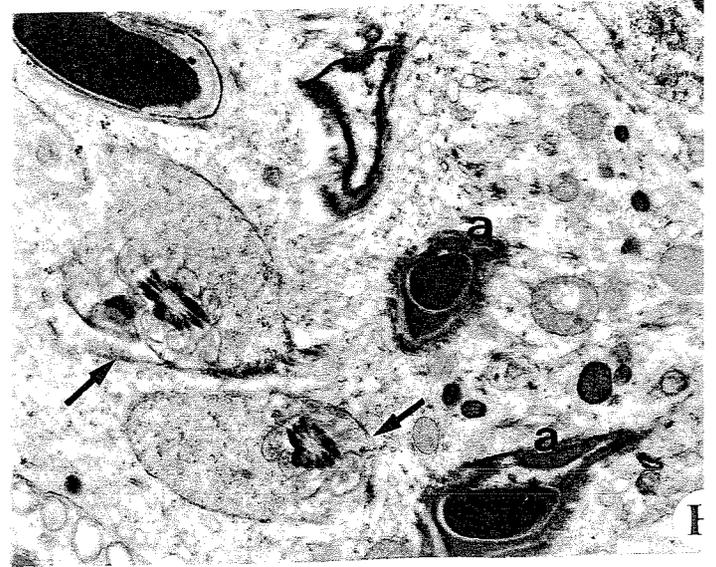
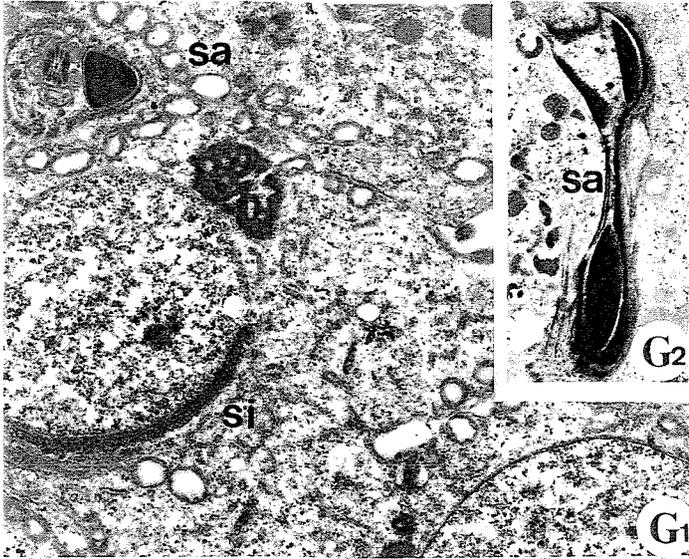
Prancha 11



Prancha 12: Cortes transversais de animais tratados com cádmio + paracetamol, vistos após 30 dias (G), 50 dias (H); 70 dias (I-L).

- (G 1)** Região intermediária do epitélio seminífero com a presença de espermátide redonda (si), e em fase de alongamento (sa). **(G2)** Espermátide alongada (sa), morfológicamente alterada G 1=7900 x e G 2=6130 x
- (H)** Com 50 dias, ainda observa-se espermátides com alterações do acrossomo (a) e axonemas envoltos por muito citoplasma residual (setas). 10220 x
- (I-J)** Região basal com fragmentação de algumas células de Sertoli (seta) e célula de Sertoli (S) com perda nuclear. Região intermediária do epitélio com espermátides alongadas (sa) e espermátides redondas (si). I=4700 x e J= 7900 x
- (K-L)** Fragmentação de célula de Sertoli (seta), espermátides alongadas (sa) envolvidas por citoplasma residual e gotículas lipídicas (l) encontram-se na região adluminal. Espermátides alongadas com pequena alteração do acrossomo (a) vistos na região intermediária do epitélio seminífero. K=3600 x e L=7900 x

Prancha 12



V. Discussão

Nos últimos anos, fortes evidências sugerem a perda da função testicular, através de análises que revelam a diminuição da espermatogênese normal frente a fatores ambientais (Pajarinen *et al.*, 1997 apud Aitken, 1999; Irvine, 2000). Vários fatores podem interferir na espermatogênese, entre eles agentes químicos como medicamentos e elementos tóxicos, provenientes da poluição ambiental, como o cádmio (Pereira, 2000b).

No presente trabalho, procuramos analisar aspectos morfológicos da espermatogênese de animais submetidos ao tratamento com cádmio e/ou paracetamol através das técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

Parížek & Záhör (1956), foram os primeiros a estudarem a ação do cádmio sobre os túbulos seminíferos e verificaram que o cádmio altera a integridade das junções de células de Sertoli, ocasiona severo edema testicular seguido de hemorragia e necrose dos túbulos seminíferos.

Entre os vários trabalhos realizados com o cádmio, tem-se estudado a especificidade da lesão inicial com o conseqüente agravamento dos danos ao tecido. No entanto, o presente trabalho não visa estudar a origem da lesão, e sim a lesão resultante no tecido como um todo.

São várias as hipóteses propostas para explicar a ação do cádmio nos túbulos seminíferos entre eles, necrose hemorrágica, anoxia, aumento da permeabilidade vascular e ação direta do cádmio sobre os túbulos seminíferos. No entanto, não existe um consenso sobre o preciso mecanismo da ação do cádmio na patofisiologia testicular (Aoki & Hoffer, 1978).

Trabalhos têm propostos a atrofia testicular como conseqüência de vários fatores interdependentes desencadeados pelas lesões no endotélio testicular. O cádmio interfere na coesão intercelular do endotélio e aumenta o fluxo de fluídos e eletrólitos dos vasos para o tecido intersticial (Aoki & Hoffer, 1978).

