

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITOS DA OXIMA BUTANO-2,3-  
DIONATIOSSEMICARBAZONA FRENTE AO DANO  
TESTICULAR CAUSADO POR CÁDMIO EM  
CAMUNDONGOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Mayara Lutchemeyer de Freitas**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2014**

**EFEITOS DA OXIMA BUTANO-2,3-  
DIONATIOSSEMICARBAZONA FRENTE AO DANO  
TESTICULAR CAUSADO POR CÁDMIO EM  
CAMUNDONGOS**

**Mayara Lutchemeyer de Freitas**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Brandão**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Freitas, Mayara Lutchemeyer de  
Efeitos da oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona  
frente ao dano testicular causado por cádmio em  
camundongos / Mayara Lutchemeyer de Freitas.-2014.  
63 p.; 30cm

Orientador: Ricardo Brandão  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2014

1. Cloreto de cádmio 2. Mieloperoxidase 3.  
Testosterona 4. Estresse oxidativo 5. Inflamação I.  
Brandão, Ricardo II. Título.

---

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Mayara Lutchemeyer de Freitas. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: mayarafreitas23@yahoo.com.br

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DA OXIMA BUTANO-2,3-DIONATIOSSEMICARBAZONA  
FRENTE AO DANO TESTICULAR CAUSADO POR CÁDMIO EM  
CAMUNDONGOS**

elaborada por  
**Mayara Lutchemeyer de Freitas**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Ricardo Brandão, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

**Cristiano Ricardo Jesse, Dr. (Unipampa)**

**Juliana Trevisan da Rocha, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 06 de Março de 2014.

## O ANJO MAIS VELHO

### **Teatro Mágico**

"O dia mente a cor da noite  
E o diamante a cor dos olhos  
Os olhos mentem dia e noite a dor da gente  
Enquanto houver você do outro lado  
Aqui do outro eu consigo me orientar  
A cena repete, a cena se inverte  
Enchendo a minha alma daquilo que outrora eu  
Deixei de acreditar  
Tua palavra, tua história  
Tua verdade fazendo escola  
E tua ausência fazendo silêncio em todo lugar  
Metade de mim  
Agora é assim  
De um lado a poesia, o verbo, a saudade  
Do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim  
E o fim é belo incerto... depende de como você vê  
O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só  
Só enquanto eu respirar  
Vou me lembrar de você  
Só enquanto eu respirar."

DEDICO

Ao meu amado pai, Antônio.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, sob a definição de Baruch Spinoza, “Deus de Spinoza”, que segundo Einstein é Aquele que se revela por si mesmo na harmonia de tudo o que existe, pelas oportunidades oferecidas ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, pelo carinho, apoio, por terem me ensinado “a andar”. Ao meu pai (*in memoriam*), Antônio, que sempre me amou, confiou em mim e não me deixou só nem por um instante, me ajudou nas minhas escolhas e com certeza traçou o caminho para eu chegar até aqui. A minha mãe, Rosangela, companheira, amiga, amorosa, paciente, por ser esta mãe tão maravilhosa e estar presente nas minhas conquistas. A minha irmã, Ingra, meu amor incondicional, a qual me faz muito mais feliz. A minha vó, Augusta pela criação e pelo aconchego. A Tide e aos meus padrinhos, Geni e Gringo, pelo carinho e força.

Ao professor Ricardo, um exemplo de profissional, agradeço pela oportunidade e dedicação. Pelo incentivo ao trabalho em equipe, a busca pelo conhecimento e o apoio para seguir em frente. Agradeço muito mesmo.

Aos colegas de laboratório: Lia, Laíza, Michelli, Paula, Laís, Evelyne, Michael, Taiane, Andréia, Lilian e Helena, pela amizade e a parceria.

As amigas de coração e de todas as horas: Lu, Lili, Fran e Carol, muito obrigada pela infinita amizade.

À professora Cristina e ao professor GZ pelo apoio.

Aos colegas e amigos do lab Cris em especial ao Marlon, o Pietro, a Tuka, o Marcel, o César e a Carol.

Aos professores Silvane Roman, Félix Soares, Leandro Bresolin e Martha Duarte pela merecida co-autoria no trabalho.

Ao Rinaldo pelo cuidado com os animais.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste curso.

À banca examinadora do projeto previamente apresentado e a banca de avaliação dessa dissertação, a Juliana, o Cristiano, a Ana Flávia e o Leandro pela disponibilidade de avaliação.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro para execução desse projeto. Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITOS DA OXIMA BUTANO-2,3-DIONATIOSSEMICARBAZONA FRENTE AO DANO TESTICULAR CAUSADO POR CÁDMIO EM CAMUNDONGOS**

AUTORA: MAYARA LUTCHEMEYER DE FREITAS

ORIENTADOR: RICARDO BRANDÃO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de Março de 2014.

Investigamos a ação da oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona contra o dano testicular causado por cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) em camundongos swiss adultos machos. Os animais receberam uma única injeção de  $\text{CdCl}_2$  na dose de 5mg/kg, intraperitonealmente e, após trinta minutos, foi administrada a oxima subcutaneamente na dose de 10 mg/kg. Vinte quatro horas após a administração da oxima, os animais foram anestesiados o sangue foi coletado, após a eutanásia tiveram os testículos removidos para as análises. Os parâmetros determinados foram as atividades das enzimas  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), mieloperoxidase (MPO), glutationa-S-transferase (GST) e glutationa peroxidase (GPx), no tecido testicular. Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tióis não protéicos (NPSH), ácido ascórbico e quantidade presente de cádmio nos testículos também foram avaliados. Além dos níveis de testosterona no soro, onde também se quantificou as citocinas (pró-inflamatórias IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e anti-inflamatória, IL-10). Também foi realizada a análise histológica de tecido testicular. Nossos resultados demonstraram que a oxima foi efetiva em restaurar parcialmente a inibição da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D induzida por  $\text{CdCl}_2$ . A ativação da MPO e o aumento dos níveis de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  induzidos por  $\text{CdCl}_2$  também foram reduzidos pela oxima. A IL-10, que foi reduzida pelo cádmio, teve seus níveis restaurados parcialmente pela oxima. Além disso, a oxima foi efetiva em restaurar o aumento nos níveis de TBARS e parcialmente a redução nos níveis de NPSH induzidos pelo  $\text{CdCl}_2$ . Porém, não teve ação sobre a queda dos níveis de ácido ascórbico provocado pelo  $\text{CdCl}_2$ , nem sobre a diminuição da atividade enzimática da GST e sobre o aumento da atividade enzimática da GPx causados pelo  $\text{CdCl}_2$ . Nossos resultados demonstraram que a oxima foi efetiva em conter as alterações histológicas causadas pelo  $\text{CdCl}_2$ , prevenindo a perda de espermátides alongadas. A oxima também foi capaz de aumentar os níveis de testosterona reduzidos pela exposição ao cádmio. Em conclusão, a oxima testada foi efetiva em reduzir os danos testiculares induzidos pelo  $\text{CdCl}_2$ . Os efeitos benéficos desta oxima estão relacionados às suas propriedades antioxidantes e sua ação anti-inflamatória.

**Palavras-chave:** Cloreto de cádmio. Mieloperoxidase. Testosterona. Estresse oxidativo. Inflamação.



## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science  
Federal University of Santa Maria

### EFFECTS OF BUTANE-2,3-DIONE THIOSEMICARBAZONE OXIME ON TESTICULAR DAMAGE INDUCED BY CADMIUM IN MICE

AUTHOR: MAYARA LUTCHEMEYER DE FREITAS

ADVISOR: RICARDO BRANDÃO

Place and Date of the defense: Santa Maria, March 6<sup>th</sup>, 2014.

We investigated the action of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime against the testicular damage caused by cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) in mice swiss adult male. The animals received a single injection of  $\text{CdCl}_2$  at the dose of 5 mg/kg, intraperitoneally, and after thirty minutes, the oxime was administered subcutaneously at the dose of 10 mg/kg. Twenty four hours after administration of the oxime, the animals were euthanized the blood were collected and after killed the testes were removed for analysis. The parameters determined were  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase ( $\delta$ -ALA-D), myeloperoxidase (MPO), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) activities, in testicular tissue. The levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), nonprotein thiols (NPSH), ascorbic acid and the quantity of cadmium in testes were also evaluated. In addition, levels of testosterone in serum and cytokines (proinflammatory, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and anti-inflammatory IL-10) were determined. Histological analysis of testicular tissue was also performed. Our results demonstrated that the oxime was effective in restoring partially the inhibition in  $\delta$ -ALA-D activity induced by  $\text{CdCl}_2$ . The activation of MPO and increase in IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels induced by  $\text{CdCl}_2$  were also reduced by oxime. IL-10, which was reduced by cadmium, was partially restored by oxime administration. In addition, the oxime was effective in restoring the increase in TBARS levels and partially the reduction on NPSH levels induced by  $\text{CdCl}_2$ . However, the oxime did not have action on the decreased levels of ascorbic acid induced by  $\text{CdCl}_2$  or on the decrease in enzymatic activity of GST and the increased enzymatic activity of GPx caused by  $\text{CdCl}_2$ . Our results demonstrated that oxime was effective in restoring the histological alterations induced by  $\text{CdCl}_2$ , preventing the loss of elongated spermatids. In addition, oxime was able to increase the testosterone levels reduced by cadmium exposure. In conclusion, the oxime tested was effective in reducing the testicular damage induced by  $\text{CdCl}_2$  in mice. The beneficial effects of this oxime are related to its antioxidant and anti-inflammatory action.

**Keywords:** Cadmium chloride. Myeloperoxidase. Testosterone. Oxidative stress. Inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 – Esquema ilustrativo do tecido testicular. ....	14
Figura 2 – Desenho esquemático que ilustra a posição relativa da barreira hematotesticular .....	15
Figura 3 – Hormônios envolvidos na espermatogênese.....	16
Figura 4 – Linhas gerais do ciclo espermatogênico. ....	17
Figura 5 – Morfologias observadas de espermatozôides de camundongos: normais e defeituosos. ....	18
Figura 6 – Mapa da região poluída da bacia do rio Jinzu na Planície de Toyama no Japão.....	20
Figura 7 – Relação entre estoque de ferro no corpo associado à ferritina sérica e cádmio no sangue e na urina de 57 mulheres.....	24
Figura 8 – Esquema básico do fluxo de cádmio no corpo, demonstrando as formas ligadas no sangue e a síntese e degradação das metalotioneínas no tecido hepático e renal. ....	25
Figura 9 – Indução de dano testicular pelo cádmio. ....	29
Figura 10 – Cádmio induz dano a barreira hematotesticular e rompimento das junções celulares no epitélio seminífero.....	31
Figura 11 – Estrutura química geral das oximas .....	33
Figura 12 – Estrutura química geral das tiosemicarbazonas.....	34
Figura 13 – Estrutura química da oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona .....	34

### ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 – Chemical structure of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime .....	39
Figure 2 – Effect of oxime on the $\delta$ -ALA-D activity in the testicular tissue of Cd-treated mice.....	42
Figure 3 – Effect of oxime on the TBARS levels in the testicular tissue of Cd-treated mice.....	42
Figure 4 – Effect of oxime on MPO activity in the testicular tissue of Cd-treated mice.....	43
Figure 5 – Effect of oxime on cadmium concentration in the testicular tissue of Cd-treated mice.....	43
Figure 6 – Effect of oxime on serum testosterone levels of Cd-treated mice.....	44
Figure 7 – Microscopic analysis of structure of mice seminiferous tubules with a detail the right.....	45

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 – Effect of oxime on the NPSH and ascorbic acid levels in the testicular tissue of Cd-treated mice .....	42
Table 2 – Effect of oxime in GST and GPx activities in the testicular tissue of Cd-treated mice.....	42
Table 3 – Effect of oxime on the IL-1, IL-6, TNF, INFg and IL-10 levels in the serum of Cd-treated mice.....	44

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 Tecido testicular e espermatogênese .....	12
1.2 Toxicologia dos metais .....	18
1.2.1 Aspectos gerais .....	18
1.3 Cádmio .....	19
1.3.1 Histórico .....	19
1.3.2 Propriedades .....	21
1.3.3 Fontes de exposição .....	22
1.3.4 Toxicocinética .....	23
1.3.5 Toxicidade .....	26
1.3.5.1 Toxicidade no tecido testicular .....	28
1.3.6 Tratamentos .....	31
1.4 Oximas .....	32
1.5 Tiossemicarbazonas .....	33
1.6 Oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona .....	34
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
2.1 Objetivo geral .....	35
2.2 Objetivos específicos .....	35
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>37</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Tecido testicular e espermatogênese

Os testículos são dois órgãos glandulares de forma oval situados no interior do saco escrotal, cuja sua função principal é formar os espermatozoides, que são células sexuais masculinas; e as células intersticiais (de Leydig), que são encarregadas de produzir os hormônios masculinos, fundamentalmente a testosterona. Cada testículo é composto pelo ducto deferente, são ductos que partem do epidídimo e encontram-se englobados nos funículos espermáticos que cruzam o canal inguinal, passando pela cavidade pélvica até chegar às glândulas seminais, com as quais se unem após cruzar com os ureteres. O funículo espermático é uma estrutura tubular, que através do canal inguinal chega ao testículo, aloja todos os elementos que chegam ou saem dos testículos, como o ducto deferente, artérias e veias testiculares, vasos linfáticos provenientes do testículo, artéria do ducto deferente e fibras nervosas simpáticas. O epidídimo, por sua vez, é uma estrutura alongada, apresentando três partes: cabeça (superior), corpo (média) e cauda (inferior); em seu interior encontram-se os ductos epididimários, que recolhem os espermatozoides produzidos nos túbulos seminíferos e os transportam até os ductos deferentes. Os ductos eferentes são condutos que saem do testículo, atravessando a túnica albugínea e chegam à cabeça do epidídimo, levando até ele os espermatozoides. A túnica albugínea é uma membrana fibrosa que envolve o testículo completamente e se estende também pela superfície do epidídimo, embora nessa região diminua a sua espessura (FERRON; RANCANO, 2007; OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

As estruturas internas dos testículos são compostas pelo mediastino testicular (corpo de *Highmore*), que é o espaçamento entre a túnica albugínea (região posterior do testículo muito rica em vasos sanguíneos e ductos espermáticos) e a superfície interna, de onde nascem os numerosos septos que dividem o testículo em numerosos lóbulos; essas paredes partem do corpo de *Highmore* e entram de

maneira radiada no tecido testicular, funcionam de maneira independente e estruturam o espaço dos túbulos seminíferos (FERRON; RANCANO, 2007).

Os túbulos seminíferos são pequenos condutos que percorrem o testículo, agrupados em vários lóbulos; em seu interior ocorre a espermatogênese (produção de espermatozóides), esses túbulos se agrupam para desembocar nos túbulos seminíferos retos e ductos eferentes, que acabam no ducto do epidídimo. A camada externa de tecido conjuntivo que recobre externamente os túbulos seminíferos é o epitélio do túbulo seminífero. A região germinativa são as camadas periféricas do túbulo seminífero, situada imediatamente abaixo do epitélio externo, onde se agrupam as espermatogônias, células a partir das quais se formam os espermatozóides. A luz do túbulo seminífero é o conduto central do túbulo seminífero onde desembarcam os espermatozóides da fase final da maturação, deste local eles seguem até o epidídimo. E por fim, as células de Sertoli, que se proliferam na região germinativa do túbulo seminífero e são essenciais para o processo de maturação dos espermatozóides pela secreção de estrógenos e outros hormônios; a ação hormonal dessas células se completa com as células intersticiais de Leydig, que se encontram fora do túbulo seminífero (FERRON; RANCANO, 2007; GARTNER; HIATT, 2007) (figura 1).

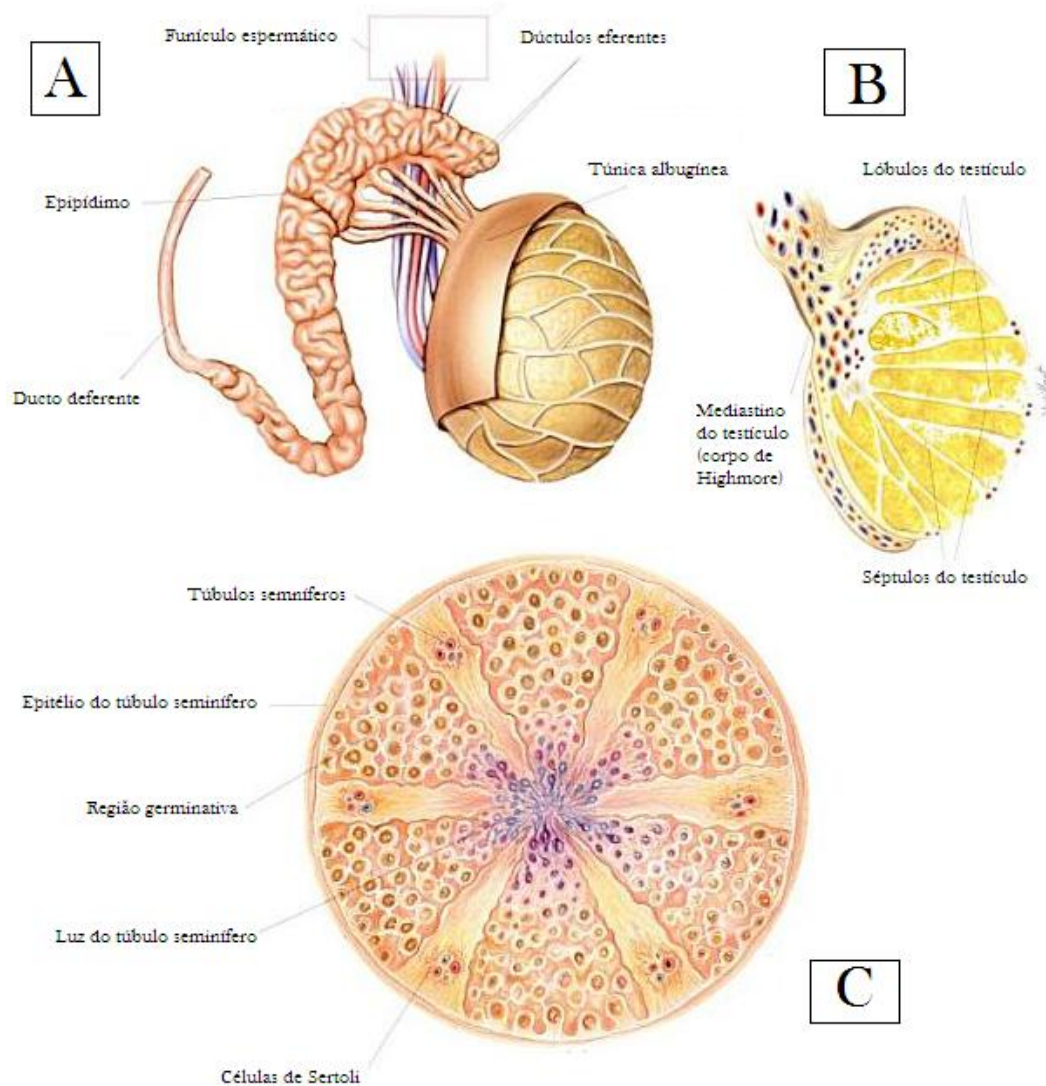


Figura 1 – Esquema ilustrativo do tecido testicular.

