

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO CÁDMIO E DO SELENO-FURANOSÍDEO
SOBRE A ATIVIDADE DA δ -AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE DE OVÁRIO *IN VITRO* E *EX VIVO*.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Laura Musacchio Vargas

**Uruguaiana, RS, Brasil.
2014**

LAURA MUSACCHIO VARGAS

**EFEITO DO CÁDMIO E DO SELENO- FURANOSÍDEO SOBRE A
ATIVIDADE DA δ - AMINOLEVULINATO DESIDRATASE DE
OVÁRIO *IN VITRO E EX VIVO*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Daniela dos Santos Brum

Co- Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Francielli Weber Santos Cibirin

**Uruguaiana
2014**

LAURA MUSACCHIO VARGAS

**EFEITO DO CÁDMIO E DO SELENO- FURANOSÍDEO SOBRE A
ATIVIDADE DA δ - AMINOLEVULINATO DESIDRATASE DE
OVÁRIO *IN VITRO* E *EX VIVO*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Dissertação defendida e aprovada em: 22/02/014
Banca examinadora:

Prof^ª Dr^ª Daniela dos Santos Brum
Orientadora
(UNIPAMPA)

Prof. Dr^ª Vanusa Manfredini

Prof. Dr^ª Mirela Noro

Dedico esta dissertação aos meus pais, Carmen e João, e meus irmãos, André e Bruna, fontes inesgotáveis de incentivo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais por sempre acreditarem em mim e me ajudarem a tornar esse sonho em realidade. Essa vitória é nossa, eu amo muito vocês!!

O meu muito obrigada aos meus irmãos, André e Bruna, cada qual à sua maneira me ajudou e me incentivou a nunca desistir, acreditando em mim mesmo quando nem eu mesma acreditava. Nossa amizade e cumplicidade forem essenciais à esta conquista.

Agradecer à minha querida amiga/ orientadora /co-orientadora Fran. Difícil escrever em palavras o carinho, dedicação e respeito que tenho por ti. Quem dera um dia eu tenha tua paciência e a tua generosidade. Obrigada por estar comigo em todos os momentos, mesmo os mais difíceis, sem tua presença e tua compreensão, eu não teria ido tão longe. Pessoas como tu não se encontram todo dia, e agradeço sempre a Deus por ter colocado uma mestra como tu no meu caminho, tu é minha inspiração!

O meu muito obrigada a Prof^a Dani, pela chance dada, por ter acreditado em mim, com certeza minha vida acadêmica jamais será a mesma depois das experiências que tive cursando a pós em Ciência Animal. Obrigada por me proporcionar algo tão diferente e engrandecedor.

Um agradecimento especial aos meus amados amigos de longa data, Meg, Arymel e Cristcho. Obrigada por cada explicação, por cada voto de confiança, por cada abraço, por cada risada. Vocês foram fora de série, sempre comigo, sempre no meu coração. " Amigo, você é o mais certo das horas incertas".

Aos meus pichuricos Flávio, Ane, Amanda, Natasha, Poty, vocês fizeram do meu dia-a-dia mais alegre, é muito bom conviver com vocês. Vocês foram essenciais nesta reta final, obrigada!

Aos pequenos Duda, Lanes, Maiquel, Leandra e Ísis, obrigada pela amizade sempre oferecida, pela convivência e pelas brincadeiras.

Aos queridos amigos Suzi, Léo, Simone e Marcelo, com as suas conversas e suas risadas eu descobri amigos para uma vida toda. Obrigada pelas palavras de apoio e a amizade sempre oferecida, vocês foram demais, eu adoro vocês!

Por fim, quero agradecer ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal pela oportunidade da realização deste sonho.

MUITO OBRIGADA!!!

"Quem ri por último, perdeu todo o tempo que passou sem rir."

(Eno Teodoro Wanke)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal
Fundação Universidade Federal do Pampa

EFEITO DO CÁDMIO E DO SELENO-FURANOSÍDEO SOBRE A ATIVIDADE DA δ - AMINOLEVULINATO DESIDRATASE DE OVÁRIO *IN VITRO* E *EX VIVO*.

AUTOR: Laura Musacchio Vargas

ORIENTADOR: Daniela dos Santos Brum

Data e local da defesa: Uruguiana, 22 de Fevereiro de 2014.

A δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) é uma metaloenzima que requer íons zinco para sua atividade catalítica máxima. Devido a sua natureza sulfidrílica, a δ -ALA-D é extremamente sensível à presença de agentes oxidantes, sendo inibida por metais pesados que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, como o Cádmio (Cd). O Cd é um metal pesado e um elemento não essencial utilizado industrialmente. É um dos poluentes mais tóxicos distribuídos no meio ambiente, uma vez que atividades antropogênicas fizeram com que sua concentração aumentasse na atmosfera e se tornasse um contaminante de alimentos e água. Uma importante fonte de Cd nos seres humanos é através da inalação da fumaça de cigarro, pois já que possui uma alta biodisponibilidade, é facilmente depositado em vários tecidos, especialmente o trato reprodutivo. Embora este metal possa causar graves danos aos embriões e aos órgãos reprodutivos, os mecanismos precisos referentes à sua toxicidade permanecem incertos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do cádmio e do seleno-furanosídeo sobre a atividade da enzima δ -ALA-D de ovário, *in vitro* e *ex vivo*. Observou-se que baixas concentrações de Cd inibiram a atividade da enzima δ -ALA-D em ovário de vaca *in vitro*, e o valor da IC₅₀ obtido foi de 19,17 μ M. O Seleno- furanosídeo (10, 50, 100, 200, 400 e 1000 μ M) não foi capaz de reverter a toxicidade do Cd no tecido ovariano bovino *in vitro*. Foi demonstrado também o possível mecanismo pelo qual o Cd inibe a atividade da enzima δ -ALA-D, utilizando o ditiotreitól (DTT) e o Cloreto de Zinco (ZnCl₂), onde foi demonstrado que o DTT (3mM) protegeu a inibição da atividade da enzima causada pelo Cd, enquanto o ZnCl₂ (100 μ M) não protegeu o efeito inibitório do metal, sugerindo que a inibição da atividade da enzima estaria relacionado a oxidação dos grupos tiólicos. No estudo *ex vivo* utilizando camundongos Swiss (fêmeas adultas), a exposição aguda ao Cd (2,5 e 5 mg/kg intraperitoneal) provocou uma inibição significativa da atividade da δ -ALA-D de ovário (cerca de 27% e 34%, respectivamente). A terapia com o seleno- furanosídeo *ex vivo* (100 μ mol/kg) foi capaz de restaurar a atividade enzimática. Assim, foi demonstrado pela primeira vez que a atividade da enzima δ -ALA-D ovariana é inibida pelo Cd tanto *in vitro* como *ex vivo*. Além disso, a terapia com o seleno-furanosídeo foi eficaz em restaurar a atividade da enzima inibida pela exposição ao Cd em ovário de camundongas, mas não foi eficaz em reverter o efeito do metal *in vitro*. Neste estudo, foi encontrado um novo marcador de toxicidade de Cd no tecido ovariano, bem como o efeito benéfico de um novo composto para tratar o efeito do metal após a exposição aguda do Cd.

Palavras- chave: Cádmio, ovário, δ -ALA-D, seleno- furanosídeo, camundongo

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Animal Science
Federal University of Pampa

EFFECT OF CADMIUM AND SELENO-FURANOSIDE ON THE δ -AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE ACTIVITY *IN VITRO* AND *EX VIVO*.

AUTHOR: Laura Musacchio Vargas

ADVISOR: Daniela dos Santos Brum

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, February 22nd, 2014.

δ -aminolevulinatase (δ -ALA-D) is a metalloenzyme that requires zinc ions for maximum catalytic activity. Due to its sulphidric nature, δ -ALA-D is very sensitive to the presence of oxidizing agents being inhibited by heavy metals that have a high affinity for sulfhydryl groups such as cadmium (Cd). Cd is a heavy metal and a non-essential element used industrially. It is one of the most toxic pollutants distributed in the environment, since anthropogenic activities have increased its concentration in the atmosphere and become a contaminant of food and water. An important source of Cd in humans is through inhalation of cigarette smoke, because since it has a high bioavailability, is easily deposited in various tissues, especially the reproductive tract. Although this metal can cause serious damage to embryos and reproductive organs, the precise mechanisms relating to its toxicity remain uncertain. The objective of this work was to evaluate the effect of cadmium and seleno-furanoside on the activity of the enzyme δ -ALA-D ovary, *in vitro* and *ex vivo*. We observed that low concentrations of Cd inhibited cow ovary δ -ALA-D activity *in vitro* and the IC₅₀ value obtained was 19.17 μ M. The Seleno-furanoside (10, 50, 100, 200, 400 and 1000 μ M) did not reverse the Cd toxicity in bovine ovarian tissue *in vitro*. It was also shown possible mechanism by which Cd inhibits the enzyme activity of δ -ALA-D using dithiothreitol (DTT) and Zinc Chloride (ZnCl₂), where it was shown that DTT (3 mM) protected against enzyme activity inhibited by Cd while the ZnCl₂ (100 μ M) did not protect the inhibitory effect of the metal, suggesting that the inhibition of enzyme activity is related to the oxidation of thiol groups. In the *ex vivo* study using Swiss (adult females), acute exposure to Cd (2.5 and 5 mg / kg intraperitoneally) caused a significant inhibition of δ -ALA-D ovarian (about 27% and 34% activity, respectively). Therapy with seleno-furanoside *ex vivo* (100 μ mol /kg) was able to restore enzyme activity. Thus, it was demonstrated for the first time that the activity of δ -ALA-D ovarian enzyme is inhibited by Cd both *in vitro* and *ex vivo*. In addition, therapy with seleno-furanoside was effective in restoring the enzyme activity inhibited by Cd exposure in mice ovary but was not effective in reversing the effect of metal *in vitro*. This study found a new marker of toxicity of Cd in ovarian tissue, as well as the beneficial effect of a new compound for treating metal effect after acute exposure of Cd