Em nossos estudos foi verificada a presença de edema em todos os períodos do tratamento com o cádmio. Cabral (1996), também observou discreto edema, congestão

de vasos, mas nenhuma alteração quando ao padrão normal do epitélio seminífero quando administrado a dose de $2,5\mu\text{moles}$ de cádmio.

Segundo Aoki & Hoffer (1978) e Gouveia (1988), danos testiculares observados pela contaminação aguda de cádmio são devidos às alterações na microcirculação. O edema testicular é uma direta consequência da interrupção da integridade dos vasos e maciço vazamento para o interstício de fluidos originados do plasma sanguíneo. Os danos endoteliais estimulam a liberação de fatores hemostáticos e agregação de plaquetas, ao mesmo tempo há o aumento da permeabilidade dos capilares, retardo do fluxo sanguíneo, aumento da viscosidade e aglutinação de eritrócitos (Baumgartner et al., 1976 apud Aoki & Hoffer, 1978). O resultado é a formação de trombos e obstrução da microcirculação levando a isquemia dos testículos, estado previsível frente à obstrução da microcirculação (Harrison, 1949 apud Aoki & Hoffer, 1978).

Norlan & Shaikh (1986), também propõem que a toxicidade do cádmio se deve à interação inicial do metal com o endotélio vascular de órgãos susceptíveis, originando as subseqüentes lesões aos túbulos seminíferos. Paralelamente a este processo foi verificado que as células endoteliais resistentes ao cádmio proliferam e regenera a vascularidade dos vasos adquirindo subseqüente resistência ao metal cádmio (Schlapferr, 1971; Gabbiani et al., 1967; Gunn et al., 1966 apud Norlan & Shaikh, 1986).

A obstrução da luz vascular é a causa mais freqüente de isquemia em órgãos e estruturas circundadas por cápsula. A perda do suprimento de oxigênio resulta em condições de susceptibilidade às lesões provocadas por reações oxidativas que liberam oxigênio reativo, sendo este o principal fator de mudanças patológicas (Pereira, 2000a).

Como relatado, trabalhos têm proposto que os danos nos túbulos seminíferos se devem ao vazamento dos vasos sanguíneos levando ao aumento da pressão intratesticular e posterior isquemia. Enquanto mudanças vasculares e necrose isquêmica foram propostas como possível mecanismo de ação do cádmio nos testículos (Mason et al., 1964 apud Hew et al., 1993; Cabral, 1996), outros estudos sugerem que a barreira de permeabilidade dos túbulos seminíferos é comprometida pelo cádmio antes que os danos vasculares ocorram (Setchell & Waites, 1970). E o efeito deletério do cádmio diretamente no tecido germinativo sem a influência da isquemia foi verificado por Lombello (1996).

No tratamento com o cádmio observamos túbulos seminíferos que sofreram degeneração e alterações morfológicas. As alterações verificadas são possivelmente decorrentes da isquemia induzida pelos danos vasculares, assim como proposto por Gouveia (1988), a qual a isquemia poderia ser o responsável pela necrose do epitélio germinativo e das células de Leydig levando a uma castração química pelo cádmio.

No nosso experimento, a maior descamação celular que observamos nos túbulos seminíferos de animais submetidos ao tratamento com o cádmio em relação aos animais controles, confirma os resultados de Gouveia (1988) e Aoki & Hoffer (1978), e deve-se ao desprendimento de células jovens da camada basal. Em microscopia eletrônica de transmissão esse desprendimento celular pode ser observado pela perda do contato das células do epitélio germinativo em consequência da fragmentação de células de Sertoli na região basal e próximo a região adluminal. O destacamento de células jovens foi observado através de micrografias eletrônicas do material tratado com cádmio e paracetamol isoladamente ou associados.

Nos animais controle o epitélio seminífero foi observado com estratificação típica de células em graus progressivos de desenvolvimento e na luz de alguns túbulos foi verificado um aumento de células imaturas descamadas em relação ao que é normalmente observado. O "stress" inicial devido à simulação de injeção e gavagem do veículo teria estimulado um aumento de células imaturas liberadas para a luz tubular. Esta é uma freqüente resposta a situações de "stress" (Lombello, 1996).

Sabe-se que vários agentes tóxicos, entre eles o metal cádmio são conhecidos por agir principalmente sobre as células de Sertoli (Janecki *et al.*, 1992; Alexander *et al.*, 1996; Robbins *et al.*, 1997 apud Monsees *et al.*, 2000). E a alteração na função das células de Sertoli causada por agentes químicos ocasiona danos à espermatogênese como a perda das células germinativas e em alguns casos a consequente infertilidade (Boekelheide, 1993 apud Monsees *et al.*, 2000).

Hew e colaboradores (1993), demonstraram a desorganização de feixes de microfilamentos associados às células de Sertoli em ratos submetidos ao cádmio na concentração de 1mg/kg. E com base na presença de espermátides tardias próximas à

região basal aqueles autores concluíram que a ação do cádmio é específica para determinado estágio espermato gênico induzindo a falha da espermiacão.

Muitos trabalhos têm demonstrado o estágio VIII do ciclo do epitélio como sendo um estágio crítico, que compreende a liberação das espermátides associadas às células de Sertoli, fase final da espermatogênese (Leblond *et al.*, 1952).

Observamos a presença de algumas espermátides adiantadas ou alongadas próximas à região basal do túbulo seminífero, no entanto, nenhum estudo sobre o estágio do ciclo do epitélio foi realizado para determinar quando ocorre a falha na espermiacão, como visto por Hew *et al.* (1993). Em contrapartida, a presença de espermátides sem condensação cromatínica e com alterações morfológicas verificadas em todos os períodos do experimento provavelmente induz a falha da espermiacão.

Estudos têm verificado que o cádmio induz a fragmentação do DNA apoptótico em testículos de ratos Wistar. "In vitro" têm-se mostrado que este processo é caracterizado por mudanças que ativam endonucleases como resultado de alterações na concentração do íon cálcio intracelular (Xu *et al.*, 1996).