(A) Partes constituintes da estrutura testicular externa. (B) Partes constituintes da estrutura testicular interna. (C) Corte esquemático de um túbulo seminífero e as partes que o compõe.

Fonte: Modificado de Ferron; Rancano (2007).

As células de Sertoli adjacentes são o principal constituinte encontrado no compartimento basal do epitélio seminífero. As extensões citoplasmáticas das células de Sertoli conectam-se com as células adjacentes através de complexos juncionais. Junções GAP ou comunicantes, junções desmossômicas, junções oclusivas e ectoplasma basal especializado constituem a barreira hematotesticular que apresenta um *layout* próprio. A barreira hematotesticular facilita o trânsito dos espermatócitos na fase de pré-leptóteno, que estão localizados no compartimento

basal, com o restante dos elementos da linha germinativa, localizados no compartimento adluminal, ao mesmo tempo em que protege os espermatozoides do ataque dos anticorpos circulantes que os reconhecem como corpo estranho (SIU et al., 2009) (figura 2).

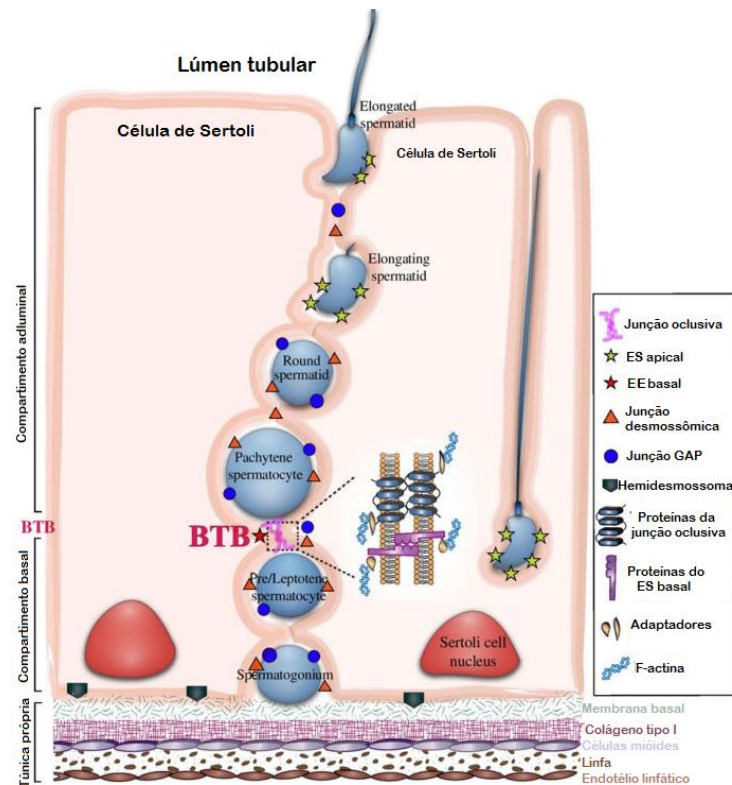


Figura 2 – Desenho esquemático que ilustra a posição relativa da barreira hematotesticular.

(BTB) e os vários tipos de junções encontradas no epitélio seminífero entre as células de Sertoli e/ou na interface das células de Sertoli e células germinativas, que são os alvos de toxicidade do cádmio em testículos de ratos adultos. O epitélio seminífero consiste em células de Sertoli e células germinativas em diferentes estágios do seu desenvolvimento, sobrepondo-se a túnica própria, composta de uma zona não-celular (membrana basal, camada de colágeno tipo I) e zona celular (camada de células mióides peritubular e vaso linfático). A barreira hematotesticular, criada pelas células de Sertoli adjacentes, divide o epitélio seminífero basal do adluminal. A barreira hematotesticular é constituída pela coexistência das junções oclusivas, junções desmossômicas, junções GAP e pelas especializações do ectoplasma basal (EE basal) (F-actina e adaptadores), sendo os principais alvos do cádmio no testículo. Spermatozoário: espermatogônia; Sertoli cell nucleus: núcleo da célula de Sertoli; Pre/Leptotene spermatocyte: espermatócitos na fase de pré-leptoteno; Pachytene spermatocyte: espermatócito paquíteno; Round spermatid: espermatíde redonda; Elongating spermatid: alongamento da espermatíde; Elongated spermatid: espermatíde alongada.

Fonte: Modificado de Siu et al. (2009).



Todo o processo de espermatogênese é complexo, e o sucesso para a produção de espermatozóides saudáveis e adequados para a fertilização do óvulo depende de ao menos três fatores. Primeiro, a regulação dos níveis dos hormônios envolvidos na formação do espermatozóide como o hormônio folículo estimulante (FSH), a testosterona e o estrogênio, além da morfologia das estruturas celulares responsáveis pela produção dos hormônios envolvidos, como a glândula pituitária, as células de Sertoli e as células de Leydig. (figura 3). Em segundo lugar, a integridade da barreira hematotesticular é essencial para o desenvolvimento de um micro ambiente único para células germinativas mitóticas e posteriormente para células meióticas isoladas da circulação sistêmica (que podem desenvolver anticorpos contra os espermatozóides) (figura 2). E, por fim, em terceiro lugar, no processo de diferenciação (figura 4), onde as espermátides arredondadas passam a se alongar, reorganizando as organelas do citoplasma, progredindo na formação do acrossomo e desenvolvendo o crescimento do flagelo, onde há o risco (por produtos tóxicos) da liberação prematura desses espermatozóides com estruturas defeituosas (por exemplo, falta do acrossomo e/ou cauda), e assim incapazes de fertilizar o óvulo (figura 5) (CARREAU; HESS, 2010; SHARPE, 1994).

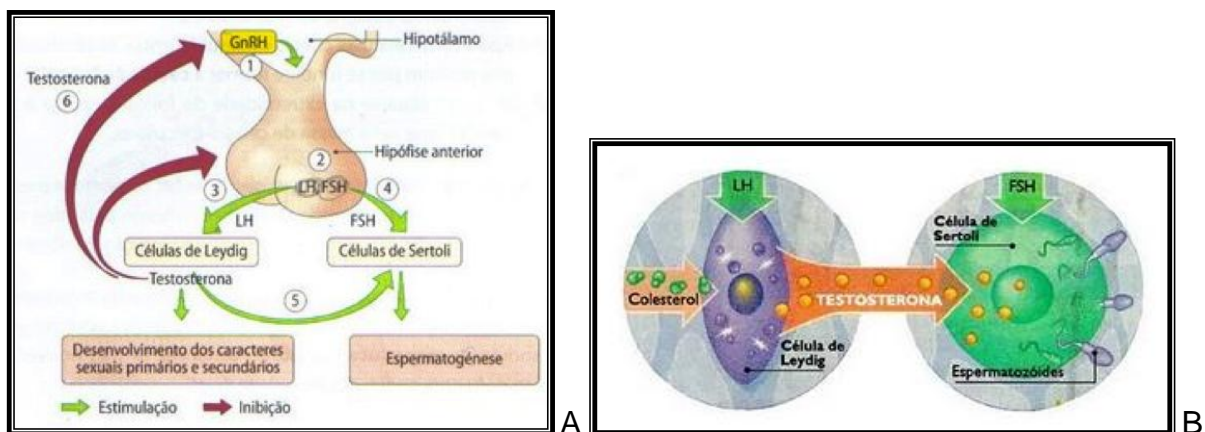


Figura 3 – Hormônios envolvidos na espermatogênese.

(A) Síntese pelo hipotálamo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que age sobre a hipófise e leva à liberação dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). O LH, por sua vez, estimula as células de Leydig a produzir testosterona, essa a qual, juntamente com o FSH, estimulam a maturação das células germinativas nas células de Sertoli. (B) Ampliação da chegada dos hormônios nos seus tipos celulares respectivos.

Fonte: Modificado de Chimento et al. (2014).

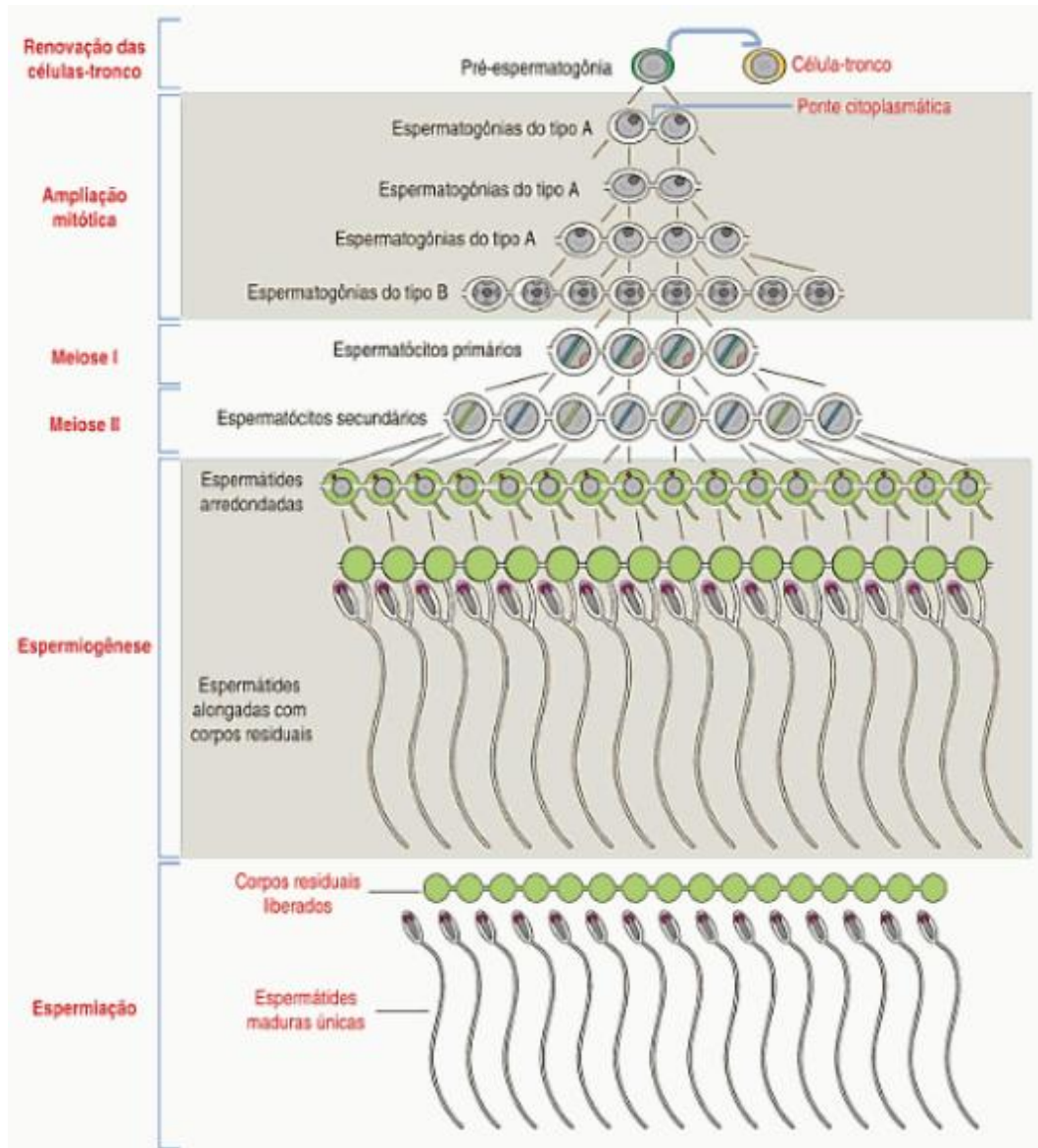


Figura 4 – Linhas gerais do ciclo espermato gênico.

Fonte: Modificado de Kierszenbaum; Tres (2012).

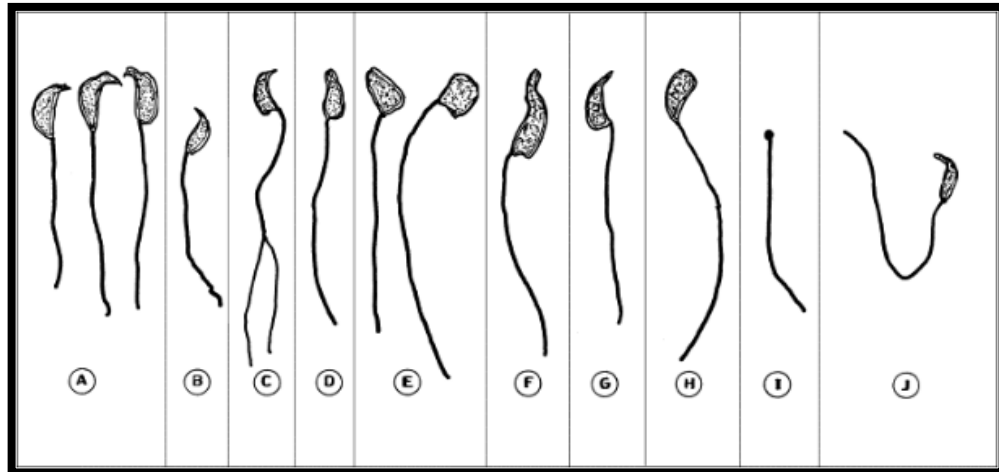


Figura 5 – Morfologias observadas de espermatozôides de camundongos: normais e defeituosos.

(A) espermatozôides com a cabeça normal (a morfologia de uma cabeça de espermatozôides normais de um camundongo consiste em uma forma da cabeça definida acentuada por um gancho); defeituosos, (B) nenhum gancho, (C) duas caudas; (D) gancho nodoso; (E) cabeça amorfa; (F) gancho torto; (G) gancho no ângulo errado; (H) dobrado sobre a cabeça; (I) cabeça de alfinete (J) cabeça em forma de banana.

Fonte: Modificado de Otubanjo; Mosuro (2001).

## 1.2 Toxicologia dos metais

### 1.2.1 Aspectos gerais

Alguns metais desempenham papéis importantes em uma grande variedade de processos biológicos nos organismos vivos. O ferro, o zinco, o magnésio, o manganês e o selênio são exemplos destes metais. A homeostase desses íons metálicos é mantida por mecanismos de captação, armazenamento e secreção, extremamente fundamentais à vida e esses processos são mantidos em limites estreitos, já que dependendo de suas concentrações esses nutrientes também podem apresentar efeitos tóxicos (BERTINI; CAVALLARO, 2008; BERTINI; SIGEL; SIGEL, 2001). Outros metais, considerados pesados, como o mercúrio, o alumínio, o chumbo e o cádmio, não são essenciais para os seres vivos, e causam toxicidade aos organismos expostos a estes elementos (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

## 1.3 Cádmi

### 1.3.1 Histórico

O cádmio foi descoberto como elemento químico em 1817, pelo químico alemão Friedrich Strohmeyer em Tebas na Grécia, a origem do nome é do latim e do grego, *kadmeia* (ANDUJAR; BENSEFA-COLAS; DESCATHA, 2010). As primeiras observações dos efeitos tóxicos causados pela exposição ao cádmio foram feitas por Sovet (1858), onde foram reportados sintomas gastrointestinais agudos e respiratórios tardios em pessoas que utilizavam o pó de carbonato de cádmio como agente de polimento. Stephens (1920), reportou o envenenamento por cádmio em trabalhadores, e a partir daí vários autores passaram a descrever casos em pessoas que estavam expostas ao cádmio no seu ambiente de trabalho: Bulmer et al. (1938) reporta danos nos pulmões; Nicaud et al. (1942) observa efeitos sistêmicos e osteomalácia; Friberg (1948) apresentou o primeiro relatório caracterizando a combinação entre proteinúria e enfisema, em exposição crônica ao metal, confirmadas mais tarde por outros autores como Bonnell (1955) e Lauwerys et al. (1974). Friberg (1950, 1952), na continuação dos seus estudos, faz as primeiras observações em relação à lenta e prolongada excreção do metal através do uso de cádmio radioativo em cobaias, onde foi observada pequena excreção do metal nos primeiros dois meses, e um aumento da excreção em pelo menos 50 vezes, posteriormente, junto ao aparecimento da proteinúria. Na década de 1940 foram reportados efeitos da exposição ambiental, onde foram observados efeitos agudos gastrointestinais como vômito e diarreia em pessoas que consumiam alimentos e água contaminados pelo metal (UNITED STATES PHS, 1942).

A doença de *Itai-itai* foi um fato de envenenamento por cádmio muito grave que despertou a atenção mundial, ocorrida em Toyama no Japão, após a Segunda Guerra Mundial (HAGINO, 1957), os resíduos líquidos da mina de Kamioka foram contaminados com cádmio, já que este é um subproduto na produção de zinco. A doença foi relacionada à poluição do meio ambiente, já que o cádmio produzido na mineração acabou por contaminar a bacia do rio Jinzu e dessa forma chegar às

plantações de arroz, ocorrendo a exposição da população em geral (KAJI, 2012) (figura 6).