Keywords: cadmium; ovary; δ -ALA-D; seleno-furanoside; mice.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

| | |
|---|----|
| Figura 1: Possível interferência dos metais na atividade da δ -ALA-D..... | 15 |
| Figura 2: Elementos da tabela periódica..... | 16 |
| Figura 3: Estrutura Química do Seleno-Furanosídeo | 23 |

Artigo

| | |
|---|----|
| Figure 1: Structure of Seleno-Furanoside | 27 |
| Figure 2: Effect of cadmium chloride (CdCl_2) on ovary δ -ALA-D activity..... | 28 |
| Figure 3: Effect of DTT and ZnCl_2 on ovary δ -ALA-D inhibition Cd-induced..... | 28 |
| Figure 4: Effect of seleno-furanoside on ovary δ -ALA-D inhibition Cd-induced..... | 29 |
| Figure 5: Effect of seleno-furanoside on Cd-induced alterations in ovary δ -ALA-D activity in mice..... | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As - Arsênio

ATSDR - Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (do inglês, Agency for Toxic Substances and Disease Registry)

Bi - Bismuto

Cd - Cádmio

CdCl₂ - Cloreto de cádmio

DTT - Ditioneitol

ERO - Espécies reativas de oxigênio

GPx - Glutathione peroxidase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

Hg - Mercúrio

IARC - Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (do inglês, International Agency for Research on Cancer)

In - Índio

MT - Metalotioneína

O₂ - Oxigênio molecular

O₂^{•-} - Ânion superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

PBG - Porfobilinogênio

Pb - Chumbo

(PhSe)₂ - Disseleneto de Difenila

S - Enxofre

Se - Selênio

-SH - Grupo Sulfidril

Sn - Estanho

Te - Telúrio

Ti - Titânio

Zn - Zinco

ZnCl₂ - Cloreto de Zinco

δ-ALA-D-δ - Aminolevulinato desidratase

δ-ALA - Ácido Aminolevulínico

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | VII |
| ABSTRACT | VIII |
| LISTA DE FIGURAS | IX |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | X |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 δ - Aminolevulinato Desidratase (δ - ALA-D) | 14 |
| 2.2 Cádmio | 16 |
| 2.3 Cádmio e δ - Aminolevulinato Desidratase (δ - ALA-D)..... | 19 |
| 2.4. Selênio..... | 20 |
| 2.5.1 Seleno-Furanosídeo | 22 |
| 3 OBJETIVO | 24 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 24 |
| 3.2 Objetivo Específico | 24 |
| 4 ARTIGO CIENTÍFICO..... | 25 |
| 4 CONCLUSOES..... | 32 |
| 5 PERSPECTIVAS | 33 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| APÊNDICE A – Esquema representativo dos resultados..... | 40 |
| APÊNDICE B -- Artigo Científico..... | 43 |

1. INTRODUÇÃO

O Cádmio (Cd) é um metal tóxico proveniente de fontes industriais e agrícolas, com uma longa meia-vida biológica (10-30 anos) (Xiang, Wen, Wu, Jiang, He, & Liu, 2012). Sendo um metal pesado e um elemento não-essencial utilizado industrialmente, está presente normalmente em baixas concentrações no ambiente, mas atividades antropogênicas fizeram com que sua concentração aumentasse na atmosfera e se tornasse um contaminante de água, alimentos (WHO, 2010), fertilizantes e pesticidas (Zhai, Liao, Chen, Yan, Xie, Wu, et al., 2008), bem como está presente nos resíduos de mineração, pigmentos e baterias níquel-cádmio, resultando em uma ampla poluição do solo agrícola (Liao, Chen, Xie, & Liu, 2005). Uma importante forma de exposição de Cd aos seres humanos é através da inalação da fumaça de cigarro, pois já que possui uma alta biodisponibilidade, é facilmente depositado em vários tecidos, especialmente o trato reprodutivo (Thompson & Bannigan, 2008).