Outro fator que prejudica a espermiacão é a quantidade de citoplasma residual acima do normal observado no tratamento com o cádmio em alguns túbulos, e presentes em axonemas morfológicamente alterados. Isso demonstra que o mecanismo de extrusão citoplasmática é prejudicado aparentemente em conseqüência ao atraso do processo de espermatogênese. Diante destas circunstâncias os espermatozóides liberados durante a espermiacão podem ser imaturos e funcionalmente defeituosos como foi afirmado por Huszar *et al.*, apud Aitken (1999).

As razões para a variação da susceptibilidade de diferentes órgãos à toxicidade do cádmio não são conhecidas. No entanto, numerosos estudos sugerem o importante papel da metalotionina na disposição e detoxificação do cádmio. Uma vez que diferentes níveis de metalotionina podem ser responsáveis pela diferença de susceptibilidade dos tecidos (Klaassen *et al.*, 1999).

Recentemente, têm-se sugerido que espécies de oxigênio reativo (RSO) possuam um papel principal sobre o mecanismo de toxicidade induzido pelo cádmio. Manca *et al.* (1991), verificaram que baixas doses de cloreto de cádmio estimulam várias formas de

danos oxidativos, tais como aumento da peroxidação de lipídios e quebras no DNA (Hirano *et al.*, 1997). Outros trabalhos associam o cádmio com o aumento da peroxidação de lipídios nas membranas dos testículos e inibição do antioxidante superóxido dismutase (SOD), desencadeando danos celulares após longas exposições (Yiin *et al.*, 1999; Koizumi *et al.*, 1992).

A peroxidação de lipídios é uma hipótese interessante para explicar muitas doenças e também a toxicidade induzida por drogas. Atualmente é aceito que enzimas que metabolizam drogas estejam envolvidas na iniciação das reações de peroxidação de lipídios através de espécies de oxigênio reativo gerados por metabólitos reativos de produtos químicos, como, por exemplo, pela adição de metabólitos reativos a lipídios insaturados de membrana. A interação de ligações covalentes e não covalentes a proteínas pode estar envolvido na iniciação desse evento e uma vez iniciada a cascata de peroxidação ela prossegue pelo mecanismo de reação com radicais livres (Kappus, 1985).

Os radicais livres são produzidos no metabolismo normal das células não só na cadeia respiratória como também nos processos de oxidação catalisados por oxidases citoplasmáticas, como no sistema peroxissomal que metabolizam xenobióticos e na síntese de colágenos. Em condições normais, há um equilíbrio entre a produção e a inativação de radicais livres, o que impede o aparecimento das lesões. Quando esse equilíbrio se rompe, quer por aumento na produção de radicais livres, quer por redução nos mecanismos antioxidantes, inicia-se um processo denominado de estresse oxidativo que pode resultar em lesões (Sies, 1985). O estresse oxidativo em humanos muitas vezes é ocasionado por componentes exógenos usados como drogas terapêuticas, que interferem com o metabolismo de oxigênio (Kappus, 1985).

A peroxidação de lipídios leva ao esgotamento de mecanismo de proteção envolvendo antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione (Moore *et al.*, 1983 apud Kappus, 1985). Outra consequência seria a inativação de um grande número de enzimas de membrana e receptores, entre eles podemos citar a perda do citocromo P-450 e a inativação da cadeia respiratória (Nielsen, 1981; Natabayashi *et al.*, 1982; Imagawa *et al.*, 1982; Marshansky *et al.*, 1983). Influenciam também, estágios precoces da diferenciação celular e regulação do número de células germinativas através

de indução de apoptose ou estimulação da divisão celular das células reservas espermatogoniais (Godeus *et al.*, 1997 apud Aitken, 1999).

Nos espermatozóides, danos peroxidativos mediados por espécies de oxigênio reativo (ROS) podem levar a defeitos na função do espermatozóide, como foi observado em pacientes inférteis, e à fragmentação do DNA (Bize *et al.*, 1991; Kodoma *et al.*, 1997; Aitken *et al.*, 1996 apud Aitken, 1999). Segundo Sharma & Agarwal (1996), a reatividade intrínseca dos metabólitos peróxido de oxigênio e o ânion superóxido, causando danos peroxidativos é proposto como a maior causa da função alterada do esperma nos casos de infertilidade masculina.

Sabe-se que o plasma seminal confere alguma proteção contra danos causados por espécies de oxigênio reativo (RSO) porque contém enzimas para resíduos de espécies de oxigênio reativo (RSO), como a catalase e superóxido dismutase (SOD). Em contraposição ao papel de proteção do antioxidante superóxido dismutase (SOD), verificou-se que altos níveis desta enzima estão associados com a função alterada do esperma. Foi sugerido que isto pode ser devido aos espermatozóides humanos serem altamente susceptíveis aos efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio e o oxigênio ser um importante mediador da função normal do esperma. A alta atividade da enzima superóxido dismutase poderá refletir erro na espermatogênese, associada à esfoliação de células germinativas e retenção de citoplasma residual pelos espermatozóides (Aitken, 1999).

Embora, lipídios insaturados sejam os principais alvos na peroxidação de lipídios, outros alvos podem ser mais importantes no desenvolvimento da injúria letal celular (Kappus, 1987; Recknagel, 1983 apud Nelson & Pearson, 1990). A membrana plasmática perde sua arquitetura ultra-estrutural levando a mudanças quanto à sua fluidez e permeabilidade (Mead, 1976; Plaa *et al.*, 1976; Bridges, 1981; Kunimoto *et al.*, 1981; Slater, 1982; Weiss *et al.*, 1983). Outro efeito deletério devido à reação de peroxidação de lipídios é a liberação de enzimas hidrolíticas a partir dos lisossomos (Yagi, 1982; Hornsby *et al.*, 1983; Mak *et al.*, 1983 apud Kappus, 1987).