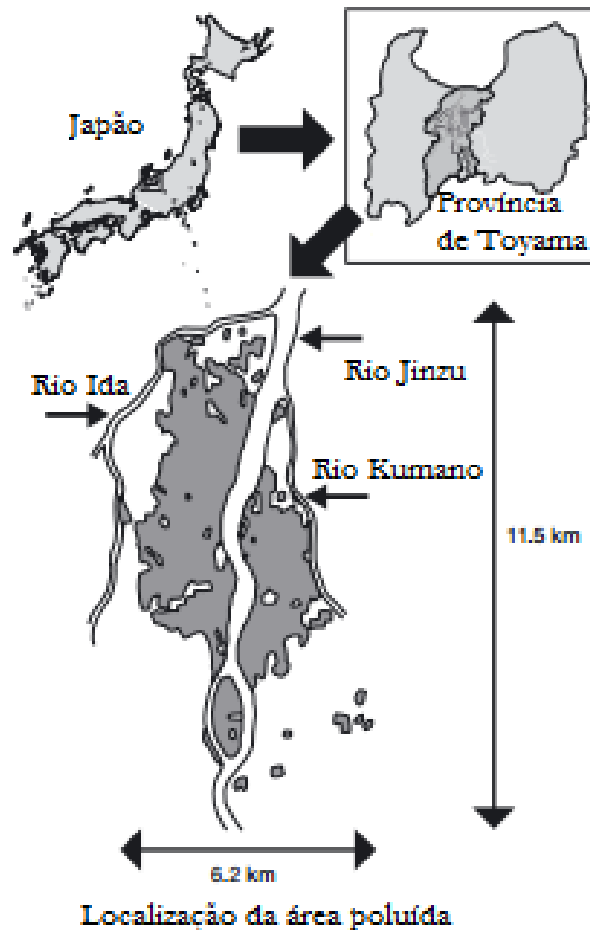


Figura 6 – Mapa da região poluída da bacia do rio Jinzu na Planície de Toyama no Japão.

Fonte: Modificado de Kaji (2012).

A doença foi caracterizada por fraturas e dores severas nos ossos, relacionadas à osteomalácia, com aumento dos níveis séricos de fosfatase alcalina e diminuição do cálcio e fosfato, além de anemia e disfunções gastrointestinais e renais (ISHIZAKI, 1969; MURATA et al., 1970), com níveis elevados de cádmio na urina (ISHIZAKI, 1969). No momento em que a doença *Itai-Itai* foi identificada e diretamente relacionada com o cádmio no Japão, as pesquisas sobre toxicologia, toxicocinética e efeitos na saúde em humanos desse metal são até hoje largamente estudadas (BABA et al., 2014).

### 1.3.2 Propriedades

O cádmio é um elemento químico pertencente aos metais, encontra-se no 5º período da família 12 da tabela periódica dos elementos de Mendeleev, com configuração eletrônica  $[\text{Kr}] 4d^{10}5s^2$  e número atômico 48, o estado de oxidação do seu íon é +2 e o raio desses íons divalentes é de 0,92Å. Tem peso molecular de 112,41 g/mol e densidade de 8,65 g/cm<sup>3</sup> a 25°C (ASM HANDBOOK, 1979; DAVID, 2009), pode ser definido como metal pesado (massa com densidade superior a 6 g/cm<sup>3</sup>) conforme definições descritas por Alloway e Ayres (1993); porém, inúmeras definições para o termo “metal pesado” são encontradas na literatura, algumas destas teorias baseiam-se na densidade atômica, no peso ou número atômico ou ainda nas propriedades químicas destes elementos. Constantemente este termo é empregado a um grupo de elementos que estão associados a problemas de poluição e toxicidade (HUANG et al., 2014).

É um metal branco azulado, macio, maleável, dúctil e resistente a corrosão. Seu ponto de fusão é aproximadamente 321°C e de ebulição aproximadamente 765°C, porém, por ser um metal muito reativo, tem a propriedade de emitir pequenas partículas na atmosfera em temperaturas bem abaixo do seu ponto de ebulição, por transformar-se rapidamente, em contato com o ar, em óxido de cádmio (CdO).

Pode ser encontrado na forma de sais (óxido, cloreto, sulfato) onde possui a característica de elevada estabilidade térmica e química (ASM HANDBOOK, 1979; DAVID, 2009), e cada uma das suas formas possui características específicas de solubilidade, o  $\text{Cd}^{+2}$  (estado de oxidação mais comum) é insolúvel em água (THE MERCK INDEX, 1983). O CdO é encontrado em duas formas, pó amorfo incolor ou cristais vermelho/castanho, é insolúvel em água, soda e potassa e solúvel em ácidos. O cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ), nitrato de cádmio ( $\text{Cd}[\text{NO}_3]_2$ ) e o sulfato de cádmio são cristais incolores, solúveis em água e ácidos. Já o sulfeto de cádmio (CdS), encontrado na forma de cristais amarelo-limão ou vermelho, dependendo do método de obtenção, é insolúvel em água, entretanto em contato com ácidos concentrados libera sulfeto de hidrogênio (ANDUJAR; BENSEFA-COLAS; DESCATHA, 2010).

### 1.3.3 Fontes de exposição

O cádmio é um elemento de relativamente baixa abundância na natureza, sendo encontrado principalmente como subproduto no tratamento de minérios. Em torno de 80% do cádmio é utilizado na sua forma metálica em baterias recarregáveis de níquel-cádmio ou em pilhas elétricas alcalinas. Aproximadamente 10% de cádmio são usados como pigmentos, com coloração vermelho escuro e amarelo, utilizados nas pinturas de vidros, plásticos e colorações de esmaltes, sendo extremamente resistentes a altas temperaturas. Também é depositado sob metais para lhes dar um revestimento anticorrosivo; e pode ser utilizado como estabilizador de certos polímeros, lhes conferindo uma maior resistência ao calor e radiação ultravioleta. Está presente como impureza em fertilizantes fosfatados, durante a combustão de matéria orgânica fóssil (petróleo, gás, carvão) e na lama formada nas estações de tratamento de esgoto e no processo de incineração do lixo (ANDUJAR; BENSEFA-COLAS; DESCATHA, 2010).

A contaminação agrícola através do solo leva a um aumento da captação desse metal por culturas e hortaliças cultivadas para consumo humano. Sendo assim, a dieta passa a ser a principal fonte de exposição ao cádmio pelo grupo populacional não fumante, pois o cádmio está presente em vários alimentos, porém as concentrações são variáveis dependendo do tipo de alimento e o nível de contaminação do meio ambiente. Altas concentrações podem ser encontradas em frutos do mar, como em moluscos e crustáceos; vísceras e miúdos; certos cereais, como arroz e trigo; sementes oleaginosas, como a do cacau; cogumelos, como em *champignons*; alimentos provenientes de plantas (como em vegetais de folha verde, batata, cenoura e aipo), e menores concentrações na carne, no ovo, no leite e em produtos lácteos (JÄRUP; ÅKESSON, 2009).

A média de ingestão de cádmio através dos alimentos mais propícios a contaminação do metal (como cereais, legumes e batata), varia entre 8 e 25 µg por dia (LARSEN et al., 2002; LLOBET et al., 2003; OLSSON et al., 2002; YSART et al., 2007). Conforme a Organização Mundial da Saúde, o limite de ingestão mensal tolerável é de 25 µg/kg de peso corporal (WHO, 2010). O cádmio na água potável (OLSSON et al., 2002), assim como no ar (VAHTER et al., 1991), contribui apenas com uma pequena porcentagem na dose total absorvida do metal; a não ser em

áreas contaminadas, onde água de poços e rios e o ar possam estar substancialmente contaminados, mesmo após o encerramento da fonte emissora (HOGERVORST et al., 2007).

O tabagismo é outra importante fonte de exposição, as folhas de tabaco podem acumular uma quantidade significativa de cádmio. Um cigarro pode conter de 1 a 2 µg de cádmio, dependendo do tipo e da marca, onde cerca de 10% do teor de cádmio é inalado e desses aproximadamente 50% chegam aos pulmões. Estima-se que uma pessoa que fuma 20 cigarros por dia possa absorver até 1-3 µg de cádmio, sendo esta uma ingesta adicional, o que faz com que fumantes crônicos tenham mais que o dobro da carga corporal do metal comparado a pessoas não fumantes (WILLERS; GERHARDSSON; LUNDH, 2005; ARORA et al., 2008; MCELROY et al., 2007).

#### 1.3.4 Toxicocinética

A absorção do cádmio pela via respiratória se dá principalmente quando há exposição a fumaças e vapores contaminados com o metal, e dessa maneira, o pulmão é o local de deposição e dano tecidual. As características físico-químicas da partícula de cádmio (espécie, granulometria, grau de solubilidade em água, etc.), a concentração e a quantidade inalada interferem diretamente na absorção por essa via (SCHWARTZ, 1987; SCHWARTZ; BLASKI, 1998; DO PICO, 1995). Dessa forma, a absorção por inalação do cádmio é variável, podendo ser de 10 a 30 % pelo pó de óxido de cádmio e de 25 a 50 % nos casos de vapores de óxido de cádmio (ANDUJAR; BENSEFA-COLAS; DESCATHA, 2010).

A absorção a partir do trato gastrointestinal é menor, cerca de 5 %, porém é facilitada pela deficiência em ferro e diminuída em uma dieta rica em fibras (ANDERSEN; NIELSEN; NORDBERG, 2004). Essa relação inversa entre quantidade de ferro no organismo e absorção de cádmio faz com que as mulheres em idade fértil retenham maiores concentrações de cádmio que os homens (VAHTER et al., 2007) (figura 7), em grande parte explicada pela estreita correlação entre a absorção do cádmio e a expressão da proteína transportadora de metal bivalente (DMT-1), esta proteína transporta o cádmio e o ferro para dentro de células da mucosa de



uma forma competitiva. E esta situação é exacerbada durante a gravidez, já que há um aumento na densidade da proteína DMT-1 para otimização na absorção de micronutrientes (VAHTER et al., 2007; ÅKESSON et al., 2002). A idade também parece ser um fator importante; idade menor a 40 anos está significativamente associada a um aumento na absorção intestinal do metal (HORIGUCHI et al., 2004). A absorção dérmica, por sua vez, é insignificante (WESTER et al., 1992).

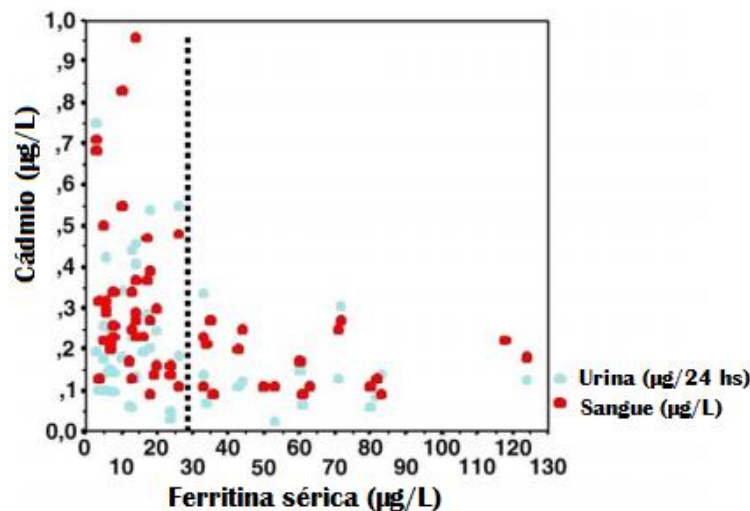


Figura 7 – Relação entre estoque de ferro no corpo associado à ferritina sérica e cádmio no sangue e na urina de 57 mulheres.

Fonte: Modificado de Berglund et al. (1994).

Após a exposição e absorção para a circulação sistêmica, o cádmio é inicialmente ligado à albumina presente no plasma sanguíneo, é distribuído rapidamente chegando ao fígado, onde a albumina é degradada e o cádmio livre induz a síntese de metalotioneínas (MT), proteína de baixo peso molecular, rica em grupos sulfidrílicos, que se liga facilmente ao cádmio. Esse complexo Cd-MT passa a ser lentamente liberado do fígado para o plasma sanguíneo, ao chegar nos rins é filtrado através da membrana glomerular, e quase todo complexo Cd-MT é reabsorvido. Posteriormente, o complexo Cd-MT sofre uma quebra e o cádmio livre é o responsável pelos danos teciduais, já que a formação do complexo Cd-MT neutraliza esses efeitos tóxicos do cádmio, porém este complexo é redistribuído por todos os órgãos (NORDBERG; NORDBERG, 1987) (figura 8).

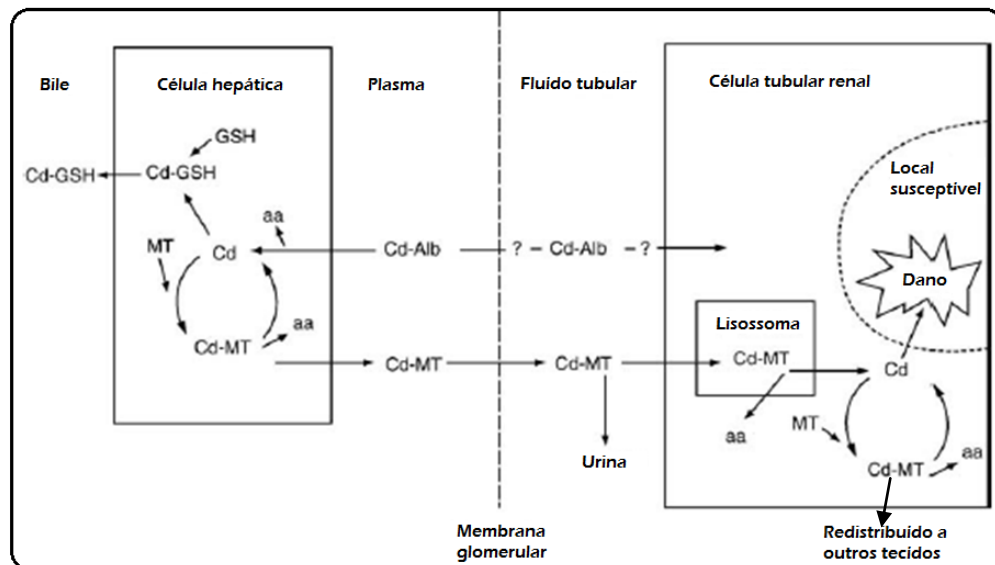


Figura 8 – Esquema básico do fluxo de cádmio no corpo, demonstrando as formas ligadas no sangue e a síntese e degradação das metalotioneínas no tecido hepático e renal.

GSH: glutationa; MT: metalotioneína; aa: aminoácidos; Alb: albumina

Fonte: Modificado de Nordberg (1984).

Ao chegar aos testículos os possíveis mecanismos para entrada do cádmio nas células de Sertoli são explicados pela difusão através dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  ou através de canais de transporte  $\text{Ca}^{+2}/\text{Zn}^{+2}$ . Ainda, estudos identificaram a proteína ZIP 8 como um transportador do metal, por fazer a troca de bicarbonato por íons de  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ou  $\text{Mn}^{+2}$  (SIU et al., 2009). Autores, também citam a entrada de cádmio pelo canal de influxo de transporte de drogas, o qual, após entrar, provocaria uma redução na expressão dos transportadores de efluxo (responsáveis pela retirada de tóxicos da célula), como a glicoproteína-P e Mrp1 (proteína associada à multirresistência a drogas) (WAN et al., 2013).

A excreção de cádmio acontece principalmente pela urina, porém é em pequena quantidade e lenta, já que sua meia vida biológica é de cerca de 20-40 anos em humanos. O aparecimento de danos nos rins pode alterar a capacidade de eliminação renal de cádmio. Uma parte muito pequena do metal é excretada pelo suco biliar (após conjugação com glutaciona), saliva, fezes e suor (ANDUJAR; BENSEFA-COLAS; DESCATHA, 2010).

### 1.3.5 Toxicidade

Apesar de os mecanismos dos danos celulares causados pelo cádmio não serem completamente determinados, sabe-se que vários tecidos são atingidos como pulmões, fígado, rins, ossos, sistema nervoso central, sistema cardiovascular, sistema imune e órgãos reprodutores (WAALKES, 2000; FOWLER, 2009). Além disso, em função das suas propriedades carcinogênicas, esse metal foi classificado na categoria 1 de carcinógenos humanos pela *International Agency for Research on Cancer* da França (IARC, 1993).

Vários mecanismos têm sido propostos como responsáveis por mediar a toxicidade celular induzida pelo cádmio, como a similaridade ao íon cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) (raio atômico) e ao íon zinco ( $\text{Zn}^{+2}$ ) (elétrons da configuração), onde o cádmio poderia substituir esses íons ( $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{+2}$ ) em processos fisiológicos fundamentais que são por eles mediados (VALKO et al., 2005). Além disto, o cádmio pode inibir a enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), a qual participa da síntese do heme, por interagir com seus resíduos cisteínicos (Brandao; Oliveira; Nogueira, 2010). A inibição desta enzima também pode levar ao acúmulo do substrato ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA), o qual possui propriedades pró-oxidantes (Emanuelli et al., 1996).

O estresse oxidativo é, de fato, um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade do cádmio (Wong; Cheng, 2011). Este metal pode reduzir os níveis de tióis não protéicos (NPSH) e, assim, causar esgotamento, por exemplo, da glutathiona (Valko et al., 2005), a qual pertence ao sistema de defesa antioxidante não enzimático do organismo, agindo como substrato de enzimas como a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona S-transferase (GST) (QUIG, 1998). Outra defesa antioxidante não enzimática utilizada pelo organismo, que tem seus níveis reduzidos pelo cádmio, é o ácido ascórbico, o qual pode estabilizar radicais livres através da doação de elétrons (TANDON et al., 2003; ACHARYA et al., 2008).

Além de afetar o sistema de defesa antioxidante não enzimático, o cádmio pode causar alterações no sistema de defesa antioxidante enzimático (Gratão et al., 2005). A glutathiona-S-transferase (GST) é uma importante enzima de detoxificação de xenobióticos, drogas e carcinogênicos (CHASSEAUD, 1979), tendo atividade antioxidante reportada (CASALINO et al., 2004) e a sua inibição pelo cádmio

também passa a contribuir para o estresse oxidativo. Além disto, a glutathione peroxidase (GPx), uma importante enzima responsável pela metabolização do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (ACHARYA et al., 2008), que não é um radical, porém torna-se uma fonte significativa da produção de radicais através da reação de Fenton (ELINDER et al., 1976).

O cádmio em si é incapaz de gerar diretamente radicais livres, entretanto, tem sido relatada a formação indireta de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) envolvendo radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) e óxido nítrico (NO) (WAISBERG et al., 2003). A supressão da função de eliminação de radicais livres e o aumento na formação de EROs causados pelo cádmio contribui para o estresse oxidativo e seus efeitos associados (SZUSTER-CLESIELSKA et al., 2000; WAISBERG et al., 2003), dessa forma, estudos relatam aumento nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobartibúrico (TBARS) induzidas pelo metal (Brandao; Oliveira; Nogueira, 2010). Além disso, as mitocôndrias também são alvo do metal (BELYAEVA et al., 2008), uma vez que o cádmio se liga aos grupos tióis das proteínas da membrana mitocondrial, afetando a permeabilidade da membrana e inibindo as reações da cadeia respiratória, com geração de EROs (DORTA et al., 2003).