Neste contexto, muitos trabalhos já relacionaram a exposição ao Cd com níveis reduzidos de progesterona (Piasek, Blanus, Kostial, & Laskey, 2001), inibição da síntese da 17- β estradiol (Das & Mukherjee, 2013), bem como inibição da atividade da enzima δ -aminolevulianto desidratase (δ -ALA-D) testicular (Santos, Oro, Zeni, Rocha, do Nascimento, & Nogueira, 2004). Assim, os órgãos reprodutivos de fumantes estão em maior risco de exposição a níveis tóxicos de Cd. A toxicidade reprodutiva do Cd tornou-se motivo de grande preocupação nos últimos anos, embora seu mecanismo tóxico ainda permanece desconhecido (Zhang, Yang, Wang, Xia, Xu, Jia, et al., 2007), e as pesquisas sobre a sua prevenção e cura ainda não foram completamente elucidados.

A δ -ALA-D (E.C. 4.2.1.24) é uma enzima que catalisa o segundo passo da biossíntese do heme. Ela condensa duas moléculas do ácido δ -Aminolevulínico (ácido 5-aminolevulínico), com perda de duas moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (Jaffe, 2004). A δ -ALA-D é uma enzima que contém dois grupamentos tiol, e sua atividade catalítica é muito sensível a agentes oxidantes (Golombieski, Graichen, Pivetta, Nogueira, Loreto, & Rocha, 2008; Kade, Paixao, Rodrigues, Barbosa, Braga, Avila, et al., 2008; Nogueira, Zeni, & Rocha, 2004), a metais pesados que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, como o chumbo e o cádmio [para uma revisão vide Rocha, Saraiva, Garcia, Gravina, and Nogueira (2012)] e em situações associadas com o estresse oxidativo (Folmer, Soares, & Rocha, 2002; Souza, Rocha,

Nogueira, Borges, Kaizer, Morsch, et al., 2007). Deste modo, a enzima δ -ALA-D poderia ser utilizada como um marcador de toxicidade do metal.

Muitos estudos já demonstraram que o uso de antioxidantes são componentes importantes em um tratamento eficaz para a intoxicação por Cd (Soares, Izaguirry, Vargas, Mendez, Spiazzi, & Santos, 2013; Spiazzi, Manfredini, Barcellos da Silva, Flores, Izaguirry, Vargas, et al., 2013). Durante as últimas décadas, o interesse pelos compostos orgânicos de Se tem se intensificado, principalmente devido ao fato de que uma variedade destes compostos possui propriedades farmacológicas (Nogueira, Zeni et al. 2004) e antioxidantes (Brandão, Santos, Oliveira, Roman, & Nogueira, 2009; Santos, Oro, Zeni, Rocha, do Nascimento, & Nogueira, 2004; Santos, Zeni, Rocha, Weis, Fachinetto, Favero, et al., 2005) .

Anteriormente já foi demonstrado que o disseleneto de difenila [Ph(Se)₂] foi eficaz em restaurar o dano oxidativo causado pelo Cd em testículo de camundongos (Brandão, Santos, Oliveira, Roman, & Nogueira, 2009; Santos, Oro, Zeni, Rocha, do Nascimento, & Nogueira, 2004; Santos, Zeni, Rocha, do Nascimento, Marques, & Nogueira, 2005). Desta forma, uma classe de carboidratos contendo selênio têm sido estudada para avaliar o seu potencial antioxidante e efeitos biológicos e toxicológicos.