A grande quantidade de degeneração de membranas encontradas em nosso trabalho, além da fragmentação das células de Sertoli e alterações na compactação do

DNA em algumas espermátides podem ter sido originados por danos oxidativos como a peroxidação de lipídios na membrana plasmática.

A atenuação dos danos testiculares induzidos pelo cloreto de cádmio foi verificada através da utilização dos antioxidantes, superóxido dismutase e oxypurinol (Agarwal *et al.* 1997).

Durante anos, várias pesquisas têm indicado o efeito genotóxico do paracetamol, o analgésico e antipirético mais usado. Estudos "in vitro" e "in vivo" indicam que o metabólito reativo do paracetamol pode se ligar irreversivelmente ao DNA e causar quebras (Giri, 1993).

Entre as várias hipóteses possíveis para a toxicidade do paracetamol estão a ligação covalente a proteínas celulares, o estresse oxidativo, a interrupção da homeostase do íon cálcio e a fragmentação do DNA levando a apoptose.

Os exatos mecanismos que levam à toxicidade não são conhecidos, mas várias teorias propõem a ligação covalente do metabólito reativo do paracetamol a proteínas celulares, a qual leva à interrupção da função enzimática ou alguma via regulatória crítica, como provável mecanismo de toxicidade (Ray *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 1992; Laslin *et al.*, 1995; Hinson *et al.*, 1994; apud Neil *et al.*, 1997).

Acredita-se que o paracetamol em doses terapêuticas seja seguro, contudo, mediante as recentes evidências de tumores em camundongos submetidos à longa administração de paracetamol, tal suposição têm sido questionada (Flaks & Flaks, 1983 apud Dybing *et al.*, 1984).

O paracetamol é metabolizado tanto por vias oxidativas como por vias de conjugação. Em doses terapêuticas é metabolizado para produtos não tóxicos por glucuronidação e sulfatação (Rannug *et al.*, 1995). A fase inicial do metabolismo do paracetamol envolve a formação de glucoronato, e sulfatos conjugados que são produtos excretados. Uma pequena fração do paracetamol é oxidada pelo sistema do citocromo P-450 para formar o metabólito reativo intermediário, N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI). A detoxificação do NAPQI ocorre principalmente através da conjugação com o antioxidante glutathione. Nos casos de excessiva produção de NAPQI ocorre o esgotamento dos níveis de glutathione levando à ligação covalente do N-acetil-p-benzoquinonaimina

(NADQI) a componentes celulares e a destruição celular (Nazareth *et al.*, 1991; Rannug *et al.*, 1995).

Trabalhos demonstram a correlação entre níveis de ligação covalente do metabólito reativo N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) a proteínas celulares, resultando em extensiva necrose. Tal mecanismo é proposto para danos verificados no fígado induzidos pelo paracetamol (Michell *et al.*, 1984 apud Rannug *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1997).

A toxicidade induzida por altas doses de paracetamol, tem sido atribuída a atividade do citocromo P-450 que resulta na formação de um metabólito eletrofílico e a genotoxicidade deste metabólito, que corresponde ao intermediário reativo N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) (Dahlin *et al.*, 1984; Holme *et al.*, 1984; Dybing *et al.*, 1984 apud Brunborg *et al.*, 1995). A cadeia de citocromo P-450 pode estar envolvida na peroxidação de lipídios dos peroxissomos através do fenômeno de não acoplamento provocados por várias drogas, que levam à produção de superóxido e água, em vez de metabólitos hidroxiladas (Hildebrandt *et al.*, 1982; Orrenius *et al.*, 1982 apud Kappus, 1985).

Nos nossos experimentos, os animais tratados com paracetamol apresentaram lesões menos acentuadas quando comparados aos animais aos quais foi administrado o cádmio. A deformação e o desprendimento de células imaturas da camada basal observados em alguns túbulos seminíferos, provavelmente ocorre devido à alteração de membrana das células de Sertoli como verificado no tratamento com o cádmio.

Em todas as condições experimentais foram observadas algumas espermátides sem condensação cromatínica e espermátides jovens e morfológicamente alteradas ainda com a presença de complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Estas organelas são conhecidamente envolvidas no processo de detoxificação e a produção de proteínas de estresse (Alberts *et al.*, 1994). Estas exigências metabólicas, somadas suas funções normais durante a espermatogênese, podem estar contribuindo para o atraso no desenvolvimento das espermátides.

O espessamento da camada do epitélio seminífero, devido ao aumento da quantidade de citoplasma residual retida pelas espermátides, foi visto principalmente em animais após o período mais longo de tratamento (15 dias). Este aumento da camada

germinativa leva a uma aparente melhora morfológica dos túbulos em relação aos animais após 5 dias do tratamento. No entanto o aumento de citoplasma residual é indicativo de uma alteração do mecanismo de extrusão citoplasmático pelo paracetamol como também foi visto com o tratamento com cádmio.

Vários estudos também têm verificado que exposições a doses terapêuticas e não terapêuticas de paracetamol causam detenção do ciclo celular com diminuição do número de espermatócitos em paquíteno, mudanças nos vários estágios de populações de espermátides e, aparente alteração na estrutura cromatínica dos espermatozóides (Honglo *et al.*, 1990; Wiger *et al.*, 1995; Wiger *et al.*, 1997). Segundo Aitken *et al.* (1997) e Richer *et al.* (1998), a retenção do citoplasma residual parece estar associada a mecanismos que envolvem a grande atividade da enzima citosólica glicose 6-fosfato-desidrogenase originando NADPH e radicais de oxigênio.