Com a exposição ao agente tóxico o tecido começa a reagir levando a inflamação, as células brancas do sangue junto a fluídos atravessam a barreira vascular formando um inchaço eritematoso (LIU; QU; KADIISKA, 2009). O que nos leva a um aumento da atividade da mieloperoxidase, enzima envolvida em condições inflamatórias e dano tecidual (CUNHA et al., 2008). Nesse quadro há também um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, como interleucina (IL)-1, IL-6, fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), interferon gama ( $INF\gamma$ ) e uma diminuição de citocina anti-inflamatória, como a IL-10 (KATARANOVSKI et al., 1998; DAN et al., 2000), confirmando um processo inflamatório envolvendo o cádmio (KUESTER et al., 2002). Geralmente, os neutrófilos são a primeira linha de defesa do sistema imunológico contra patógenos, e a interação de neutrófilos recrutados no local da inflamação com células residentes, mediadores inflamatórios locais, e/ou da matriz extracelular pode levar à produção de vários outros mediadores, incluindo citocinas/quimiocinas, enzimas degradadoras, oxigênio e espécies de azoto, e metaloproteases, os quais podem ampliar ainda mais a resposta inflamatória e a lesão no tecido circundante (KASAMA et al., 2005; EYLES et al., 2006).

### 1.3.5.1 Toxicidade no tecido testicular

O cádmio pode causar graves danos a embriões e aos órgãos reprodutivos em adultos, incluindo os ovários e testículos, que são especialmente sensíveis à toxicidade desse metal (THOMPSON; BANNIGAN, 2008). Uma possível explicação para esta sensibilidade seria o “*layout*” morfológico singular da barreira entre o sangue e os testículos, por possuir uma vascularização exclusiva. Estudos têm demonstrado que exposições agudas *in vivo* ao cádmio causam uma ruptura na barreira hematotesticular, causando a perda de células germinativas, edema testicular, hemorragia, necrose e esterilidade em várias espécies de mamíferos (por exemplo, roedores, coelhos, cães, bezerros, cavalos) (LI; HEINDEL, 1998; SIU et al., 2009) (figura 9).

Alterações macroscópicas e microscópicas no tecido reprodutivo, devido à toxicidade ao cádmio, foram observadas em uma variedade de modelos animais já em 1919 por Alsberg e Schwartz; Tam e Liu em 1985 descrevem mudanças nas suas diferentes fases de crescimento e maturação do tecido testicular. Juntamente com os avanços das técnicas experimentais aplicadas em laboratórios, a toxicidade do cádmio no sistema reprodutivo masculino tem sido extensivamente estudada em animais experimentais. Baseados nos mecanismos de toxicidade já citados, há uma compilação de dados que indicam que o cádmio é incorporado a espermatogônias e espermatídes, através da perturbação da barreira hematotesticular, com consequente redução no número de células germinativas e infertilidade. Isto tem sido associado à redução da expressão das células responsáveis pela oclusão, que se pensa ser mediada pela via de sinalização da quinase TGF3/p38 MAP, o que indica o envolvimento de distúrbios nas junções oclusivas bem como nas junções aderentes levando ao colapso da barreira hematotesticular (CHUNG; CHENG, 2001). Nesse mesmo estudo, Chung e Cheng (2001), demonstraram que a testosterona neutralizou os efeitos perturbadores do cádmio às células de Sertoli, possivelmente por induzir a expressão de proteínas integras na membrana, tais como as formadoras das junções oclusivas. O que é condizente com relatos de que andrógenos promovem a integridade da barreira hematotesticular e a função das células de adesão nos testículos (MENG et al., 2005; WANG et al., 2006). Em roedores machos, sabe-se que o cádmio altera de forma significativa os níveis

circulantes de diversos hormônios como a testosterona, FSH e LH (LAFUENTE et al., 2004). Além disso, estudos anteriores demonstraram que o cádmio prejudica a produção de testosterona em células de Leydig isoladas (LASKEY; PHELPS, 1991), demonstrando que a ruptura esteroidogênica em células de Leydig é provável ser um alvo inicial de toxicidade do cádmio frente à modulação do sistema endócrino (GUNNARSSON et al., 2007).



Figura 9 – Indução de dano testicular pelo cádmio.

O esquema desenhado ilustra o testículo normal e o testículo danificado após a exposição ao cádmio, representando as mudanças morfológicas mais comuns induzida pelo cádmio. O dano histológico induzido pelo cádmio é notável ao se comparar as micrografias das seções testiculares de ratos coradas com hematoxilina e eosina, 20 horas após o tratamento com veículo (0,9% NaCl; painel superior) ou CdCl<sub>2</sub> (3 mg/kg de peso corporal; painel inferior). No testículo normal (painel superior), a ilustração demonstra uma distribuição bem organizada das células do epitélio seminífero (SC: células de Sertoli; es: espermatídias alongadas; sp: espermatócito; LC: células de Leydig; Blood vessel: vaso sanguíneo; Seminiferous tubule lumen: lúmen do túbulo seminífero). Após o tratamento com cádmio, a ruptura das junções oclusivas dos microvasos leva a fuga de células sanguíneas (BC, painel inferior), onde fica mais notório os eritrócitos no espaço intersticial. Além disso, o cádmio afetou as células de Leydig (LC), levando a uma redução na esteroidogênese; o metal também induziu necrose celular, por exemplo, pela produção de espécies reativas de oxigênio. Levando em consideração esses efeitos em conjunto, a exposição ao cádmio resultou em perda das células germinativas, causando uma esterilidade irreversível. Barra de escala de 80 µm.

Fonte: Modificado de Siu et al. (2009).

Um mecanismo de ação do cádmio sobre o tecido testicular é mais detalhado por Siu et al. (2009) (figura 10), onde é proposto que o cádmio induz a ruptura da barreira hematotesticular e desagregação das células de junção no epitélio dos seminíferos por ativação de vias de transdução de sinais específicas. O processo é descrito dividido em três fases. Na fase I, os íons do cádmio penetrariam nas células de Sertoli por diferentes mecanismos: por difusão, através de canais de cálcio ou pelo uso do transportador  $\text{Ca}^{+2}/\text{Zn}^{+2}$ . Embora exista o transportador de cádmio, o chamado ZIP8 (HE et al., 2009), presente em células de Sertoli de camundongos, não se sabe se ele está presente em todos roedores e/ou mamíferos. Uma vez dentro das células de Sertoli, o cádmio induz a síntese e a liberação de citocinas (por exemplo, o fator de transformação do crescimento beta 3 ( $\text{TGF}\beta\text{-3}$ )) que, ao interagir com os seus respectivos receptores, provocam estresse pela indução da via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos p38 (MAPK), que pode seletivamente perturbar a barreira hematotesticular, ao mesmo tempo, que possivelmente, também mediada pela via de sinalização p38 MAPK, é induzida a produção de proteases (por exemplo, a catepsina L). Na Fase II, a barreira hematotesticular é rompida através de degradação das proteínas de membrana integrais (proteases) e/ou por uma aceleração da endocitose mediada por clatrina das junções oclusivas (por exemplo, ocludina) e as proteínas do compartimento basal do epitélio seminífero (por exemplo, N-caderina). Na Fase III, a fim de limitar a proteólise indesejada e evitar a dissolução de todo o epitélio seminífero no testículo, há uma ativação da via de sinalização da c-Jun N-terminal *kinase* (c-JNK), a qual, por sua vez, estimula a produção de inibidores de proteases (por exemplo,  $\alpha\text{2}$ -macroglobulina) dando início a recuperação do epitélio seminífero.

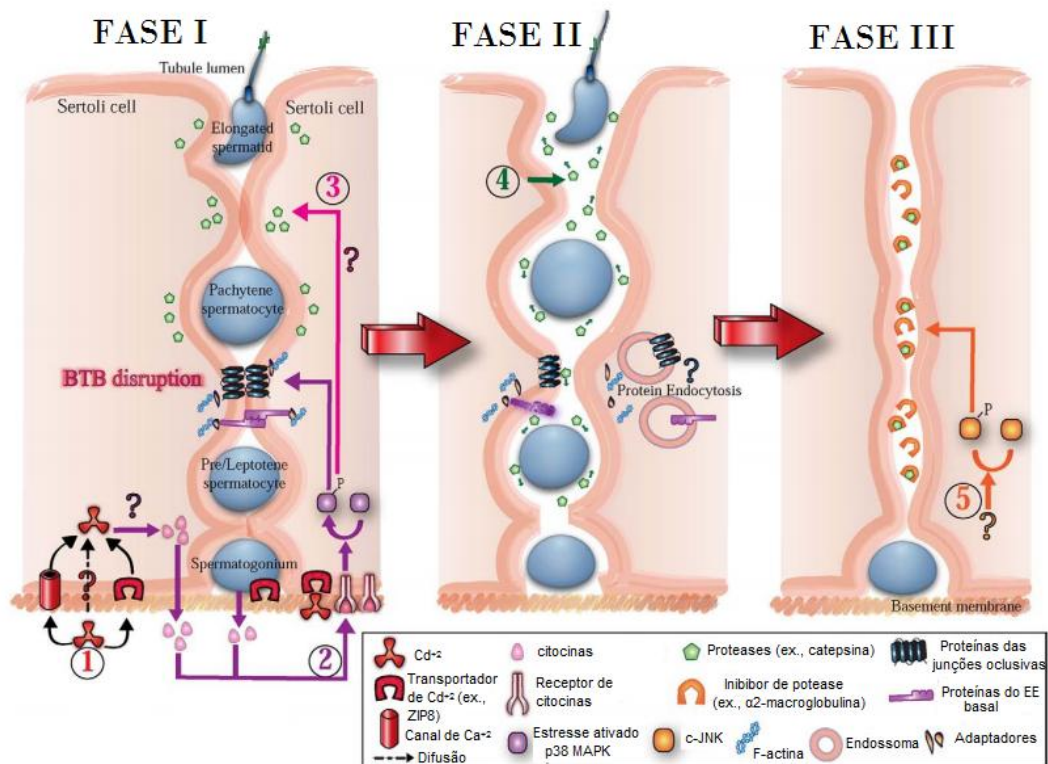


Figura 10 – Cádmio induz dano a barreira hematotesticular e rompimento das junções celulares no epitélio seminífero.

1 e 2 Penetração dos íons de  $Cd^{+2}$  nas células de Sertoli por diferentes mecanismos. 3 Indução da produção de proteases. 4 Ruptura da barreira hematotesticular e das junções da célula de Sertoli que levam à perda das células germinativas. 5 Ativação da via de sinalização responsável pela produção de inibidores de proteases.

Fonte: Modificado de Siu et al. (2009).

### 1.3.6 Tratamentos

Na terapia contra o envenenamento por metais são propostas duas estratégias principais, o uso de quelantes e o uso de antioxidantes, sob os mais variados tipos de combinações. Podem ser montadas estratégias através do desenvolvimento de novos agentes quelantes (MISHRA; MEHTA; FLORA, 2008), combinação de terapia com dois agentes quelantes (FLORA et al., 2002; BHADAURIA; FLORA, 2007; FLORA; SAXENA, 2004), agente(s) quelante(s) junto a antioxidantes (MISHRA; FLORA, 2008; FLORA; PANDE; MEHTA, 2003), agente quelante junto a micronutrientes (MODI; FLORA, 2007) e agente quelante junto a extratos de plantas (MISHRA et al., 2008; FLORA; METHA; GUPTA, 2009).



Os agentes quelantes são compostos orgânicos ou inorgânicos capazes de se ligar aos íons metálicos formando complexos chamados de “quelatos”, com o objetivo de remover o metal tóxico de um local específico e facilitar sua excreção do organismo. Os principais átomos presentes geralmente são os de enxofre (S), nitrogênio (N) e oxigênio (O), aparecendo na forma dos grupos químicos como -SH, -SS, -NH<sub>2</sub>, =NH, -OH, >C=O, etc (ANDERSEN, 1999). Podemos citar como exemplos de agentes quelantes usados nas terapias de envenenamento por metais pesados o ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) e seus derivados (como o CaNa<sub>2</sub>EDTA), o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) e o ácido 2,3-dimercaptopropano-1-sulfônico (DMPS), sendo esses dois últimos derivados do 2,3-dimercaptopropanol (BAL) (FLORA; PACHAURI, 2010).

A indução de formação de espécies reativas pelos metais leva a um consequente esgotamento das defesas celulares antioxidantes, o que resulta no desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes no organismo. Dessa forma o uso de antioxidantes suplementares (exógenos) torna-se uma estratégia terapêutica a fim de aumentar a capacidade antioxidante celular, através da redução da possibilidade das espécies formadas pelos metais reagirem com biomoléculas e induzirem os danos oxidativos. Como exemplos de antioxidantes utilizados podem ser citados: vitaminas C e E, ácido  $\alpha$ -lipóico, quercetina, taurina, etc. (FLORA; PACHAURI, 2010).

#### 1.4 Oximas

As oximas são compostos geralmente usados para reverter a inibição da acetilcolinesterase (AChE) causada por compostos organofosforados (agrotóxicos pesticidas) (WOREK et al., 2004) (figura 11). As oximas de uso clássico são a obdoxima e a pralidoxima, as quais atuam na desintoxicação de organofosforados que estão ligados a enzima AChE, por um processo reacional de sucessivas ligações a enzima desloca o organofosforado do seu sítio de ligação (HACKLEY et al., 1959; LAMB et al., 1964; LUO et al., 1999). Novas estruturas de oximas têm sido estudadas, junto a suas características farmacocinéticas, e assim, novas estratégias terapêuticas têm sido consideradas para essa classe química (WOREK;

THIERMANN, 2013). Silva et al. (2008), demonstraram que oximas foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica induzida por malation em córtex pré-frontal de camundongos, além de restaurar a função da enzima AChE. Além disso, Puntel et al. (2008), demonstraram a redução de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), por uma oxima, em homogeneizados de cérebro induzidos por malonato e ferro.

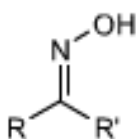


Figura 11 – Estrutura química geral das oximas

### 1.5 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são excelentes quelantes de metais de transição tais como o ferro, o cobre e o zinco (DECONTI et al., 1972). Sua habilidade de quelar íons metálicos depende da presença do sistema de coordenação tridentado N, N, S (doador brando) (YU et al., 2009) (figura 12), sendo assim, tal habilidade para quelar metais é uma estratégia atrativa no desenvolvimento de drogas (KALINOWSKI; RICHARDSON, 2005). Os efeitos químicos e biológicos das tiossemicarbazonas têm recebido um considerável interesse pela química medicinal por muitos anos, atribuído em primeiro lugar, à sua ampla utilidade farmacológica que inclui as atividades antineoplásica, antibacteriana, antiviral e antifúngica (BERALDO; GAMBINO, 2004), e em segundo lugar, pela sua versatilidade como ligante, que lhes permitem dar origem a uma grande variedade de modos de coordenação (PEDRIDO et al., 2008). Além disso, estudos relatam atividade *scavenger* de radicais livres, podendo ser atribuídos também a esses compostos a propriedade antioxidante (PRATHIMA et al., 2010).

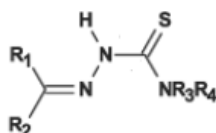


Figura 12 – Estrutura química geral das tiosemicarbazonas

### 1.6 Oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona

Em estudos preliminares desse novo composto químico (figura 13), Puntel et al. (2009), sugerem, a partir de experimentos *in vitro*, atividade antioxidante e possíveis propriedades quelantes da oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona. Nos resultados desse trabalho, esse composto apresentou uma importante atividade *scavenger* de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO); além disso, a atividade *scavenger*, pelo composto, no ensaio do DPPH• foi quatro vezes superior ao controle positivo (ácido ascórbico) utilizado, indicando um possível mecanismo antioxidante. Também foi demonstrada uma diminuição da degradação da desoxirribose induzida pela reação de  $Fe^{+2} + H_2O_2$ , sugerindo um importante efeito contra íons de  $Fe^{+2}$  e  $OH•$  formado pela reação, através de uma possível interação com o ferro. Nesse mesmo estudo, os resultados *ex vivo* demonstraram um decréscimo nos níveis de TBARS induzidos por nitroprussiato de sódio em fígado e cérebro de camundongos, o que volta a indicar o potencial *scavenger* frente ao NO do composto.

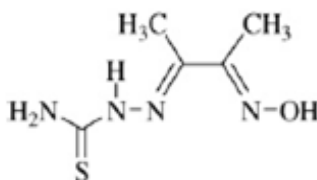


Figura 13 – Estrutura química da oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito terapêutico e possíveis mecanismos de ação do composto oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona frente ao dano testicular agudo induzido por cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) em camundongos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as propriedades antioxidantes do composto oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona frente ao dano oxidativo induzido pelo  $\text{CdCl}_2$ .
- Avaliar as propriedades anti-inflamatórias do composto oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona frente ao processo inflamatório causado pelo  $\text{CdCl}_2$ .
- Avaliar o efeito quelante do composto oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona frente ao possível acúmulo do Cd nos testículos dos camundongos expostos ao  $\text{CdCl}_2$ .
- Avaliar os efeitos do composto oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona, bem como do  $\text{CdCl}_2$ , sobre os níveis séricos de testosterona em camundongos.
- Avaliar os efeitos da oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona frente as alterações histológicas induzidas pelo  $\text{CdCl}_2$  em testículo de camundongos.

### **3 RESULTADOS**

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados na forma de um artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas do artigo estão dispostos de acordo com a recomendação do periódico científico no qual foi publicado.