No presente estudo, examinou-se o efeito de Cd sobre a atividade da enzima δ -ALA-D de ovário bovino *in vitro*. Além disso, estudou-se o possível efeito de um novo composto orgânico de selênio (seleno-furanosídeo) na restauração da atividade da δ -ALA-D inibida por Cd. Levando-se em conta que as observações *in vitro* contribuem apenas como guia para toxicidade do Cd e a interação entre metal antioxidante, um estudo *ex vivo* foi feito para determinar a toxicidade do Cd em tecido ovariano ,assim como verificar o efeito do seleno-furanosídeo e sua interação com o metal em ovários de camundongas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 δ - Aminolevulinato Desidratase (δ - ALA-D)

A δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), conhecida como porfobilinogênio sintase, é uma enzima contendo grupos sulfidríla (-SH), que catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de δ -aminolevulinato (ácido aminolevulínico, δ -ALA) para produzir porfobilinogênio, sendo este um precursor da síntese dos tetrapirróis nas células. Os tetrapirróis, como o heme e a clorofila, são essenciais para o metabolismo aeróbico e para a fixação do carbono (Rocha, Saraiva, Garcia, Gravina, & Nogueira, 2012). Conseqüentemente, os agentes tóxicos ou metabolitos que interrompem ou interferem com a síntese dos tetrapirróis podem causar efeitos no metabolismo celular (Heinemann, Jahn, & Jahn, 2008).

A inibição da δ -ALA-D pode afetar desfavoravelmente as vias de biossíntese do heme, podendo ter conseqüências patológicas, como a anemia (da Silva, Rocha, Morsch, Zanin, Kaizer, Maldonado, et al., 2007), câncer (Goncalves, Benvegna, Bonfanti, Frediani, Pereira, & Rocha, 2009), insuficiência renal crônica (Fontanellas, Navarro, Moran-Jimenez, Sanchez-Fructuoso, Vegh, Barrientos, et al., 2002) e diabetes mellitus (Bonfanti, Ceolin, Valcorte, De Bona, de Lucca, Goncalves, et al., 2011).

A δ -ALA-D é uma metaloenzima que requer íons zinco para a sua atividade catalítica máxima (Pimentel Vieira, Rocha, Schetinger, Morsch, Rodrigues, Tuerlinckz, et al., 2000). Portanto, essa enzima pode ser inibida por substâncias que competem com o zinco ou ainda que oxidem os grupos -SH. O Zn também está envolvido na estabilização de grupos tiol / tiolato vicinais e a sua remoção por agentes quelantes pode acelerar a auto-oxidação da enzima (Emanuelli, Rocha, Pereira, Nascimento, Souza, & Beber, 1998). Inúmeros metais como mercúrio (Peixoto, Kratz, Roza, Morsch, & Pereira, 2007), chumbo (Q. Wang, Ye, Zhao, Chen, & Zhou, 2011), cádmio (Brandao, de Oliveira, & Nogueira, 2010; Brandão, Santos, Oliveira, Roman, & Nogueira, 2009; Luchese, Zeni, Rocha, Nogueira, & Santos, 2007; Santos, Rocha, & Nogueira, 2006; Santos, et al., 2005; Santos, Zeni, Rocha, do Nascimento, Marques, & Nogueira, 2005) e outros compostos, que oxidam os grupos

sulfidrílicos podem modificar a atividade da enzima (Flora, Dubey, Kannan, Chauhan, Pant, & Jaiswal, 2002; G. Wang & Fowler, 2008). Deste modo, a atividade da δ -ALA-D poderia ser utilizada como um marcador de toxicidade do metal.

Esta situação pode estar associada com o estresse oxidativo, pois além da insuficiente produção de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato δ -ALA, que está relacionado com a superprodução de Espécies Reativas (ERO), como OH^\bullet (radical hidroxila), o O_2^\bullet (anion superóxido) e o H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). (Brito, da Rocha, Puntel, da Luz, Barbosa, de Carvalho, et al., 2011), como demonstrado na figura 1.