O efeito do paracetamol sobre os vasos sanguíneos pode ser visto na sua extrema dilatação e também em alguns vasos rompidos. Como consequência destes danos observa-se com frequência edema em todos os períodos do experimento o que proporcionaria danos oxidativos. Cabral (1996), utilizando três doses de 4,4mmoles de paracetamol não verificou mudanças significativas quanto aos túbulos seminíferos, mas propõe o seu efeito sobre a circulação testicular.

Segundo Robbins *et al.* (1996), o paracetamol atua através de lesão oxidativa e por ligação covalente às proteínas e ácidos nucléicos, aumentando a toxicidade farmacológica e necrose hepática quando administrado em altas doses.

No presente trabalho, o tratamento com dose de paracetamol (4,4 mmoles/kg) semelhante a doses terapêuticas no homem, contribui juntamente com estudos anteriores alertando para a avaliação dos benefícios terapêuticos, mediante danos agudos ou crônicos aos órgãos. E as espermátides sem condensação cromatínica verificadas em todos os períodos estudados alerta para o potencial genotóxico já verificado em várias pesquisas (Giri, 1933; Rannug, 1995).

Nos animais tratados com cádmio + paracetamol, as lesões foram mais acentuadas quando comparadas ao tratamento com o cádmio e paracetamol isoladamente. A severidade das lesões foi observada na forma de grandes áreas entre túbulos seminíferos

decorrentes da provável degeneração de alguns túbulos, além da presença de grande número de vacúolos com restos celulares e espermátides fortemente alteradas. Contribui ainda para a não recuperação dos vasos sanguíneos que continuam dilatados permitindo o extravasamento de plasma formando edema.

Como exposto anteriormente, o estado de hipóxia provocado pelo extravasamento de fluidos ao tecido intersticial e conseqüente formação de edema favorece lesões oxidativas, alterando o equilíbrio da homeostase do íon cálcio, o que levaria a potencialização da toxicidade destes dois tratamentos, semelhantes a potencialização de fármacos estudados por Bellomo *et al.*, (1982) e Jewell *et al.*, (1983) apud Jones (1985).

O desprendimento de células jovens da camada basal, com conseqüente formação de reentrâncias destas células para o interior dos túbulos, além de uma grande descamação na luz tubular foi observado em todas as situações estudadas. Em microscopia eletrônica de transmissão, o desprendimento foi verificado pela fragmentação dos prolongamentos de células de Sertoli pela Retículo Endoplasmático Rugoso direta ação do cádmio sobre os túbulos seminíferos como proposto por Hew *et al.* (1993). No entanto, o maior número de túbulos em degeneração e as grandes áreas deixadas por estas em relação ao tratamento com o cádmio indica a potencialização de ambos os agentes químicos.

O grande desenvolvimento do Retículo Endoplasmático Rugoso e Complexo de Golgi observados em espermátides está relacionado com a síntese de componentes do Retículo Endoplasmático Liso, que na verdade é a organela responsável pelo processo de detoxificação celular. Estas células são semelhantes àquelas de ratos tratados apenas com paracetamol, porém, o Retículo Endoplasmático e o Complexo de Golgi são um pouco menos desenvolvidos. Este desenvolvimento não foi visto em ratos submetidos apenas ao cádmio, e este fato reforça a hipótese de que estas organelas mostram o empenho das células em metabolizar o paracetamol a metabólitos que possam ser eliminados, ainda que de forma indireta (Retículo Endoplasmático Rugoso), como enfatizado acima.

Após 10 dias do tratamento com cádmio + paracetamol, uma outra evidência da potencialização das drogas foi verificada pelo grande número de vacúolos com restos celulares presentes em seu interior. Neste período de tratamento muitas organelas

celulares sofreram deteriorização e foram englobados pelos vacúolos o que representariam grandes lisossomos.

Como observado no tratamento com o cádmio e o paracetamol isoladamente, o atraso da espermição possivelmente ocorre através da fragmentação dos prolongamentos de células de Sertoli, encontrando-se espermátides morfológicamente alteradas e sem condensação cromatínica. Como verificados por Janecki *et al.*, 1992; Alexander *et al.*, 1996; Robbins *et al.*, 1997 apud Monsees *et al.*, (2000), o cádmio age diretamente sobre células de Sertoli interrompendo áreas intercelulares. Assim, além da ação direta do cádmio, outros fatores como danos vascular e provável isquemia proporcionariam lesões oxidativas alterando membrana de túbulos seminíferos e DNA de espermátides.

Com relação ao tratamento com paracetamol, mesmo em dose terapêutica foram observadas lesões quanto a vasos, túbulos, retenção de citoplasma residual e espermátides morfológicamente alterados e com problemas quanto à compactação da cromatina. Hongslo *et al.* (1990); Wiger *et al.*(1995); Cabral (1996) e Wiger *et al.* (1997), também verificaram que exposições a doses terapêuticas e não terapêuticas de paracetamol causam detenção do ciclo celular e mudanças nos vários estágios de populações de espermátides com aparente alteração na estrutura cromatínica dos espermatozóides. E vários autores têm proposto que o paracetamol deve atuar através de lesão oxidativa e por ligação covalente às proteínas e ácidos nucléicos, aumentando a toxicidade farmacológica e necrose hepática quando administrado em altas doses (Robbins et al., 1996).

Morfológicamente, as espermátides alongadas apresentaram-se mais severamente alteradas do que após o tratamento com o cádmio ou paracetamol isoladamente, verificado pela presença de algumas espermátides sem núcleo e espermátides com núcleo sem condensação cromatínica e com alterações na peça intermediária. Portanto, a associação de ambas as substâncias potencializam a agressão em relação às alterações morfológicas das espermátides, provavelmente por estarem agindo através de lesão oxidativa, ampliando o tempo de recuperação. Deve ser frisado, entretanto, que nas doses

usadas ainda encontra-se espermatozóides aparentemente normais, sendo possivelmente férteis.