## 4 ARTIGO CIENTÍFICO

**Efeitos da oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona frente ao dano testicular  
causado por cádmio em camundongos**

**Effects of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime on testicular damage  
induced by cadmium in mice**

Mayara Lutchemeyer de Freitas, Laíza Dalmolin, Lia Pavelacki Oliveira, Laís da  
Rosa Moreira, Silvane Souza Roman, Félix Alexandre Antunes Soares, Leandro  
Bresolin, Marta Maria Duarte, Ricardo Brandão



The Journal of Toxicological Sciences 37 (2012): 899-910

## Original Article

**Effects of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime on testicular damage induced by cadmium in mice**

Mayara Lutchemeyer de Freitas<sup>1</sup>, Laíza Dalmolin<sup>1</sup>, Lia Pavelacki Oliveira<sup>1</sup>,  
Laís da Rosa Moreira<sup>1</sup>, Silvane Souza Roman<sup>2</sup>, Félix Alexandre Antunes Soares<sup>3</sup>,  
Leandro Bresolin<sup>4</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>5</sup> and Ricardo Brandão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal de Santa Maria, Campus UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões,  
Campus de Erechim, Erechim, RS, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria,  
Campus UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Química, Fundação Universidade de Rio Grande, Campus Carreiros, Rio Grande, RS, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

(Received March 14, 2012; Accepted June 25, 2012)

**ABSTRACT** — Our group of studies investigated the action of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime against the testicular damage caused by cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) in mice. Mice received a single injection of CdCl<sub>2</sub> (5 mg/kg, intraperitoneally) and, after thirty minutes, the oxime (10 mg/kg, subcutaneously) was administered. Twenty four hours after the last administration, the animals were killed by cervical dislocation and the testes and serum were removed for analysis. The parameters determined were δ-aminolevulinatase (δ-ALA-D), myeloperoxidase (MPO), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) activities. The levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), nonprotein thiols (NPSH), ascorbic acid, cadmium and testosterone were also determined. In addition, histological analysis and cytokines quantification (IL-1, IL-6, IL-10, TNF-α and IFN-γ) were performed. Our results demonstrated that the oxime was effective in restoring the inhibition in δ-ALA-D activity induced by CdCl<sub>2</sub>. The activation of MPO and increase in IL-1, IL-6, TNF-α and IFN-γ levels induced by CdCl<sub>2</sub> were also reduced by oxime. IL-10, which was reduced by cadmium, was restored by oxime administration. In addition, the oxime was effective in restoring the increase in TBARS levels and the reduction on NPSH levels induced by CdCl<sub>2</sub>. Our results demonstrated that oxime was effective in containing the histological alterations induced by CdCl<sub>2</sub>. In addition, oxime was able to increase the testosterone levels, reduced by cadmium exposure. In conclusion, the oxime tested was effective in reducing the testicular damage induced by CdCl<sub>2</sub> in mice. The beneficial effects of this oxime are related to its antioxidant and anti-inflammatory action.

**Key words:** Cadmium, Butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime, Testes, Oxidative stress, Inflammation

**INTRODUCTION**

Cadmium is an occupationally and environmentally important toxic element that is present in air, soil, sediment, and water. The non-occupational exposure is mainly from the diet and smoking (Satarug and Moore, 2004). Cadmium accumulates in the human body with a long biological half-life of 20-40 years. The targets of cadmium toxicity include lung, liver, kidney, bone, cardi-

ovascular system and immune system (World Health Organization, 2000; Fowler, 2009), where cadmium-induced cell death leads to loss of function. Testes can be particularly affected by cadmium, since this tissue has a unique vascular system (Mason *et al.*, 1964), where blood-testis barrier is more vulnerable to cadmium toxicity (Setchell and Waites, 1970). Cadmium has been shown to affect testes weight and cause histopathological lesions, which result in reduced sperm counts and impaired sperm

Correspondence: Ricardo Brandão (E-mail: ricardo\_br79@yahoo.com.br)

motility (Xu *et al.*, 2001).

Although it is seen an overall toxic effect when administered cadmium in the body due to a synergy of mechanisms, it is possible that one mechanism will predominate in a specific cell type. Since there is not a complete elucidation of mechanisms, several have been suggested including ionic and molecular mimicry (Bridges and Zalups, 2005), interference with cell adhesion and signaling (Thompson *et al.*, 2005), inhibition of energy metabolism (Muller, 1986), apoptosis (Zhou *et al.*, 1999), genotoxicity and cell-cycle disturbance (Yang *et al.*, 2004). Oteiza *et al.* (1999) have demonstrated that reactive oxygen species (ROS) are involved in cadmium-induced testicular damage, since testes of rats exposed to cadmium presented protein and lipid oxidation. In addition, increased expression of several mediators, including several cytokines, has been demonstrated in rodent following cadmium exposure (Kayama *et al.*, 1995a, 1995b). Testicular macrophages secrete pro-inflammatory as well as anti-inflammatory cytokines. The biological significance of these mediators for testicular function is unknown, but they appear to be involved in immunologic surveillance, immunoregulation, and tissue remodeling (Gaytan *et al.*, 1995). However, the activation of phagocytes in male rats administered intraperitoneally with cadmium, can represent a potential risk for tissue injury, due to production of a variety of molecules, including proteolytic enzymes, reactive oxygen species and cytokines, which might be deleterious when excessively activated (Duffield, 2003).

Oximes, such as pralidoxime and obidoxime, are compounds generally used to reverse the acetylcholinesterase (AChE) inhibition caused by organophosphate agents (Worek *et al.*, 2004). Puntel *et al.* (2009) suggested, in an *in vitro* study, antioxidant and possible chelating properties of a new oxime, the butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime (Fig. 1). The administration of antioxidants, such as glutathione, vitamins C and E, selenium,  $\beta$ -carotene and quercetin, has been reported to protect against

cadmium-induced tissue damage (El-Demerdash *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006; Ognjanovic *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2006), and chelation therapy with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and sodium 2,3-dimercapto-propane-1-sulphonate (DMPS) (Aposhian *et al.*, 1995; Rooney, 2007) has been proposed against metals poisoning, including cadmium. Thus, since the butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime present interesting pharmacological properties, the aim of this study was to investigate the restorative effect of this new oxime against the testicular damage induced by cadmium in mice. To this end, we determined several parameters indicative of toxicity, inflammation and oxidative stress.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).  $\delta$ -Aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA), *p*-dimethylaminobenzaldehyde and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime was prepared by the mixture of 1 mol diacetylmonoxime with 1 mol of thiosemicarbazide, both dissolved in ethanol, and made acid by the addition of 0.5 ml of acetic acid 0.1 M. After three hours of stirring and reflux, a pale yellow product was formed, collected by filtration, washed with water and dried in vacuum, yield 70%, mp  $225^\circ\text{C}$ . IR:  $\nu = 1595\text{ cm}^{-1}$  (C = N),  $1296\text{ cm}^{-1}$  (C = S),  $1087\text{ cm}^{-1}$  (O–N),  $3251\text{ cm}^{-1}$  (N–H),  $3420\text{ cm}^{-1}$  (O–H).

### Animals

Male adult Swiss albino mice (25–35 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept in a separate animal room, on a 12 hr light/dark cycle, at temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , with free access to food and water. This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of Universidad Federal de Santa Maria.

### Exposure

Mice received a single injection of  $\text{CdCl}_2$  intraperitoneally (i.p.) at 5 mg/kg body weight (10 ml/kg, dissolved in saline) (Santos *et al.*, 2004, 2005). Thirty minutes after the injection of  $\text{CdCl}_2$ , mice received a single subcutaneous (s.c.) administration of the butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime at 10 mg/kg (10 ml/kg, dissolved in dimethyl sulfoxide 10%) (Puntel *et al.*, 2009).

The protocol of mice treatment is given below:

Group 1: saline (i.p.) + DMSO 10% (s.c.)

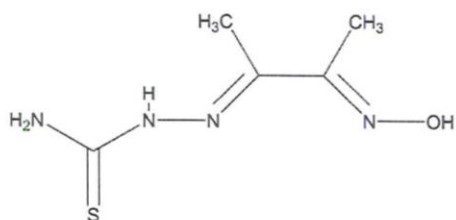


Fig. 1. Chemical structure of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime.



## Effects of a new oxime on testicular damage induced by cadmium

Group 2: CdCl<sub>2</sub> (i.p.) + DMSO 10% (s.c.)

Group 3: saline (i.p.) + butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime (s.c.)

Group 4: CdCl<sub>2</sub> (i.p.) + butane-2,3-dionethiosemicarbazone oxime (s.c.)

Twenty-four hours after the last injection, mice were killed by cervical dislocation and testes were removed. The tissue samples were homogenized in 50 mM Tris/HCl, pH 7.4 (1/10, w/v) and centrifuged at 2,400 × g for 15 min. The low-speed supernatants (S<sub>1</sub>) were separated and used for biochemical analyses.

#### δ-Aminolevulinatase dehydratase (δ-ALA-D) activity

Persuasive evidence has indicated that δ-ALA-D is extremely sensitive to the presence of pro-oxidants agents (Luchese *et al.*, 2007), which oxidize SH-groups essential for the enzyme activity. δ-ALA-D activity was assayed according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product porphobilinogen (PBG) formation except that 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 and 2.4 mM of aminolevulinic acid (ALA) were used (Barbosa *et al.*, 1998). An aliquot of 200 μl of S<sub>1</sub> was incubated at 37°C for 90 min. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm. δ-ALA-D activity was expressed as nmol PBG/mg protein/hr.

#### Lipid peroxidation

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels, a measure of lipid peroxidation, were determined as described by Ohkawa *et al.* (1979) by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) as an end product of lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (TBA). Briefly, the reaction mixture, containing an aliquot (200 μl) of S<sub>1</sub> or standard (0.03 mM MDA), 200 μl of 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 500 μl of 0.8% TBA and 500 μl of acetic acid solution (2.5 M HCl, pH 3.4), was heated at 95°C for 120 min. The absorbance was read at 532 nm and the data expressed as nmol MDA/mg protein.

#### Myeloperoxidase (MPO) activity

Myeloperoxidase activity, an index of polymorphonuclear leukocyte accumulation, was determined by modification the method described by Mullane *et al.* (1985). The testicular sample was homogenized (1:5) with buffer sodium acetate 80 mM (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide (HTAB) and centrifuged for 20 min at 11,200 × g at 4°C. An aliquot of the supernatant was then allowed to react with a solution of

buffer sodium acetate 80 mM (pH 5.4) containing 15% of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and tetra-methyl-benzidine (TMB) 18.4 mM, incubate for 3 min at 37°C, then add glacial acetic acid, into ice. The absorbance was measured by spectrophotometry at 630 nm and the data expressed as control percentage.

#### Nonprotein thiols (NPSH) levels

NPSH levels were determined by the method of Ellman (1959). This method is simple, fast, direct, and an ideal method for determining the content of -SH in pure protein solution. To determine NPSH of testes, an aliquot of S<sub>1</sub> (500 μl) was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid. After centrifugation, an aliquot (200 μl) of supernatant was added in a medium containing 1 M potassium phosphate buffer (750 μl), pH 7.4 and 10 mM 5,5'- dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (50 μl). The color reaction was measured at 412 nm. NPSH levels were expressed as μmol NPSH/g tissue.

#### Ascorbic acid levels

Ascorbic acid (AA) determination was performed as described by Jacques-Silva *et al.* (2001). S<sub>1</sub> was precipitated in 10 volumes of a cold 5% trichloroacetic acid solution. An aliquot of sample (300 μl), in a final volume of 1 ml of the solution, was incubated at 38°C for 3 hr, then 500 μl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 65 % (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using color reagent containing 4.5 mg/ml dinitrophenyl hydrazine and CuSO<sub>4</sub> (0.075 mg/ml) and the data expressed as μg AA/g tissue.

#### Glutathione-S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of Habig *et al.* (1974). The reaction mixture contained an aliquot of S<sub>1</sub>, 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, 100 mM glutathione (GSH) and 100 mM CDNB. The enzymatic activity was expressed as μmol CDNB conjugated/min/mg protein.

#### Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was assayed spectrophotometrically by the method of Wendel (1981), through the GSH/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 340 nm. S<sub>1</sub> was added in GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In this assay, the enzyme activity is indirectly measured by means of NADPH decay. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is decomposed generating GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase present in the assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as

nmol NADPH/min/mg protein.

### Cytokines quantification

The serum cytokines quantification was assessed by ELISA, using commercial kits for interleukins (IL-1, IL-6, IL-10), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) (eBIOSCIENCE, San Diego, CA, USA), according to manufacturer's instructions. The results were expressed as  $\mu\text{g/ml}$  serum to IFN- $\gamma$  and  $\text{pg/ml}$  serum to others parameters.

### Cadmium concentration

Determination of cadmium levels was performed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICPE-9000; Shimadzu Scientific Instruments, East Greenbush, NY, USA). Testes were digested with concentrated nitric acid (1/1, w/v) at 60°C for 12 hr, after that, samples were diluted 10 times with deionized water and analyzed in ICPE. The standard used to make the standard curve (0.5-10 micrograms/l) was the Fluka. Results were expressed as n grams/ g tissue.

### Testosterone levels

Serum testosterone levels were assayed by radioimmunoassay (RIA), using commercial reagent (Total testosterone, Coat-A-Count®, DPC, Los Angeles, CA, USA) with the hormone marked with  $^{125}\text{I}$  (radioactive tracer). The radioactivity was measured by automatic counter for determining the standard curve and the concentration of the samples. Results were expressed as ng/ml serum.

### Histological analysis

At death, all mice were subjected to a thorough necropsy evaluation. Histological analysis was performed from three animals per group and was randomly selected the picture of one animal per group. Organ weight for testes was recorded, and tissues were fixed in 10% formalin. For light microscopy examination, tissues were embedded in paraffin, sectioned at 4  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin and eosin.

### Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

### Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  S.D. Statistical analysis was performed to compare treated to respective control groups using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test when appropriate. Main effects are presented only when

the higher second order interaction was non-significant. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### $\delta$ -ALA-D activity

Two-way ANOVA data yielded a significant main effect of  $\text{CdCl}_2$  ( $p < 0.001$ ) and oxime ( $p < 0.005$ ) in  $\delta$ -ALA-D activity (Fig. 2). Post hoc comparisons demonstrated an inhibition in  $\delta$ -ALA-D activity in  $\text{CdCl}_2$  group (~27%) when compared to the control group. Treatment with oxime was partially effective in reverse the inhibition caused by  $\text{CdCl}_2$ . The group treated only with the oxime did not show difference in the activity of  $\delta$ -ALA-D compared to the control.

### Lipid peroxidation

A significant  $\text{CdCl}_2$  x oxime interaction in testicular TBARS levels was observed ( $F_{1,44}=11.43$ ,  $p < 0.0015$ ) (Fig. 3). Post hoc comparisons demonstrated that mice exposed to  $\text{CdCl}_2$  presented an increase (about 4.0-times) in TBARS levels when compared to those of the control group. Treatment with oxime was effective in restoring the increase in TBARS levels caused by  $\text{CdCl}_2$ , reaching the levels of control group.

### MPO activity

Two-way ANOVA revealed a significant interaction between  $\text{CdCl}_2$  and oxime in testicular MPO activity ( $F_{1,21} = 6.33$ ,  $p < 0.0201$ ) (Fig. 4). Post hoc comparisons demonstrated that mice exposed to  $\text{CdCl}_2$  presented an increase in MPO activity, up to sixteen times compared to control group. Administration of the oxime was partially effective in decreasing this activation, since reduced the values to half, but not reaching the control levels.

### NPSH levels

Two-way ANOVA of data demonstrated a significant  $\text{CdCl}_2$  x oxime interaction on testicular NPSH levels ( $F_{1,40} = 6.29$ ,  $p < 0.0163$ ) (Table 1).  $\text{CdCl}_2$  exposure caused a reduction (~59%) in testicular NPSH levels when compared to those found in the control group. Treatment with the oxime was effective in improving the NPSH levels reduced by  $\text{CdCl}_2$  exposure, but not to the control levels.

### Ascorbic acid levels

Two-way ANOVA of ascorbic acid data yielded a significant main effect of  $\text{CdCl}_2$  ( $p < 0.001$ ) (Table 1). Post hoc comparison demonstrated that mice exposed to  $\text{CdCl}_2$  presented a reduction (~49%) in ascorbic acid levels when

Effects of a new oxime on testicular damage induced by cadmium

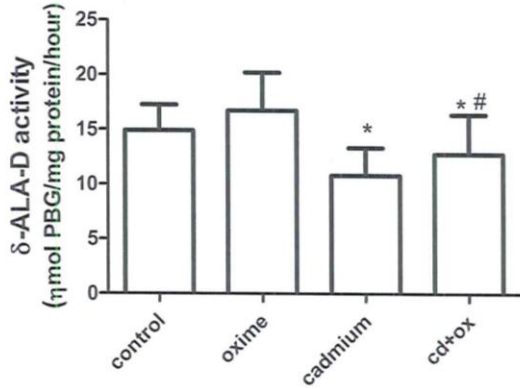


Fig. 2. Effect of oxime on the delta-ALA-D activity in the testicular tissue of Cd-treated mice. \*Results differ significantly from control group (p < 0.05). # Results differ significantly from cadmium group (p < 0.05).

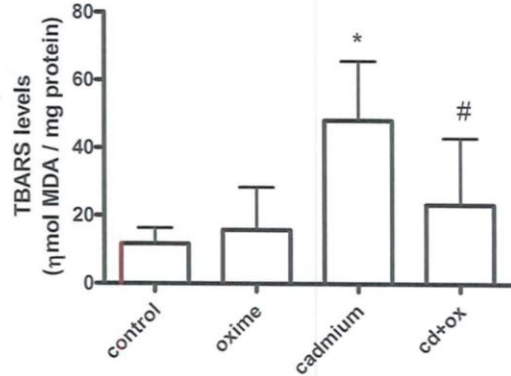


Fig. 3. Effect of oxime on the TBARS levels in the testicular tissue of Cd-treated mice. \*Results differ significantly from control group (p < 0.05). # Results differ significantly from cadmium group (p < 0.05).

Table 1. Effect of oxime on the NPSH and ascorbic acid levels in the testicular tissue of Cd-treated mice

	NPSH (μmol/g tissue)	Ascorbic acid (μgAA/g tissue)
Control	14.61 ± 1.3	187.87 ± 40.2
Oxime	14.85 ± 1.1	187.90 ± 55.8
Cadmium	5.99 ± 1.3*	96.02 ± 23.5*
Cd+Ox	9.07 ± 3.6**	107.81 ± 51.2*

\*Results differ significantly from control group (p < 0.05).  
# Results differ significantly from cadmium group (p < 0.05).

Table 2. Effect of oxime in GST and GPx activities in the testicular tissue of Cd-treated mice

	GST (μmol CDNB conjugated/min/mg protein)	GPx (nmol NADPH/min/mg protein)
Control	4.43 ± 1.0	104.66 ± 61.5
Oxime	4.52 ± 0.9	86.15 ± 15.4
Cadmium	3.33 ± 0.9*	198.87 ± 55.9*
Cd+Ox	3.18 ± 1.2*	182.94 ± 66.1*

\*Results differ significantly from control group (p < 0.05).

compared to those of the control group. The oxime treatment was not effective to reverse the decline in ascorbic acid levels.