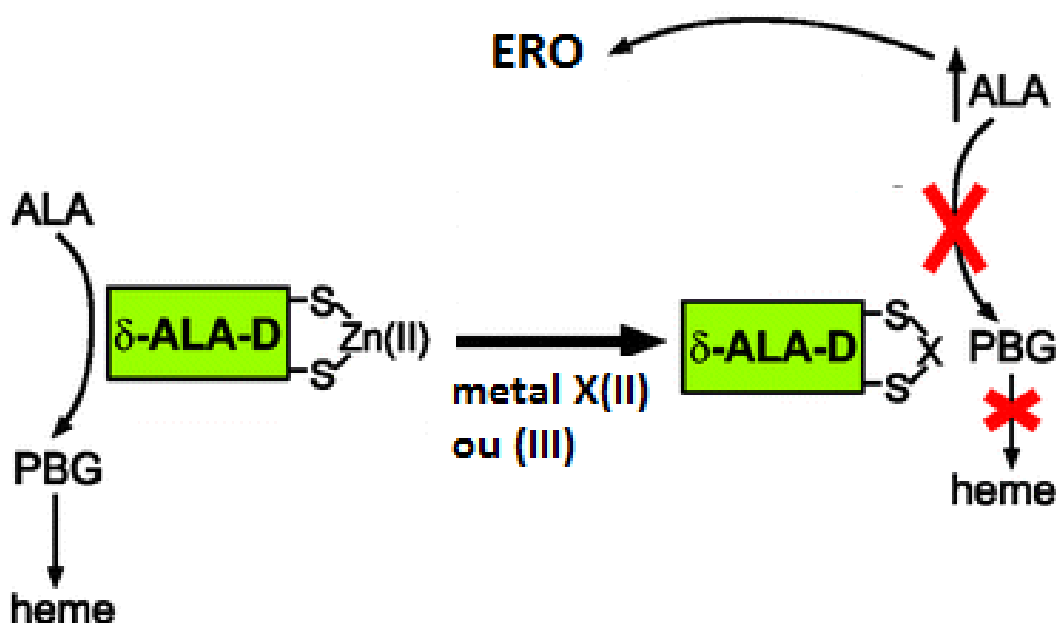


Figura 1: Esquema da possível interferência dos metais na atividade da enzima δ -aminilevulinato desidratase (δ -ALA-D). Ao inibir a atividade da enzima a síntese de porfobirinogênio (PBG) é diminuída e ocorre o acúmulo do substrato ácido δ -aminolevulinico (ALA) que está relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Adaptado de Rocha et al. (2012) (Graphical Abstract).

Do ponto de vista toxicológico, estudos de Onuki, Medeiros, Bechara, and Di Mascio (1994) demonstraram que o substrato da enzima δ -ALA-D, o δ -ALA pode apresentar propriedades pró-oxidantes sob condições fisiologicamente relevantes. Foi demonstrado também que os marcadores de estresse oxidativo foram alterados em trabalhadores expostos ao chumbo e que isso poderia estar relacionado a um aumento do δ -ALA na circulação (Costa, Trivelato, Pinto, & Bechara, 1997). Conseqüentemente, a inibição da δ -ALA-D por agentes tóxicos ou condições patológicas associadas com o estresse oxidativo podem iniciar um ciclo vicioso pró-oxidativo que vai inibir ainda mais a δ -ALA-D e aumentar a

O cádmio (Cd) é um metal tóxico proveniente de fontes industriais e agrícolas, possui uma longa meia-vida biológica de 10- 30 anos (Xiang, Wen, Wu, Jiang, He, & Liu, 2012) e um baixo nível de excreção (Akerstrom, Barregard, Lundh, & Sallsten, 2013). Com isso, o Cd é considerado de grande risco para a saúde humana devido ao fato que ele pode se acumular em órgãos como o pulmão (Luchese, Brandao, de Oliveira, Nogueira, & Santos, 2007) (Klimisch, 1993), fígado (Johansen, Mulvad, Pedersen, Hansen, & Riget, 2006), rim (Jihen el, Imed, Fatima, & Abdelhamid, 2008), testículo (Haouem, Najjar, El Hani, & Sakly, 2008; Spiazzi, et al., 2013), cérebro, ossos, sistema sanguíneo, etc. (Messaoudi, Hammouda, El Heni, Baati, Saïd, & Kerkeni, 2010).

O Cd foi descoberto como um elemento em 1817, pelo químico alemão Friedrich Strohmeyer. Um século depois, Stephens (1920) relatou intoxicações de trabalhadores por cádmio e as primeiras contribuições toxicológicas sobre a farmacologia deste metal foram descritas por Schwartze (1923). Uma das principais evidências do efeito deletério do cádmio foi evidenciada pela doença de *itai-itai* em moradores da região do rio Jinzu na Província de Toyama, Japão, por volta dos anos 1950. A doença de Itai-itai é a forma mais severa de intoxicação crônica por cádmio causada por ingestão prolongada deste metal, sendo a principal característica clínica da doença o dano renal manifestado por disfunção tubular e glomerular combinados com osteomalácia e osteoporose (Inaba, Kobayashi, Suwazono, Uetani, Oishi, Nakagawa, et al., 2005).