Os efeitos do cádmio associado ao paracetamol podem ser observados até o período mais longo do experimento (70 dias), causando degeneração de alguns túbulos e alterações morfológicas, fragmentação dos prolongamentos de células de Sertoli e perda nuclear. Apesar das grandes lesões, pequena recuperação dos túbulos foi observada em animais após 30, 50 e 70 dias de tratamento. A aparente recuperação estrutural do epitélio seminífero pode ser devido à eliminação da maior parte dos túbulos em degeneração vistos até 15 dias após administração de cádmio + paracetamol, além da recuperação de túbulos menos fortemente afetados.

Embora muitos estudos já tenham sido feitos, permanecem muitas dúvidas quanto aos mecanismos de ação do cádmio e do paracetamol.

A sensibilidade verificada pela potencialização das drogas (cádmio + paracetamol) nos testículos de ratos alerta para uma investigação dos efeitos no homem, uma vez que o paracetamol deve contribuir para aumentar a carga genotóxica segundo Brunborg *et al.* (1995), seja sozinho ou em combinação com outros agentes genotóxicos.

VI. Conclusões

- 1)- O testículo, incluindo todos os tipos celulares, é muito sensível ao cádmio e paracetamol isolado ou em conjunto nas doses aplicadas;
- 2)- O agravamento das lesões testiculares confirma a potencialização do tratamento com paracetamol e cádmio juntos;
- 3)- Lesões vasculares ocorrem em todos os tratamentos, sem aparente recuperação até pelo menos 15 dias após a administração do cádmio, e 15 dias após a administração do paracetamol. No caso da administração ser conjunta, as lesões são mantidas por pelo menos 70 dias após a administração das drogas;
- 4)- O citoplasma residual aumentado em espermátides adiantadas ou alongadas é uma resposta ao estresse ocasionado pela toxicidade do cádmio e do paracetamol;
- 5)- O envolvimento das organelas como Retículo Endoplasmático Rugoso (ainda que de forma indireta, via síntese e/ou processamento de elementos constituintes do Retículo Endoplasmático Liso) e Complexo de Golgi no catabolismo do paracetamol contribui para o atraso no desenvolvimento das células germinativas;
- 6)- A irregularidade na condensação cromatínica demonstra a genotoxicidade de ambos os tratamentos, os quais são mais graves no uso conjunto das duas substâncias.

VII. Referências Bibliográficas

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. 1994. **Molecular biology of the cell**, 3ed, Garland Publishing, New York-London, 1294p.
- AITKEN, R.J. 1999. The human spermatozoon – a cell in crisis? **J. Reprod. Fertil.** 115: 1-7.
- AGARWAL, A.; IKEMOTO, I. & LOUGHLIN, K. R. 1997. Prevention of testicular damage by free-radical scavenger. **Urology.** 50: 759-763.
- AOKI, A. & HOFFER, A.P. 1978. Reexamination of the Lesions in rat testis caused by cadmium. **Biol. Reprod.** 18: 579-591.
- BRUNBORG, G.; HOLME, J.A. & HONGSLO, J.K. 1995. Inhibitory effects of paracetamol on DNA repair in mammalian cells. **Mutation Res.** 342: 157-170.
- CABRAL, F. H. C. 1996. **Alterações morfológicas testiculares provocadas pelo cádmio, paracetamol e cádmio associado ao paracetamol em ratos.** Tese de mestrado. Instituto de Biologia - Unicamp, 173 pp.

- COHEN, S.D.; PUMFORD, N.R.; KHAIRALLAH, E.A.; BOEKELHEIDE, K.; POHL, L.R.; AMOUZADEH, H.R. & HINSON, J.A. 1997. Selective protein covalent binding and target organ toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 143(1): 1-12.
- CHAN, H.M.; KIM, C.; KHODAY, K.; RECEVEUR, O. & KUHNLEIN, H.V. 1995. Assessment of dietary exposure to trace metals in Baffin Inuit food. **Environ. Health Perspect.** 103(7-8): 740-746.
- CHIQUOINE, A.D. 1965. Studies on testicular necrosis induced by cadmium slats. **Anat. Rec.** 145: 216.
- CLARKSON, T. 1995. Health effects of metals: A role for evolution? **Environ. Health Perspect.** 103 (Suppl 1): 9-12.
- DALTON, T.P.; MILLER, M.L.; WU, X.; MENON, A.; CIANCIOLO, E.; MCKINNON, R.A.; SMITH, P.W.; ROBINSON, L.J. & NEBERT, D.W. 2000. Refining the mouse chromosomal location of *Cdm*, the major gene associated with susceptibility to cadmium-induced testicular necrosis. **Pharmacogenetics.** 10(2): 141-151.
- DOULL, J.; KAASSEN, C. D. & AMDUR, M. O. 1975. Toxic agents. In: HAMMOND, P. B.; BELILES, R.P. **Casarett and Doull's: Toxicology the basic science of poisons.** 2ed., p. 429-435.
- DYBING, E.; HOLME, J. A.; GORDON, W. W.; SODERLUND, E. J.; DAHLIN, D. C. & NELSON, S. D. 1984. Genotoxicity studies with paracetamol. **Mutation Res.** 139: 21-32.