**GST activity**

Two-way ANOVA of GST activity data yielded a significant main effect of CdCl<sub>2</sub> (p < 0.001) (Table 2). Post hoc comparison demonstrated an inhibition in testicular GST activity in mice exposed to CdCl<sub>2</sub> (~25%) when compared to the control group. Treatment with oxime was not effective in restoring this inhibition.

**GPx activity**

Two-way ANOVA demonstrated a significant main effect of CdCl<sub>2</sub> (p < 0.001) (Table 2) in testicular GPx

activity. Data showed values of GPx activity increased (~90%) in the group of mice exposed to CdCl<sub>2</sub> when compared to the control group. The group that received CdCl<sub>2</sub> and oxime presented similar values when compared to the CdCl<sub>2</sub> group.

**Cytokines quantification**

Two-way ANOVA revealed a significant interaction between CdCl<sub>2</sub> and oxime in the levels of IL-1 (F<sub>1,10</sub> = 10.35, p < 0.0092), IL-6 (F<sub>1,10</sub> = 5.35, p < 0.0043), TNF-α (F<sub>1,10</sub> = 8.18, p < 0.017), IFN-γ (F<sub>1,10</sub> = 15.05, p < 0.0028) and IL-10 (F<sub>1,10</sub> = 48.71, p < 0.0001) (Table 3). Post hoc comparisons demonstrated that mice exposed to CdCl<sub>2</sub> presented an increase in IL-1, IL-6, TNF-α and IFN-γ of approximately three times compared to con-

trol group. Oxime administration was partially effective in decrease these levels. Already the levels of IL-10 were reduced in mice exposed to CdCl<sub>2</sub> (~23%), when compared to the control group. The oxime treatment was effective in avoid this reduction.

### Cadmium concentration

Kruskal-Wallis test of cadmium concentration demonstrated an increase in the levels of this metal in the testes of mice exposed to CdCl<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). Oxime exposure was not able in reducing the concentration of cadmium in testicular tissue of mice exposed to CdCl<sub>2</sub>. Control and oxime groups did not present detectable levels of metal (Fig. 5).

### Testosterone levels

Two-way ANOVA data yielded a significant main effect of CdCl<sub>2</sub> ( $p < 0.001$ ) and oxime ( $p < 0.005$ ) in testosterone levels (Fig. 6). The testosterone levels of the mice treated with CdCl<sub>2</sub> were no detectable. Post hoc comparisons demonstrated that the treatment with oxime was partially effective in increase these levels.

### Histological analysis

The microscopic analysis of structure seminiferous tubules of mice demonstrated that control (Figs. 7A and 7B) and oxime (Figs. 7C and 7D) groups showed structures with normal aspect: seminiferous tubules, spermatogonia, spermatocyte and spermatids. Cadmium group is characterized by no elongation of spermatids in the tubular lumen and increase in intertubular space, suggesting edema formation (Figs. 7E and 7F), moreover shows the spermatogonia and spermatocyte cells with intense cytoplasmic eosinophilia in the tubular lumen. Treatment with oxime was able to preserve the histological characteristic, with moderate cytoplasmic eosinophilia and mainly by present alongating spermatids in the tubular lumen that characterize maturation spermatid. In addition, the presence of edema was reduced in mice treated with oxime when compared to the CdCl<sub>2</sub> group (Figs. 7G and 7H).

## DISCUSSION

In this study, cadmium exposure caused testicular damage in mice, and the butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime was tested, under the parameters of toxicity, inflammation and oxidative stress, showing an restorative effect. Other studies have demonstrated that the testes are more sensitive to cadmium than other important organs, and that low doses with no detectable effect on general health can interfere with the testicular function

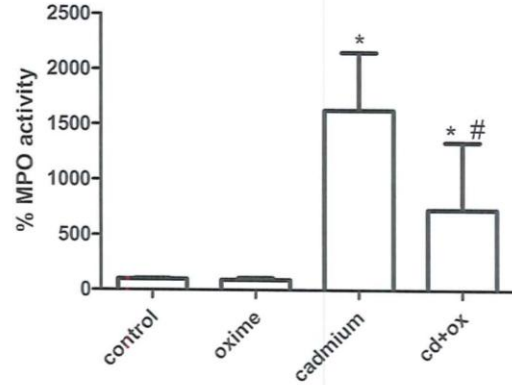


Fig. 4. Effect of oxime on MPO activity in the testicular tissue of Cd-treated mice. \*Results differ significantly from control group ( $p < 0.05$ ). # Results differ significantly from cadmium group ( $p < 0.05$ ).

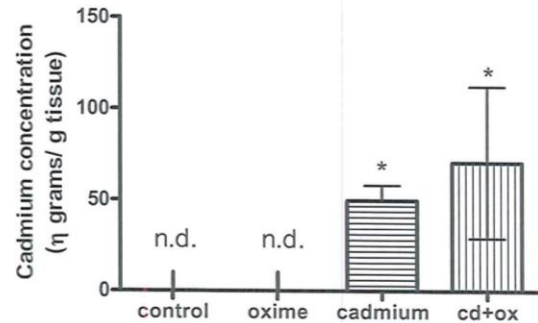


Fig. 5. Effect of oxime on the cadmium concentration in the testicular tissue of Cd-treated mice. \*Results differ significantly from control group ( $p < 0.05$ ).

(Swiergosz-Kowalewska, 2001; Siu *et al.*, 2009). Oximes are compounds generally used to reverse the acetylcholinesterase (AChE) inhibition caused by organophosphate insecticides, which are widely used in agriculture (Worek *et al.*, 2004). However, this is the first time that a compound of this class, the butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime, presented beneficial effect against toxicity induced by cadmium.

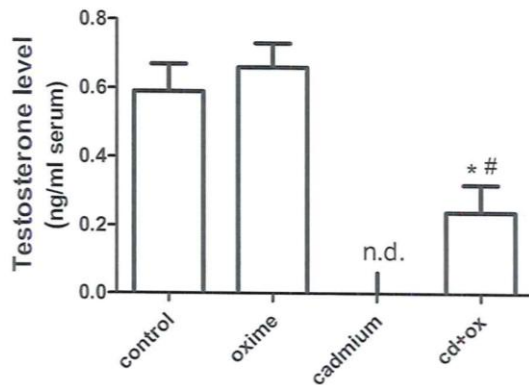
Our results show inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity caused for CdCl<sub>2</sub>, demonstrating a toxic effect of this metal in testicular tissue.  $\delta$ -ALA-D is a sulfhydryl enzyme (Gibson *et al.*, 1955) and numerous metals such as mercury (Rocha *et al.*, 1995), lead (Santos *et al.*, 2006), cadmium (Santos *et al.*, 2005) and other compounds that oxi-

## Effects of a new oxime on testicular damage induced by cadmium

**Table 3.** Effect of oxime on the IL-1, IL-6, TNF, INFg and IL-10 levels in the serum of Cd-treated mice

	IL-1 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF (pg/ml)	INFg (µg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Control	38.50 ± 2.88	44.50 ± 4.20	64.00 ± 3.91	74.25 ± 4.64	73.75 ± 4.99
Oxime	31.25 ± 1.25	41.00 ± 2.16	59.50 ± 1.29	66.75 ± 3.30	77.00 ± 2.16
Cadmium	134.33 ± 2.08*	134.66 ± 3.78*	150.66 ± 7.02*	233.33 ± 2.51*	56.66 ± 4.93*
Cd+Ox	107.33 ± 11.93**	120.00 ± 7.21**	133.00 ± 4.00**	199.00 ± 12.00**	88.33 ± 1.52**

\*Results differ significantly from control group ( $p < 0.05$ ). # Results differ significantly from cadmium group ( $p < 0.05$ ).



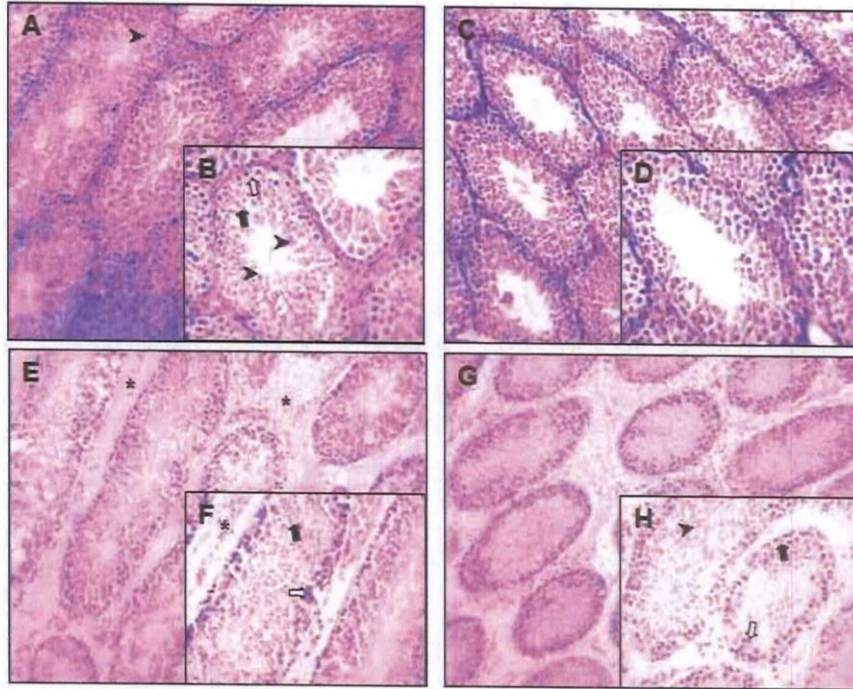
**Fig. 6.** Effect of oxime on serum testosterone levels of Cd-treated mice. \*Results differ significantly from control group ( $p < 0.05$ ). # Results differ significantly from cadmium group ( $p < 0.05$ ).

dize sulfhydryl groups modified its activity (Barbosa *et al.*, 1998). The oxime tested demonstrate no toxicity at the dose used and its administration was partially efficient in restoring the enzymatic inhibition induced by cadmium in testes of mice, indicating a beneficial effect of this oxime against the toxicity induced by CdCl<sub>2</sub> exposure. Of particular importance, the inhibition of  $\delta$ -ALA-D can lead to accumulation of ALA (Bechara *et al.*, 1993), which may autoxidize to form reactive oxygen species (ROS), such as hydroperoxides (Douki *et al.*, 1998). ROS are toxic, because they may oxidize numerous biomolecules leading to tissue injury and cell death (Yu, 1994).

The testicular damage induced by cadmium exposure was also demonstrated through histological analysis. We observed the spermatogonia and spermatocyte cells with intense cytoplasmic eosinophilia and no elongation of spermatids in the tubular lumen. The eosinophilic cytoplasm may indicate a future necrosis because it is a sign that the cell fails to make the meiosis and, consequently, does not produce sperm from spermatids (Dickins *et al.*, 2002). This result suggests a possible interfer-

ence of cadmium in spermatogenesis. Literature data have demonstrated that the caspase might be involved in cadmium-induced apoptosis (Kim *et al.*, 2000; Kondoh *et al.*, 2002) and the induction of testicular pathogenicity includes severe haemorrhage, necrosis and atrophy, as well as reduction in counts and motility of sperm and decreased the testosterone concentrations in plasma and testes (Thompson and Bannigan, 2008). In according to previous studies, another result of our study was the reduction in testosterone levels in mice exposed to cadmium. In male rodents, it is well established that Cd significantly alters the circulating levels of several hormones (e.g., testosterone, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone) (Lafuente *et al.*, 2004). Moreover, previous studies have shown that Cd impairs the testosterone production in isolated Leydig cells (Laskey and Phelps, 1991), demonstrating that steroidogenic disruption in Leydig cells is likely to be an initial target of Cd toxicity as an endocrine modulator (Gunnarsson *et al.*, 2007). The oxime treatment was effective in restoring the histological alterations induced by cadmium in testes of mice, showing structures more preserved than those presented by mice exposed only to metal. Moreover, the reduction in testosterone levels in mice exposed to cadmium was partially reversed by oxime treatment.

The histological results demonstrated also that the cadmium exposure induced the formation of edema, which was reduced by oxime treatment. It was suggested that cadmium acts principally on blood vessels (Gunn and Gould, 1970) of the testis and epididymis, making them more permeable and slowing down the testicular blood flow. In according, early studies on cadmium toxicity indicated that cadmium exposure resulting in damage to testicular blood vessels endothelium consists apparently in loss of the tight endothelial junctional barrier. This resulted in edema followed by increase in tissue fluid pressure, ischemia and finally tissue necrosis. These observations led various investigators to conclude that the damage to seminiferous tubules after cadmium administration was secondary to its effect on testis vasculature (Clegg and Carr, 1967). Since edema can be a con-



**Fig. 7.** Microscopic analysis of structure of mice seminiferous tubules with a detail the right. (A, B) Control group shows normal seminiferous tubules structure, with normal aspect of the spermatogonia (white arrow), spermatocyte (black arrow) and spermatids (arrowheads) (C, D) Oxima group shows normal seminiferous tubules structure, (E, F) Cd group shows the spermatogonia (white arrow), and spermatocyte (black arrow) cells with intense cytoplasmic eosinophilia in the tubular lumen. Note absence of elongating spermatids in the tubular lumen presence of edema evidenced by the increase in intertubular space (\*). (G,H) Cd + Oxima group shows the seminiferous tubules with histological characteristics more preserved than those of the Cd group, with moderate cytoplasmic eosinophilia of spermatogonia (white arrow), spermatocyte (black arrow) and presence of elongating spermatids in the tubular lumen (arrowheads). H.E, 10X and 25X, respectively.

sequence of inflammatory process (Wiig *et al.*, 2003), we determined the activity of MPO, an enzyme released during inflammatory conditions and tissue damage (Cunha *et al.*, 2008), beyond serum levels of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF $\gamma$ , which are pro-inflammatory cytokines and IL-10, an anti-inflammatory cytokine (Kataranovski *et al.*, 1998; Dan *et al.*, 2000). We observe that cadmium induced significant increase in MPO activity and the levels of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and INF $\gamma$  were also increased, which were associated with a correspondingly significant decrease in IL-10. These results are in according to literature, since the cadmium toxicity is closely related to inflammation process (Kuester *et al.*, 2002). In fact, the expression of the numerous genes in acute-phase proteins or inflammatory cytokines has been reported in cadmium-treated cells (Harstad and Klaassen, 2002). Oxime showed potential applicability to the control of immune responses with a

pro-inflammatory profile, through their capacity to inhibit partially the production of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  and MPO activity. In addition, the oxime was effective in avoid the reduction in IL-10 levels, a crucial anti-inflammatory mediator. Thus, we can suggest that the anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of this oxime, which was demonstrated in this study by the first time on literature, can be involved on the restorative effect of this compound against the testicular toxicity observed in mice exposed to cadmium. These effects should be considered in the development of new treatment strategies for poisoning by cadmium or other pro-inflammatory agent.

Cadmium is a least representative member of the transition element group, does not induce production of ROS though a Fenton-like redox cycling mechanism, as is the case of chromium (Stoys and Bagchi, 1996). However, cadmium does induce oxidative stress, which caus-

## Effects of a new oxime on testicular damage induced by cadmium

es DNA strand damage, lipid peroxidation, alterations in gene expression, and apoptosis (Cunha *et al.*, 2008; Hassoun and Stohs, 1995). Therefore, its toxicity is related to the production of ROS and lipid peroxidation, which is in conformity with the results found in TBARS levels dosage, a marker of oxidative stress. Free radical scavengers and antioxidants have been reported to attenuate cadmium-induced toxicity (Tang and Shaikh, 2001; Stohs *et al.*, 2000). This effect can be seen on the results obtained using the oxime, which reduced the levels of TBARS at the control levels, having the important role in the reversion of lipid peroxidation and in the protection of integrity and functioning of tissues and cells. Accordingly, in previous studies, Puntel *et al.* (2009) demonstrated that the 2,3-dione thiosemicarbazone oxime was effective in preventing the lipid peroxidation induced by different inductors in tissues of mice, in studies *in vitro* and *ex vivo*. These authors demonstrated an important scavenging activity of this oxime, at nanomolar concentrations, against hydroxyl (OH•), nitric oxide (NO) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) radicals. Thus, this compound can neutralize these radicals, ability that could explain its antioxidant mechanism. Puntel *et al.* (2009) demonstrated also that the lethal dose 50% (LD<sub>50</sub>) of the butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime is 121 mg/kg and the dose of 10 mg/kg of this oxime was effective to prevent the increase of lipid peroxidation induced by sodium nitroprusside (SNP) in tissues of mice, without causing inhibition in  $\delta$ -ALA-D activity.

The oxidative damage induced by cadmium can be related with the reduction in non-enzymatic antioxidant defenses, through of depletion of SH-group-containing compounds, such as glutathione (GSH) (Tandon *et al.*, 2003) and through of depletion in ascorbic acid content (Brandão *et al.*, 2009). Our results demonstrate decreased of NPSH levels in mice exposed to cadmium and this depletion could contribute to oxidative stress, since GSH is an important antioxidant defense, which forms complexes with Cd through the free -SH group and thereby alters Cd distribution and excretion (Acharya *et al.*, 2008; Rana and Verma, 1996). The oxime was partially effective to reverse this situation, demonstrating the involvement of NPSH on restorative effect observed in mice treated with oxime. Our results demonstrated also that the reduction in ascorbic acid levels induced by cadmium was not modified by oxime treatment. Ascorbic acid is an important water-soluble antioxidant and also acts as an anti-stress factor. It scavenges the free radicals produced by Cd and protects against endogenous oxidative DNA damage and in regenerating the reduced form of  $\alpha$ -tocopherol (Tandon *et al.*, 2003; Griffith, 1999). However, the restor-

ative effect of oxime tested against cadmium toxicity, in this study, is not related with the ascorbic acid content.

The damage induced by cadmium can be also explained since this metal affects the activities of several enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), GPx, glutathione reductase (GR) and GST (Ognjanović *et al.*, 2010). In our experiment, cadmium was responsible for the alteration of enzymes GST and GPx. The GST enzyme has an important role in detoxification of xenobiotics, drugs and carcinogens (Chasseaud, 1979). In addition, GST has been reported to possess antioxidant activity (Casalino *et al.*, 2004) and, therefore, its inhibition can contribute to oxidative stress. In contrast, we observed an increase in GPx activity in mice exposed to cadmium. GPx is an important enzyme which is responsible for metabolizing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Acharya *et al.*, 2008). The possible explanation for this increase can be related with a compensatory mechanism, in response to oxidative damage induced by cadmium. The oxime tested was unable to reverse the alteration in both enzymes, suggesting that, on this exposure protocol used, the restorative role of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime did not involve the enzymes GST and GPx.