Atualmente o cádmio está em 7º lugar na lista prioritária de substâncias perigosas da Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (na sigla em inglês, ATSDR), que classifica os compostos conforme a ameaça significativa que esses apresentam a saúde humana devido a sua toxicidade conhecida ou suspeita, e a potencial exposição humana a essas substâncias (ATSRD, 2011). Além disso, o cádmio também é classificado como carcinogênico pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (na sigla em inglês, IARC) (IARC, 1993; Waalkes, 2003).

Este metal está presente em baixas concentrações no ambiente, porém a atividade humana aumentou significativamente estes níveis (WHO, 2010). A maior parte de Cd liberado pode ser atribuída à exposição ocupacional, resíduos de mineração, pigmentos e baterias níquel-cádmio (Liao, Chen, Xie, & Liu, 2005). Porém uma das causas mais comuns de exposição não-ocupacional ao Cd é através da fumaça do cigarro (Shiverick & Salafia,

1999). Deste modo, uma pessoa que ingere em média 1 µg/dia de cádmio via alimentação, tem um adicional de 1-3 µg/dia ao fumar um maço de cigarro por dia (ATSDR, 2008).

Um dos motivos do Cd ter um longo tempo de meia-vida e uma baixa excreção são as fortes ligações do metal com a metalotioneína (MT), principalmente em órgãos como fígado e rins onde os níveis dessa proteína são maiores, e ela propicia, pelo menos temporariamente, uma desintoxicação do metal (Klaassen, Liu, & Choudhuri, 1999), pois esta proteína liga-se a metais (essenciais e não essenciais) em nível transicional, a fim de torná-los menos reativos e diminuir sua toxicidade (Klaassen, Liu, & Choudhuri, 1999; Trinchella, Riggio, Filosa, Volpe, Parisi, & Scudiero, 2006). A conjugação da metalotioneína com o cádmio ocorre através de grupos sulfidrilas presentes na estrutura da proteína. A afinidade que o cádmio apresenta por grupos sulfidrilas faz com que ele também possa formar associações com outras moléculas como albumina, cisteína, glutatona e proteínas ricas em sulfidrilas (Klaassen, Liu, & Diwan, 2009).

No entanto, o mecanismo de toxicidade do Cd permanece bastante incerto. Têm-se demonstrado que o cádmio tem uma elevada afinidade por sítios de ligação de zinco e de cálcio e pode deslocar esses metais de complexos preexistentes (Aramini, Hiraoki, Ke, Nitta, & Vogel, 1995; Predki & Sarkar, 1992).

Os metais, especialmente metais de transição, agem como catalisadores em reações oxidativas de macromoléculas biológicas, assim, a toxicidade do metal pode estar associada ao estresse oxidativo tecidual (Yalin, Comelekoglu, Bagis, Sahin, Ogenler, & Hatungil, 2006). Entretanto, como esse metal não é ativo em reações do tipo redox ele não pode, por si só, produzir reações como as de Fenton (Moriwaki, Osborne, & Phillips, 2008), por isso acredita-se que as ERO são geradas indiretamente pelo cádmio. Dependendo da sua concentração, ocorre uma diminuição nos níveis de antioxidantes celulares e também pode ocorrer a ligação do Cd com grupos sulfidrilas em moléculas críticas, como já supracitado, levando à inativação desses grupos e conseqüentemente a um estresse oxidativo (Rikans & Yamano, 2000).

O acúmulo de metais pesados no organismo humano representa um risco significativo para a saúde, levando a uma grande variedade de doenças, associadas, ao menos em parte, aos efeitos pró-oxidantes destes metais e suas capacidades de contribuir para a geração de ERO, como o OH[•], o O₂^{•-} e o H₂O₂. O aumento da produção de ERO pode resultar na extensiva diminuição das defesas antioxidantes, acarretando uma condição conhecida como

estresse oxidativo (Brandao, Borges, de Oliveira, Rocha, & Nogueira, 2008). O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Este desemparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (Schneider, 2004).

O estresse oxidativo pode ser considerado um fator que contribui na etiologia da infertilidade masculina e feminina bem como está relacionado com o envelhecimento precoce (Angelopoulou, Lavranos, & Manolakou, 2009). Neste contexto, muitas evidências indicam que as ERO estão envolvidas na indução do dano tecidual pelo cádmio, o que causa estresse oxidativo como resultado do aumento na peroxidação lipídica e diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (Koizumi & Li, 1992). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (Bianchi, 1999).