- EI-MISSIRY, M.A. & SHALABY, F. 2000. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 14(5): 238-243.
- FARMER, A.A. & FARMER, A.M. 2000. Concentrations of cadmium lead and zinc in livestock feed and organs around a metal production center in eastern Kazakhstan. **Sci. Total Environ.** 257(1): 53-60.
- FISHER H.M. & AITKEN R.J. 1997. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. **J. Exper. Zoology.** 277: 390-400.
- FLOWER, R.J.; MONCADA, S. & VANE, J.R. 1981. Agentes analgésico-antipiréticos y antiinflamatorios; drogas empleadas en el tratamiento de la gota. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **Las Bases farmacológicas de la terapéutica**, 6ed. , Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, p. 675-719.
- FORSTNER, U. 1976. Lake sediments as indicators of heavy-metal pollution. **Naturwissenschaften.** 63(10): 465-470.
- FOX, B.W. & FOX, M. 1967. Biochemical aspects of the actions of drugs on spermatogenesis. In: **Pharmacol. Rev.** 19(1): 21-57.
- GIRI, A. K. 1993. The genetic toxicology of paracetamol and aspirin: a review. **Mutation Res.** 296: 199-210.
- GOUVEIA, M.A. 1988. The testes in cadmium intoxication: morphological and vascular aspects. **Andrologia.** 20(3): 225-231.

- HART, S.G.; CARTUN, R.W.; WYAND, D.S.; KHAIRALLAH, E.A. & COHEN, S.D. 1995. Immunohistochemical localization of acetaminophen in target tissues of the CD-1 mouse: correspondence of covalent binding with toxicity. **Fundam. Appl. Toxicol.** 24(2): 260-274.
- HENSCHHEL, K.P.; WENZEL, M.; DIEDRICH, M. & FLIEDNER, A. 1997. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** 25: 220-225.
- HEW, K.W.; HEATH, G.L.; JIWA, A.H. & WELSH, M.J. 1993. Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. **Biol. Reprod.** 49: 840-849.
- HEW, K.W.; ERICSON, W.A. & WELSH, M.J. 1993. A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 121(1): 15-21.
- HIRANO, T.; YAMAGUCHI, Y. & KASAI, H. 1997. Inhibition of 8-hydroxyguanine repairs in testes after administration of cadmium chloride to GSH- depleted rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 147: 9-14.
- HONGSLO, J.K.; BJORGE, C.; SCHWARZE, P.E.; BROGGER, A.; MANN, G.; THELANDER, L. & HOLME, J.A. 1990. Paracetamol inhibits replicative DNA synthesis and induces sister chromatid exchange and chromosomal aberrations by inhibition of ribonucleotide reductase. **Mutagenesis.** 5(5): 475-480.
- HONGSLO, J.K.; BROGGER, A.; BJORGE, C. & HOLME, J.A. 1991. Increased frequency of sister-chromatid exchange and chromatid breaks in lymphocytes after treatment of human volunteers with therapeutic doses of paracetamol. **Mutat. Res.** 261(1): 1-8.
- HONGSLO, J.K. & HOLME, J.A.; 1994. DNA damages caused by paracetamol. **Tidsskr Nor Laegeforen.** 114(10): 1204-1206.

- IRVINE, D. S. 2000. Male reproductive health: cause for concern? **Andrologia**. 32: 195-208.
- ISHIDO, M.; TOHYAMA, C. & SUZUKI, T. 1999. Cadmium-bound metallothionein induces apoptosis in rat kidneys, but not in cultured kidney LLC-PK1 cells. **Life Sci**. 64(9): 797-804.
- JACKSON H. 1964. The development of antifertility substances. In: **Progress in Drug Research**. v.7. Burkhauser Verlag, Basel, p. 134-154.
- JONES, D. P. 1985. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: SIES, H. **Oxidative stress**. Academic Press, Orlando, Florida. p.1-7.
- KAPPUS, H. 1985. Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: SIES, H. **Oxidative stress**. Academic Press, Orlando, Florida. p.1-7.
- KLAASSEN, C. D.; LIU, J. & CHOUDHURI, S. 1999. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol**. 39: 267-294.
- KIM, C.; CHAN, H.M. & RECEVEUR, O. 1998. Risk assessment of cadmium exposure in Fort Resolution, Northwest Territories, Canada. **Food Addit. Contam**. 15(3): 307-317.
- KOIZUMI, T.; LI, Z.G. & TATSUMOTO, H. 1992. DNA damaging activity of cadmium in Leydig cells, a target cell population for cadmium carcinogenesis in the rat testis. **Toxicol. Lett**. 63(2): 211-220.
- LEBLOND C. P. & CLERMONT Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann. Acad. Scien**. 55: 548-573.

- LOMBELLO, C. B. 1996. **Padronização das técnicas de cultura de túbulos seminíferos e a sua utilização nos estudos toxicológicos do cádmio**. Tese de mestrado. Instituto de Biologia - Unicamp, 92 pp.
- LUCKEY, T. D. & VENUGOPAL, B. 1977. Toxicity of group II metals. In: **Metal toxicity in mammals' physiology and chemical basis for metal toxicity**. Plenum Press, New York. p. 76-86.
- MONCADA, S.; FLOWER, R.J. & VANE, J.R. 1981. Prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano A₂. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **Las Bases farmacológicas de la terapéutica**, 6ed., Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, p. 660-673.
- MONSEES, T. K.; FRANZ, M.; GEBHARDT, S.; WINTERSTEIN, U.; SCHILL, W. -B. & HAYATPOUR, J. 2000. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. **Andrologia**. 32: 239-246.
- McGUIGAN, M.A. 1999. Common culprits in childhood poisoning: epidemiology, treatment and parental advice for prevention. **Pediatr. Drugs**. 1(4): 313-324.
- McKENNA, I.M.; BARE, R.M. & WAALKES, M.P. 1996. Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. **Toxicology**. 107(2): 121-130.
- NAZARETH, W.M.A.; SETHI, J.K. & McLEAN, A.E.M. 1991. Effect of paracetamol on mitochondrial membrane function in rat liver slices. **Biochemical Pharmacology**. 42(4): 931-936.