Puntel *et al.* (2009) demonstrated a possible *in vitro* chelating of metal action of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime, by interact with iron (Fe<sup>+2</sup>). In fact, this oxime compound shows as electron-donor centers the atoms N, O and S, which lead to many different possibilities of reactions and bindings (Bermejo *et al.*, 2004); and the thiosemicarbazone portion of molecule has the characteristic of being a very versatile ligand, they can coordinate to metals, but its biological activity seems to depend on the substituent associated (Casas *et al.*, 2000). However, our results show that there is no reduction in the concentration of cadmium in the testicular tissue with the administration of the oxime. Still, we cannot exclude the possibility of chelate formation between cadmium and this molecule of oxime, and more studies should be performed for this purpose.

It is assumed that, in addition to therapeutic intervention by using chelating agents capable to mobilize cadmium in organism (Eybl *et al.*, 1984; Jones and Chierian, 1990), antioxidants (Eybl *et al.*, 2006) and anti-inflammatory (Zhang *et al.*, 2010) agents can be important components of an effective treatment against cadmium intoxication. Thus, we conclude that the butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime may represent a new tool against cadmium poisoning, since this molecule present antioxidant and anti-inflammatory effects in mice exposed to cadmium. However, these studies are preliminary and more research should be encouraged in order to expand

the information about this new molecule.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPERGS (processo nº 10/0682-0), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FINEP (Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)) # 01.06.0842-00 and INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection - MCT/CNPq. F.A.A. S. are recipient of CNPq fellowship. The authors thank to Fabiano Kauer/Shimadzu for the support in the ICPE analysis.

### REFERENCES

- Acharya, U.R., Mishra, M., Patro, J. and Panda, M.K. (2008): Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod. Toxicol.*, **25**, 84-88.
- Aposhian, H.V., Maiorino, R.M., Gonzalez-Ramirez, D., Zuniga-Charles, M., Xu, Z.F., Hurlbut, K.M., Junco-Munoz, P., Dart, R.C. and Aposhian, M.M. (1995): Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. *Toxicology*, **97**, 23-38.
- Barbosa, N.B., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C. and Braga, A.L. (1998): Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **149**, 243-253.
- Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Acosta, C.A., Abdalla, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.A.M. and Di Mascio, P. (1993): A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Química Nova*, **16**, 385-392.
- Bermejo, E., Castiñeiras, A., García-Santos, J. and West D.X. (2004): Structural and coordinative variability in zinc(II), cadmium(II), and mercury(II) complexes of 2-pyridineformamide 3-hexamethylenimineylthiosemicarbazone. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **630**, 1096-1109.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brandão, R., Santos, F.W., Oliveira, R., Roman, S.S. and Nogueira, C.W. (2009): Involvement of non-enzymatic antioxidant defenses in the protective effect of diphenyl diselenide on testicular damage induced by cadmium in mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **23**, 324-333.
- Bridges, C.C. and Zalups, R.K. (2005): Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **204**, 274-308.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G. and Landriscina, C. (2004): Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicology*, **200**, 29-38.
- Casas, J.S., Garcia-Tasende, M.S. and Sordo, J. (2000): Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coord. Chem. Rev.*, **209**, 197-261.
- Chasseaud, L.F. (1979): The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.*, **29**, 175-274.
- Clegg, E.J. and Carr, I. (1967): Changes in the blood vessels of the rat testis and epididymis produced by cadmium chloride. *J. Pathol. Bacteriol.*, **94**, 317-322.
- Cunha, T.M., Verri Jr., W.A., Schivo, I.R., Napimoga, M.H., Parada, C.A., Poole, S., Teixeira, M.M., Ferreira, S.H. and Cunha, F.Q. (2008): Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J. Leukoc. Biol.*, **83**, 824-832.
- Dan, G., Lall, S.B. and Rao, D.N. (2000): Humoral and cell mediated immune response to cadmium in mice. *Drug Chem. Toxicol.*, **23**, 349-360.
- Dickins, R.A., Frew, I.J., House, C.M., O'Bryan, M.K., Holloway, A.J., Haviv, I., Traficante, N., de Kretser, D.M. and Bowtell, D.D. (2002): The ubiquitin ligase component *siahl1* is required for completion of meiosis I in male mice. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 2294-2303.
- Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. and Di Mascio, P. (1998): Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. *FEBS Lett.*, **428**, 93-96.
- Duffield, J.S. (2003): The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin. Sci.*, **104**, 27-38.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S. and Bahadadi, H.H. (2004): Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 1563-1571.
- Ellman, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- Eybl, V., Kotyzova, D., Koutensky, J. (2006): Comparative study of natural antioxidants – curcumin, resveratrol and melatonin in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology*, **225**, 150-156.
- Eybl, V., Sykora, J., Koutensky, J., Caisova, D., Schwartz, A. and Mertl, F. (1984): Interaction of chelating agents with cadmium in mice and rats. *Environ. Health Perspect.*, **54**, 267-273.
- Fowler, B.A. (2009): Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **238**, 294-300.
- Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E. and van Rooijen, N. (1995): Response to Leydig cell apoptosis in the absence of testicular macrophages. *J. Reprod. Immunol.*, **29**, 81-94.
- Gibson, K.D., Neuberger, A. and Scott, J.J. (1955): The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.*, **61**, 618-628.
- Griffith, O.W. (1999): Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 922-935.
- Gunn, S.A. and Gould, T.C. (1970): Specificity of the vascular system of the male reproductive tract. *J. Reprod. Fertil.*, **10**, Suppl., 75-95.
- Gunnarsson, D., Nordberg, G. and Selstam, G. (2007): Differential effects of cadmium on the gene expression of seven-transmembrane-spanning receptors and GAPDH in the rat testis. *Toxicol. Lett.*, **168**, 51-57.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974): Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- Harstad, E.B. and Klaassen, C.D. (2002): Gadolinium chloride



## Effects of a new oxime on testicular damage induced by cadmium

- pretreatment prevents cadmium chloride-induced liver damage in both wild-type and MT-null mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **180**, 178-185.
- Hassoun, E.A. and Stohs, S.J. (1996): Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J77A.1 cell cultures. *Toxicology*, **112**, 219-226.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M. and Rocha, J.B.T. (2001): Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.*, **88**, 119-125.
- Jones, M.M. and Cherian, M.G. (1990): The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. *Toxicology*, **62**, 1-25.
- Kataranovski, M., Kataranovski, D., Savic, D., Jovcic, G., Bogdanovic, Z. and Jovanovic, T. (1998): Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats. *Physiol. Res.*, **47**, 453-461.
- Kayama, F., Yoshida, T., Elwell, M.R. and Luster, M.I. (1995a): Cadmium-induced renal damage and pro inflammatory cytokines: Possible role of IL-6 in tubular epithelial cell regeneration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134**, 26-34.
- Kayama, F., Yoshida, T., Elwell, M.R. and Luster, M.I. (1995b): Role of tumor necrosis factor-alpha in cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **131**, 224-234.
- Kim, M.S., Kim, B.J., Woo, H.N., Kim, K.W., Kim, K.B., Kim, I.K. and Jung, Y.K. (2000): Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2. *Toxicology*, **145**, 27-37.
- Kondoh, M., Araragi, S., Sato, K., Higashimoto, M., Takiguchi, M. and Sato, M. (2002): Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology*, **170**, 111-117.
- Kuester, R.K., Waalkes, M.P., Goering, P.L., Fisher, B.L., McCuskey, R.S. and Sipes, I.G. (2002): Differential hepatotoxicity induced by cadmium in Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, **65**, 151-159.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Romero, A., Cano, P. and Esquifino, A.I. (2004): Cadmium exposure differentially modifies the circadian patterns of norepinephrine at the median eminence and plasma LH, FSH and testosterone levels. *Toxicol. Lett.*, **146**, 175-182.
- Laskey, J.W. and Phelps, P.V. (1991): Effect of cadmium and other metal cations on *in vitro* Leydig cell testosterone production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 296-306.
- Luchese, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. and Santos, F.W. (2007): Cadmium inhibits  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase from rat lung *in vitro*: Interaction with chelating and antioxidant agents. *Chem. Biol. Interact.*, **165**, 127-137.
- Mason, K.E., Brown, J.A., Young, J.O. and Nesbit, R.R. (1964): Cadmium-induced injury of the rat testis. *Anat. Rec.*, **149**, 135-147.
- Mullane, K.M., Kraemer, R. and Smith, B. (1985): Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Methods*, **14**, 157-167.
- Muller, L. (1986): Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology*, **40**, 285-295.
- Morales, A.I., Vicente-Sanchez, C., Jerkic, M., Santiago, J.M., Sanchez-Gonzalez, P.D., Perez-Barriocanal, F. and Lopez-Novoa, J.M. (2006): Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **210**, 128-135.
- Ognjanović, B.I., Marković, S.D., Đorđević, N.Z., Trbojević, I.S., Štajn, A.Š. and Saičić, Z.S. (2010): Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q<sub>10</sub> and Vitamin E. *Reprod. Toxicol.*, **29**, 191-197.
- Ognjanovic, B.I., Pavlovic, S.Z., Maletic, S.D., Zikic, R.V., Stajn, A.S., Radojicic, R.M., Saicic, Z.S. and Petrovic, V.M. (2003): Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiol. Res.*, **52**, 563-570.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- Oteiza, P.I., Adonaylo, V.N. and Keen, C.L. (1999): Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. *Toxicology*, **137**, 13-22.
- Puntel, G.O., de Carvalho, N.R., Gubert, P., Palma, A.S., Dalla Corte, C.L., Ávila, D.S., Pereira, M.E., Carratu, V.S., Bresolin, L., Rocha, J.B.T. and Soares, F.A.A. (2009): Butane-2,3-dione-thiosemicarbazone: An oxime with antioxidant properties. *Chem. Biol. Interact.*, **177**, 153-160.
- Rana, S.V. and Verma, S. (1996): Protective effects of GSH, vitamin E and selenium on lipid peroxidation in cadmium fed rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, **51**, 161-168.
- Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Emanuelli, T., Christofari, R.S. and Souza, D.O. (1995): Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology*, **100**, 27-37.
- Rooney, J.P.K. (2007): The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*, **234**, 145-156.
- Santos, F.W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J.B.T., do Nascimento, P.C. and Nogueira, C.W. (2004): Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol. Lett.*, **152**, 255-263.
- Santos, F.W., Rocha, J.B.T. and Nogueira, C.W. (2006): 2,3-Dimercaptopropanol, 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase lead-induced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase *in vitro* and *ex vivo*. *Toxicol. In vitro*, **20**, 317-323.
- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nascimento, P.C., Marques, M.S. and Nogueira, C.W. (2005): Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 1723-1730.
- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Weis, S.N., Fachineto, J.M., Favero, A.M. and Nogueira, C.W. (2005): Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem. Biol. Interact.*, **151**, 159-165.
- Sassa, S. (1982): Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*, **28**, 133-145.
- Satarug, S. and Moore, M.R. (2004): Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1099-1103.
- Setchell, B.P. and Waites G.M.H. (1970): Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the "blood-testis" after injection of cadmium chloride in the rat. *J. Endocrinol.*, **47**, 81-86.
- Sharma, R.K. and Agarwal, A., (1996): Role of reactive oxygen spe-

- cies in male infertility. *Urology*, **48**, 835-850.
- Siu, E.R., Mruk, D.D., Porto, C.S. and Cheng, C.Y. (2009): Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **238**, 240-249.
- Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free. Radic. Biol. Med.*, **18**, 321-336.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E. and Bagchi, M. (2000): Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **19**, 201-213.
- Swiergosz-Kowalewska, R. (2001): Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc. Res. Tech.*, **55**, 208-222.
- Tandon, S.K., Singh, S., Prasad, S., Khandekar, K., Dwivedi, V.K., Chatterjee, M. and Mathur, N. (2003): Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol. Lett.*, **145**, 211-217.
- Tang, W. and Shaikh, Z.A. (2001): Renal cortical mitochondrial dysfunction upon cadmium metallothionein administration to Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **63**, 221-235.
- Thompson, J. and Bannigan, J. (2008): Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol.*, **25**, 304-315.
- Thompson, J.M., Hipwell, E., Loo, H.V. and Bannigan, J.G. (2005): Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos. *Reprod. Toxicol.*, **20**, 539-548.
- Wendel, A. (1981): Glutathione peroxidase. *Method. Enzymol.*, **77**, 325-333.
- Wiig, H., Rubin, K. and Reed, R.K. (2003): New and active role of the interstitium in control of interstitial fluid pressure: potential therapeutic consequences. *Acta. Anaesthesiol Scand.*, **47**, 111-121.
- Worek, F., Thiermann, H., Szynicz, L. and Eyer, P. (2004): Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 2237-2248.
- World Health Organization, 2000. Cadmium. Air quality guide lines. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Xu, L.C., Wang, S.Y., Yang, X.F. and Wang, X.R. (2001): Effects of cadmium on rat sperm motility evaluated with computer assisted sperm analysis. *Biomed. Environ. Sci.*, **14**, 312-317.
- Yang, H.S., Han, D.K., Kim, J.R. and Sin, J.C. (2006): Effect of  $\alpha$ -tocopherol on cadmium induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. *J. Korean Med. Sci.*, **21**, 445-451.
- Yang, P.M., Chiu, S.J., Lin, K.A. and Lin, L.Y. (2004): Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells. *Chem. Biol. Interact.*, **149**, 125-136.
- Yu, B.P. (1994): Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, **74**, 139-162.
- Zhang, W., Fievez, L., Cheu, E., Bureau, F., Rong, W., Zhang, F., Zhang, Y., Advenier, C. and Gustin, P. (2010): Anti-inflammatory effects of formoterol and ipratropium bromide against acute cadmium-induced pulmonary inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **628**, 171-178.
- Zhou, T., Zhou, G., Song, W., Eguchi, N., Lu, W. and Lundin, E. (1999): Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of *p53*, *c-jun* and *MT-1* genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicology*, **142**, 1-13.

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que a oxima butano-2,3-dionatiossemicarbazona apresenta ação protetora contra os danos causados pelo cádmio nos testículos dos camundongos, uma vez que houve um aumento da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D, nos níveis de NPSH e testosterona, além de redução nos níveis de TBARS e uma melhora nos parâmetros histológicos; juntamente, aos efeitos antiinflamatórios, visto uma diminuição da atividade da MPO e dos níveis de IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  e INF $\gamma$ , além do aumento nos níveis de IL-10. Desta forma podemos usar esses resultados para a proposta de novas terapias nos casos de intoxicação pelo cádmio.

## 6 PERSPECTIVAS

Mais estudos devem ser considerados a fim de melhor elucidar o efeito da oxima frente ao dano testicular induzido por cádmio e seus mecanismos de ação. Sendo assim, as perspectivas para trabalhos posteriores podem partir dos seguintes itens:

- Contagem, análise morfológica e motilidade de espermatozóides;
- Concentração de cádmio excretado na urina;
- Atividade e quantificação da enzima  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase ( $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD);
- Atividade e quantificação da enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD);
- Análise do envolvimento da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase;
- Avaliação da função mitocondrial;
- Avaliação da via de sinalização MAPK.

## REFERÊNCIAS

ACHARYA, U. R.; MISHRA, M.; PATRO, J.; PANDA, M. K. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. **Reprod. Toxicol.**, v. 25, p. 84–88, 2008.

ÅKESSON, A.; BERGLUND, M.; SCHÜTZ, A.; BJELLERUP, P.; BREMME, K.; VAHTER, M. Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. **Am. J. Public. Health**, v. 92, p. 284–287, 2002.

ALLOWAY, B. J.; AYRES, D. C. Chemical principles of environmental pollution. **London: Blackie Academic & Professional**, p. 291, 1993.

ALSBERG, C. L.; SCHWARTZE, E. W. Pharmacological action of cadmium. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 13, p. 504–505, 1919.

AMERICAN SOCIETY FOR METALS HANDBOOK (ASM Handbook). Metals Handbook. **Properties and Selection: Nonferrous Alloys and Pure Metals**. 9th Ed. ASM International, Ohio, USA, 1979.

ANDERSEN, O. Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2683–2710, 1999.

ANDERSEN, O.; NIELSEN, J. B.; NORDBERG, G. F. Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake - Possibilities for risk reduction. **Biometals**, v. 17, p. 543–547, 2004.

ANDUJAR, P.; BENSEFA-COLAS, L.; DESCATHA, A. Intoxication aiguë et chronique au cadmium. **Rev. Med. Interne**, v. 31, p. 107–115, 2010.

ARORA, M.; WEUVE, J.; SCHWARTZ, J.; WRIGHT, R. O. Association of environmental cadmium exposure with pediatric dental caries. **Environ. Health Perspect.**, v. 116, p. 821–825, 2008.

BABA, H.; TSUNNEYAMA, K.; KUMADA, T.; AOSHIMA, K.; IMURA, J. Histopathological analysis for osteomalacia and tubulopathy in *itai-itai* disease. **J. Toxicol. Sci.**, v. 39, p. 91–96, 2014.

BELYAEVA, E. A.; DYMKOWSKA, D.; WIECKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 231, p. 34–42, 2008.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 4, p. 31–39, 2004.

BERGLUND, M.; ÅKESSON, A.; NERMELL, B.; VAHTER, M. Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, p. 1058–1066, 1994.

BERTINI, I., SIGEL, A., SIGEL, H. **Handbook on metalloproteins**. Dekker, New York. 2001.

BERTINI, I.; CAVALLARO, G. Metals in the “omics” world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 13, p. 3–14, 2008.

BHADAURIA, S.; FLORA, S. J. S. Response of arsenic induced oxidative stress, DNA damage and metal imbalance to combined administration of DMSA and monoisoamyl DMSA during chronic arsenic poisoning in rats. **Cell. Biol. Toxicol.**, v. 23, p. 91–104, 2007.

BONNELL, J. A. Emphysema and proteinuria in men casting copper-cadmium alloys. **Br. J. Ind. Med.**, v. 12, p. 181–197, 1955.

BRANDÃO, R.; DE OLIVEIRA, R.; NOGUEIRA, G. W. Association between diphenyl diselenide and cadmium chloride attenuates the toxicity of both in tissues of mice in vitro. **Toxicol. In Vitro**, v. 24, p. 1736–1742, 2010.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 45, p. 198–207, 2000.

BULMER, F. M. R.; ROTHWELL, H. E.; FRANKISH, E. R. Industrial cadmium poisoning. **Can. Public. Health J.**, v. 29, p. 19–26, 1938.

CARREAU, S.; HESS, R. A. Oestrogens and spermatogenesis. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.** v. 365, p. 1517–1535, 2010.

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

CHASSEAUD, L. F. The role of glutathione and glutathione-S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. **Adv. Cancer Res.**, v. 29, p. 175–274, 1979.

CHIMENTO, A.; SIRIANNI, R.; CASABURI, I.; PEZZI, V. Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis. **Front. Endocrinol.**, article in press, 2014.

CHUNG, N. P.; CHENG, C. Y. Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? **Endocrinology**, v. 142, p. 1878–1888, 2001.

CUNHA, T. M., VERRI JR., W. A.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, p. 824–832, 2008.

DAN, G.; LALL, S. B.; RAO, D. N. Humoral and cell mediated immune response to cadmium in mice. **Drug Chem. Toxicol.**, v. 23, p. 349–36, 2000.

DAVID R, L. **Handbook of chemistry and physics**. 64th. Ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 2009.

DECONTI, R. C.; TOFTNESS, B. R.; AGRAWAL, K. C.; TOMCHICK, R.; MEAD, J. A. R.; BERTINO, J. R.; SARTORELLI, A. C.; CREASEY, W. A. Clinical and pharmacological studies with 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone. **Cancer Res.**, v. 32, p. 1455-1462, 1972.

DO PICO, G. A. Toxic gas inhalation. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 1, p. 102–108, 1995.

DORTA, D. J.; LEITE, S.; DEMARCO, K. C.; PRADO, I.M.; RODRIGUES, T.; MINGATTO, F. E.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. A proposed sequence of events for cadmium induced mitochondrial impairment. **J. Inorg. Biochem.**, v. 97, p. 251–257, 2003.

ELINDER, C. G.; LIND, B.; KJELLSTRÖM, T.; LINNMAN, L.; FRIBERG, L. Cadmium in kidney cortex, liver, and pancreas from Swedish autopsies. Estimation of biological half time in kidney cortex, considering calorie intake and smoking habits. **Arch. Environ. Health**, v. 31, p. 292–302, 1976.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; PORCIUNCULA, L. O.; MORSCH, V. M.; MARTINS, A. F.; SOUZA, D. O. G. Effect of Mercury chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 79, p. 136–143, 1996.

EYLES, J. L.; ROBERTS, A. W.; METCALF, D.; WICKS, I. P. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils—forgotten mediators of inflammatory disease. **Nat. Clin. Pract. Rheumatol.**, v. 2, p. 500–510, 2006.

FERRON, M.; RANCANO, J. **Grande Atlas do corpo Humano: anatomia, histologia e patologias**. Vigú Ed. Barueti SP, 2007.

FLORA, S. J. S.; DUBEY, R.; KANNAN, G. M.; CHAUHAN, R. S.; PANT, B. P.; JAISWAL, D. K. Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and monoisoamyl DMSA effect on gallium arsenide induced pathological liver injury in rats. **Toxicol. Lett.**, v. 132, p. 9–17, 2002.

FLORA, S. J. S.; MEHTA, A.; GUPTA, R. Prevention of arsenic-induced hepatic apoptosis by concomitant administration of garlic extracts in mice. **Chem. Biol. Inter.**, v. 177, p. 227–233, 2009.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V. Chelation in Metal Intoxication. **Int. J. Environ. Res. Public. Health**, v. 7, p. 2745–2788, 2010.

FLORA, S. J. S.; PANDE, M.; MEHTA, A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. **Chem. Biol. Inter.**, v. 145, p. 267–280, 2003.

FLORA, S. J. S.; SAXENA, G. Lead induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 18, p. 221–233, 2004.

FOWLER, B. A. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 238, p. 294–300, 2009.



FRIBERG, L. Further investigations on chronic cadmium poisoning; a study on rabbits with radioactive cadmium. **A.M.A. Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.**, v. 5, p. 30–36, 1952.

FRIBERG, L. Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning; a clinical and experimental study. **Acta Med. Scand. Suppl.**, v. 240, p. 1–124, 1950.

FRIBERG, L. Proteinuria and kidney injury among workmen exposed to cadmium and nickel dust; preliminary report. **J. Ind. Hyg. Toxicol.**, v. 30, p. 32–36, 1948.

GARTNER, L. P.; HIATT. **Tratados de Histologia em cores**, 3. ed. Elsevier, 2007.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy-metal stressed plants a little easier. **Funct. Plant Biol.**, v. 32, p. 481-494, 2005.

GUNNARSSON, D.; NORDBERG, G.; SELSTAM, G. Differential effects of cadmium on the gene expression of seven-transmembrane-spanning receptors and GAPDH in the rat testis. **Toxicol. Lett.**, v. 168, p. 51-57, 2007.

HACKLEY, B. E.; STEINBERG, G. M.; LAMB, J. C. Formation of potent inhibitors of AChE by reaction of pyridinaldoximes with isopropyl methylphosphonofluoridate (GB). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 80, p. 211–214, 1959.

HAGINO, N. 1957 Dec 21. About investigations on Itai-Itai disease. **J. Toyama Med. Ass.** 7 [in Japanese].

HE, L.; WANG, B.; HAY, E. B.; NEBERT, D. W. Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 238, p. 250–257, 2009.

HOGERVORST, J.; PLUSQUIN, M.; VANGRONSVELD, J.; NAWROT, T.; CUYPERS, A.; VAN HECKE, E.; ROELS, H. A.; CARLEER, R.; STAESSEN, J.A. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. **Environ. Res.**, v. 103, p. 30–37, 2007.

HORIGUCHI, H.; OGUMA, E.; SASAKI, S.; MIYAMOTO, K.; IKEDA, Y.; MACHIDA, M.; KAYAMA, F. Comprehensive study of the effects of age, iron deficiency, diabetes mellitus, and cadmium burden on dietary cadmium absorption in cadmium-exposed female Japanese farmers. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 196, p. 114–23, 2004.

HUANG, P.; LI, T.; LI, A.; YU, X.; HU, N. Distribution, enrichment and sources of heavy metals in surface sediments of the North Yellow Sea. **Cont. Shelf Res.**, v. 73, p. 1–13, 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), **Carcinogenic Risks to Humans**; Scientific Publications: Lyon, France, 1993; v. 58, p. 119–237.

ISHIZAKI, A. On the so called *Itai-Itai* disease. **J. Jpn. Med. Soc.**, v. 62, p. 242–249, 1969.

JÄRUP, L.; ÅKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 238, p. 201–208, 2009.

KAJI, M. Role of experts and public participation in pollution control: the case of *Itai-itai* disease in Japan. **Ethics Sci. Environ. Polit.**, v. 12, p. 99–111, 2012.

KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, p. 547–583, 2005.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, p. 273–279, 2005.

KATARANOVSKI, M., KATARANOVSKI, D., SAVIC, D., JOVCIC, G., BOGDANOVIC, Z., JOVANOVIC, T. Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats. **Physiol. Res.**, v. 47, p. 453–461, 1998.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia celular**: uma introdução a Patologia, 3. ed. Elsevier, 2012. 590 p.

KUESTER, R. K., WAALKES, M. P., GOERING, P. L., FISHER, B. L., MCCUSKEY, R. S., SIPES, I. G. Differential hepatotoxicity induced by cadmium in Fischer 344 and Sprague Dawley rats. **Toxicol. Sci.**, v. 65, p. 151–159, 2002.

LAFUENTE, A.; GONZALEZ-CARRACEDO, A.; ROMERO, A.; CANO, P.; ESQUIFINO, A. I. Cadmium exposure differentially modifies the circadian patterns of norepinephrine at the median eminence and plasma LH, FSH and testosterone levels. **Toxicol. Lett.**, v. 146, p. 175–182, 2004.

LAMB, J. C.; STEINBERG, G. M.; HACKLEY, B. E. Isopropyl methylphosphonylated bisquaternary oximes, powerful inhibitors of cholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 89, p. 174–176, 1964.

LARSEN, E. H.; ANDERSEN, N. L.; MOLLER, A.; PETERSEN, A.; MORTENSEN, G. K.; PETERSEN, J. Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. **Food Addit. Contam.**, v. 19, p. 33–46, 2002.

LASKEY, J. W.; PHELPS, P. V. Effect of cadmium and other metal cations on vitro Leydig cell testosterone production. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 108, p. 296–306, 1991.

LAUWERYS, R. R.; BUCHET, J. P.; ROELS, H. A.; BROUWERS, J. STANESCU, D. Epidemiological survey of workers exposed to cadmium. **Arch. Environ. Health**, v. 28, p. 145–148, 1974.

LI, L.; HEINDEL, J. **Reproductive and Developmental Toxicology: Sertoli cell toxicants**. Ed. Korach K., New York, 1998.

LIU, J.; QU, W.; KADIISKA, M. B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 238, p. 209–214, 2009.

LLOBET, J. M.; FALCO, G.; CASAS, C.; TEIXIDO, A.; DOMINGO, J. L. Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 838–842, 2003.

LUO, C.; SAXENA, A.; SMITH, M.; GARCIA, G.; RADIC, Z.; TAYLOR, P.; DOCTOR, B. P. Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium. **Biochemistry**, v. 38, p. 9937–9947, 1999.

MCELROY, J. A.; SHAFER, M. M.; TRENTAM-DIETZ, A.; HAMPTON, J. M.; NEWCOMB, P. A. Urinary cadmium levels and tobacco smoke exposure in women age 20–69 years in the United States. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 70, p. 1779–1782, 2007.

MENG, J.; HOLDCRAFT, R. W.; SHIMA, J. E.; GISWOLD, M. D.; BRAUN, R. E. Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, p. 16696–16700, 2005.

MISHRA, D.; FLORA, S. J. S. Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic induced oxidative stress in mouse. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 122, p. 137–147, 2008.

MISHRA, D.; GUPTA, R.; PANT, S. C.; KUSHWAH, P.; SATISH, H. T.; FLORA, S. J. S. Therapeutic potential of combined administration of MiADMSA and *Moringa oleifera* seed powder on arsenic induced oxidative stress and metal distribution in mouse. **Toxicol. Mechanism. Meth.**, v. 19, p. 169–182, 2008.

MISHRA, D.; MEHTA, A.; FLORA, S. J. S. Reversal of hepatic apoptosis with combined administration of DMSA and its analogues in guinea pigs: role of glutathione and linked enzymes. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, p. 400–407, 2008.

MODI, M.; FLORA, S. J. S. Combined administration of iron and monoisoamyl DMSA in the treatment of chronic arsenic intoxication in mice. **Cell. Biol. Toxicol.**, v. 23, p. 429–443, 2007.

MULLER, L. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **Toxicology**, v. 40, p. 285–295, 1986.

MURATA, I.; HIRONO, T.; SAEKI, Y.; NAKAGAWA, S. Cadmium enteropathy, renal osteomalacia (“Itai Itai” disease in Japan). **Bull. Soc. Int. Chir.**, v.1, p. 34–41, 1970.

NICAUD, P.; LAFITTE, A.; GROS, A. Symptoms of chronic cadmium intoxication. **Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur. Soc.**, v. 4, p. 192–202, 1942.

NORDBERG, G. F. Chelating agents and cadmium toxicity – problems and prospects. **Environ. Health Perspect.**, v. 54, p. 213–218, 1984.

NORDBERG, G. F.; NORDBERG, M. Different binding forms of cadmium – implications for distribution and toxicity. **J UOEH**, v. 9, p. 153–64, 1987.

OLSSON, I. M.; BENSRYD, I.; LUNDH, T.; OTTOSSON, H.; SKERFVING, S.; OSKARSSON, A. Cadmium in blood and urine–impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking–association of renal effects. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, p. 1185–1190, 2002.

OTUBANJO, O. A.; MOSURO, A. A. An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology by some anthelmintic drugs in mice. **Mutation Research**, v. 497, p. 131–138, 2001.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia**, Elsevier, 2008.

PEDRIDO, R.; GONZÁLEZ-NOYA, A. M.; ROMERO, R. J.; MARTÍNEZ-CALVO, M.; VÁZQUEZ, M. L.; GÓMEZ-FÓRNEAS, E.; ZARAGOZA, G.; BERMEJO, M. R. Pentadentate thiosemicarbazones as versatile chelating systems. A comparative structural study of their metallic complexes. **Dalton Trans.**, v. 47, p. 6776–6787, 2008.

PRATHIMA, B.; SUBBA, R. Y.; ADINARAYANA, R. S.; REDDY, Y. P.; VARADA, R. A. Copper(II) and nickel(II) complexes of benzyloxybenzaldehyde-4-phenyl-3-thiosemicarbazone: Synthesis, characterization and biological activity. **Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 77, p. 248–252, 2010.

PUNTEL, G. O.; CARVALHO, N. R.; GUBERT, P.; PALMA, A. S.; CORTE, C. L. D.; ÁVILA, D. S.; PEREIRA, M. E.; CARRATU, V. S.; BRESOLIN, L.; ROCHA, J. B. T.; SOARES, F. A. A. Butane-2,3-diothiosemicarbazone: An oxime with antioxidant properties. **Chem. Biol. Interact.**, v. 177, p. 153–160, 2009.

PUNTEL, G. O.; GUBERT, P.; PERES, G. L.; BRESOLIN, L.; ROCHA, J. B.; PEREIRA, M. E.; CARRATU, V. S.; SOARES, F. A. Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one. **Arch. Toxicol.**, v. 82, p. 755-762, 2008.

QUIG, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. **Altern. Med. Rev.**, v. 3, p. 262–270, 1998.

SCHWARTZ, D. A. Acute inhalational injury. **Occup. Med.**, v. 2, p. 297–318, 1987.

SCHWARTZ, D. A.; BLASKI C. A. Toxic inhalations. In: Fisherman's pulmonary diseases and disorders. New York: McGraw-Hill, 1998. 925–940 p.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction*; Ed. Raven Press; Knobil, E. and Neil, J.D; 1994. 1363–1434 p.

SILVA, A. P.; FARINA, M.; FRANCO, J. L.; DAFRE, A. L.; KASSA, J.; KUCA, K. Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 184–189, 2008.

SIU, E. R.; MRUK, D. D.; PORTO, C. S.; CHENG, C. Y. Cadmium-induced testicular injury. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 238, p. 240–249, 2009.

SOVET. Poisoning caused by powder used in the cleaning of Silver. **Presse. Med.**, v. 9, p. 69–70, 1858.

STEPHENS, G. A. Cadmium poisoning. **J. Ind. Hyg.**, v. 2, p. 129, 1920.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; STACHURA, A.; SLOTWINSKA, M.; KAMINSKA, T.; SNEIZKO, R.; PADUCH, R.; ABRAMCZYK, D.; FILAR, J.; KANDEFER-SZERSZEN, M. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. **Toxicology**, v. 145, p. 159–171, 2000.

TAM, P. P. L.; LIU, W. K. Gonadal development and fertility of mice treated prenatally with cadmium during the early organogenesis stages. **Teratology**, v. 32, p. 453–62, 1985.

TANDON, S. K.; SINGH, S.; PRASAD, S.; KHANDEKAR, K.; DWIVEDI, V. K.; CHATTERJEE, M.; MATHUR, N. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. **Toxicol. Lett.**, v. 145, p. 211–217, 2003.

THE MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 10. ed. Rahway, N. J., U.S.A: Publ. Merck & Co., Inc., p. 223–224, 1983.

THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reprod. Toxicol.**, v. 25, p. 304–315, 2008.

UNITED STATES PUBLIC HEALTH SERVICE (PHS), Public health report, cadmium poisoning. Div. Ind. Hyg. **Natl. Inst. Health**, v. 57, p. 601–612, 1942.

VAHTER, M.; ÅKESSON, A.; LIDÉN, C.; CECCATELLI, C.; BERGLUND, M. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. **Environ. Res.**, v. 104, p. 85–95, 2007.

VAHTER, M.; BERGLUND, M.; SLORACH, S.; FRIBERG, L.; SARIĆ, M.; ZHENG, X. Q.; FUJITA, M. Methods for integrated exposure monitoring of lead and cadmium. **Environ. Res.**, v. 56, p. 78–89, 1991.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metal, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 1161–1208, 2005.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis in review. **J. Inorg. Biochem.**, v. 79, p. 241–244, 2000.

WAISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, B.; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, v. 192, p. 95–117, 2003.

WAN, H.; MRUK, D. D.; WONG, C. K. C.; CHENG, C. Y. The apical ES-BTB-BM functional axis is an emerging target for toxicant-induced infertility. **Trends Mol. Med.**, v. 19, p. 396–405, 2013.

WANG, R.; YEH, S.; CHEN, L.; LIN, H.; ZHANG, C.; NI, J.; WU, C.; DI SANT'AGNESE, P. A.; DEMESY-BENTLEY, M. L.; TZENG, C.; CHANG, C. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. **Endocrinology**, v. 147, p. 5624–5633, 2006.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Method. Enzymol.**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WESTER, R. C.; MAIBACH, H. I.; SEDIK, L.; MELENDRES, J.; DIZIO, S.; WADE M. In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 19, p. 1–5. 1992.

WILLERS, S.; GERHARDSSON, L.; LUNDH, T. Environmental tobacco smoke (ETS) exposure in children with asthma — relation between lead and cadmium, and cotinine concentrations in urine. **Respir. Med.**, v. 99, p. 1521–1527, 2005.

WONG, E. W.; CHENG, C. Y. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 32, p. 290–299, 2011.

WOREK, F.; THIERMANN, H. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. **Pharmacol. Ther.**, article in press, 2013.

WOREK, F.; THIERMANN, H.; SZINICZ, L.; EYER, P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 2237–2248, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Cadmium in Drinking-water**, WHO. 2010.

YSART, G.; MILLER, P.; CROASDALE, M.; CREWS, H.; ROBB, P.; BAXTER, M.; DE L'ARGY, C.; HARRISON, N. 1997 UK Total Diet Study — dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc. **Food Addit. Contam.**, v. 17, p. 775–786, 2007.

YU, Y.; KALINOWSKI, D. S.; KOVACEVIC, Z.; SIAFAKAS, A. R.; JANSSON, P. J.; STEFANI, C.; LOVEJOY, D. B.; SHARPE, P. C.; BERNHARDT, P. V.; RICHARDSON, D. R. Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 5271–5294, 2009.