- NELSON, S.D. & PEARSON, P.G. 1990. Covalent and noncovalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemicals. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 30: 169-195.
- NORLAN, C.V. & SHAIKH, Z.A. 1986. The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. **Life Sci.** 39(16): 1403-1409.
- NORDBERG, G. 1999. Excursions of intake above ADI: Case study on cadmium. **Reg. Toxic. Pharmacol.** 30: 57-62.
- OLDEREID, N.B.; THOMASSEN, Y.; ATTRAMADAL, A.; OLAISEN, B. & PURVIS, K. 1993. Concentrations of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. **J. Reprod. Fertil.** 99(2): 421-425.
- PARÍZEK, J. & ZÁROR, Z. 1956. Effect of cadmium salts on testicular tissue. **Nature.** 177: 1036-1037.
- PATRA, R.C.; SWARUP, D. & SENAPATI, S.K. 1999. Effects of cadmium on lipid peroxides and superoxide dismutase in hepatic, renal and testicular tissue of rats. **Vet. Hum. Toxicol.** 41(2): 65-67.
- PEREIRA, F.E.L. 2000a. Etiopatogênese geral das lesões. In: FILHO F.E. **Bogliolo Patologia.** 6ed. Guanabara Koogan S.A., RJ. p.19-37.
- PEREIRA, F.E.L. 2000b. Patologia Ambiental. In: FILHO F.E. **Bogliolo Patologia.** 6ed. Guanabara Koogan S.A., RJ. p.254-273.
- PLACKE, M.E.; GINSBERG, G.L.; WYAND, D.S. & COHEN, S.D. 1987. Ultrastructural changes during acute acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse: a time and dose study. **Toxicol. Pathol.** 15(4): 431-438.

- PLACKE, M.E.; WYAND, D.S. & COHEN, S.D. 1987. Extrahepatic lesions induced by acetaminophen in the mouse. **Toxicol. Pathol.** 15(4): 381-387.
- PUMFORD, N.R. & HALMES, N. C. 1997. Protein targets of xenobiotic reactive intermediates. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 37: 91-117.
- RAGAN, H.A. & MAST, T.J. 1990. Cadmium inhalation and male reproductive toxicity. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** 114: 1-22.
- RANNUG, U.; HOLME, J.A.; HONGSLO, J.K. & SRAM, R. 1995. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. An evaluation of the genetic toxicity of paracetamol. **Mutat. Res.** 327(1-2): 179-200.
- RICHER S.; WHITTINGTON K. & FORD W.C.L. 1998. Confirmation of NADPH oxidase activity in human sperm. **J. Reprod. Fertil.** 21:118.
- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. & KUMAR, V. 1996. Lesão e morte celular In: **Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional**, 5ed., Guanabara Koogan, RJ. p. 2-14.
- SETCHELL B.P. & WAITES G.M.H. 1970. Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the "blood-testis barrier" after injection of cadmium chloride in the rat. **J. End.** 47: 81-86.
- SIES, H. 1985. Oxidative stress: Introductory remarks. In: **Oxidative stress**. Academic Press. Orlando, Florida. p.1-7.
- SHARMA, R.K. & AGARWAL, 1996. A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology.** 48(6): 835-850.

- SHEN T.Y. 1977. Prostaglandin Synthetase Inhibitors. In: BERTI F.; SAMUELSSON S. & VELO G.P. **Prostaglandins and thromboxanes**. Plenum Press, N.Y and London. p. 111-137.
- SHIRAIISHI, N.; HOCHADEL, J.F.; COOGAN, T.P.; KOROPATNICK, J. & WAALKES, M.P. 1995. Sensitivity to cadmium-induced genotoxicity in rat testicular cells is associated with minimal expression of the metallothionein gene. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 130(2): 229-236.
- SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, R.I.; HANDLER, P. & WHITE A. 1985. Prostaglandinas e agentes relacionados. In: **Bioquímica de mamíferos**. Ed. Guanabara Koogan, RJ. p. 343-358.
- SUZUKI, J.S.; KODAMA, N.; MOTOTKOV, A.; AOKI, E. & TOHYAMA, C. 1998. Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis. **Biochem. J.** 334(3): 695-701.
- VALVERDE M.; FORTOUL T.I.; DIAZ-BARRIGA F.; MEJIA J. & DEL CASTILLO E.R. 2000. Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. **Mutagenesis.** 15(2): 109-114.
- WAALKES, M.P.; REHM, S. & DEVOR, D.E. 1997. The effects of continuous testosterone exposure on spontaneous and cadmium induced tumors in the male Fisher (F344/NCr) rat: loss of testicular response. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 142(1): 40-46.
- WIGER, R.; HONGSLO, J.K.; EVENSON, D.P.; De ANGELIS, P.; SCHWARZE, P.E. & HOLME, J.A. 1995. Effects of acetaminophen and hydroxyurea on spermatogenesis and sperm chromatin structure in laboratory mice. **Reprod. Toxicol.** 9(1): 21-33.

- WIGER, R.; FINSTAD, H.S.; HONGSLO, J.K.; HAUG, K. & HOLME, J.A. 1997. Paracetamol inhibits cell cycling and induces apoptosis in HL-60 cells. **Pharmacol. Toxicol.** 81(6): 285-293.
- YAN, H.; CARTER, C.E.; XU, C.; SINGH, P.K.; JONES, M.M.; JOHNSON, J.E. & DIETRICH, M.S. 1997. Cadmium-induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation. **J. Toxicol. Environ. Health.** 52(2): 149-168.
- YIIN, S.J.; CHERN, C.L.; SHEU, J.Y. & LIN, T.H. 1999. Cadmium induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. **Biometals.** 12(4): 353-359.
- XU, C.; JOHNSON, J. E.; SINGH, P. K.; JONES, M. M.; YAN, H. & CARTER, C. E. 1996. In vivo studies of cadmium-induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent. **Toxicology.** 107: 1-8.