Uma vez que os antioxidantes possuem uma importante função protegendo as células contra o estresse oxidativo, a utilização destes compostos poderia ser eficaz em proteger contra intoxicações causadas por este metal pesado. Por esse motivo, o uso de compostos antioxidantes poderia auxiliar na prevenção ou proteção contra danos causados pelo estresse oxidativo no sistema reprodutivo. Estudos de novos compostos de Se com potencial antioxidante para detoxificar diferentes ERO pode representar alternativas terapêuticas para controlar o dano oxidativo.

2.3 Cádmio e δ - Aminolevulinato Desidratase (δ - ALA-D)

A toxicidade reprodutiva do cádmio obteve uma atenção especial nos últimos anos, embora o mecanismo tóxico para esta permanece desconhecida (Zhang et al., 2007). As pesquisas sobre sua prevenção e cura ainda não têm evidências científicas suficientes. Em várias espécies, a exposição a longo prazo a este metal produz danos aos órgãos ou deficiência funcional (Sharara et al, 1998.); órgãos susceptíveis incluem o sistema reprodutivo masculino (Santos, Oro, Zeni, Rocha, do Nascimento, & Nogueira, 2004; Santos, et al., 2005; Spiazzi, et al., 2013) resultando em diminuição da fertilidade.

Anteriormente já foi demonstrado que o Cd em baixas concentrações inibe a atividade da enzima δ -ALA-D de órgãos de detoxificação, como o rim, fígado e baço. Borges, Brandão, Godoi, Nogueira, and Zeni (2008) demonstraram que uma exposição de 30 dias via oral ao CdCl₂ (5 μ mol/Kg) leva a uma diminuição da atividade da enzima em fígado e rim, com um acúmulo de metal no tecido hepático 3 vezes maior que no tecido renal, demonstrando ser um tecido alvo para a toxicidade do metal. Corroborando com os resultados (Santos, et al., 2005) visualizaram uma inibição da enzima em fígado, rim e baço, num tratamento subcrônico com a administração subcutânea de CdCl₂ (10 μ mol/Kg).

Recentemente, Bernhoft (2013) demonstrou que o Cd pode ou estimular ou inibir a δ -ALA-D de sangue e rim, dependendo do tempo de exposição. Resumidamente, a exposição *in vivo* ao Cd pode ter efeito inibitório ou estimulatório sobre a atividade da δ -ALA-D, dependendo possivelmente da concentração alcançadas pelo Cd, do tecidos alvo e também do tempo de exposição.

Considerando o fato do Cd ser um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, que este metal é responsável pelo desenvolvimento de anemias, cujo mecanismo parece envolver a síntese do heme e os seus efeitos discrepantes sobre a δ -ALA-D, torna-se de extrema importância mais estudos sobre o efeito do Cd sobre a atividade da enzima.

2.4. Selênio

O Selênio (Se) foi descoberto em 1817 e inicialmente considerado tóxico para humanos e animais. Após, estudos relataram que o Se é um elemento essencial ao organismo, fazendo parte de proteínas e enzimas (Shia, 2011; Viaro, 2001). Logo, o selênio é considerado um dos mais controversos elementos, pois por um lado é tóxico em altas concentrações, e por outro, sua deficiência causa problemas relacionados ao aumento na susceptibilidade a várias doenças em humanos e animais, além de afetar negativamente a produção e reprodução animal (Putarov, 2010).

Esse elemento está localizado no grupo dos calcogênios (grupo 16) na tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se⁺⁶), selenito (Se⁺⁴), selênio elementar (Se⁰) e seleneto (Se⁻²) (Papp, Lu, Holmgren, & Khanna, 2007). A

similaridade nas propriedades físicas e químicas do Se e Enxofre (S) permitem interações Se-S nos sistemas biológicos, entretanto, as diferenças em suas propriedades físico-químicas estabelecem suas funções específicas (Stadtman, 1980).

O Se é um elemento traço essencial na dieta, sendo encontrado em alimentos como a castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (Dumont, Vanhaecke, & Cornelis, 2006). A ingestão diária de 50-200 µg para humanos foi proposta pela Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos.

Este calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante o seu potencial antioxidante. O Se exerce sua atividade biológica através da incorporação do aminoácido selenocisteína (Sec) em uma única classe de proteínas chamadas selenoproteínas (R. Wang, Sun, Zhang, Li, & Xu, 2011). Ele atua como um constituinte da enzima Glutationa-Peroxidase (GPx), enzima esta que protege as membranas celulares dos radicais livres e de outros danos oxidativos (Viaro, 2001). A enzima GPx dependente de Se recicla glutatona, reduzindo a peroxidação lipídica, catalisando a redução de peróxidos, incluindo peróxido de hidrogênio (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008). Devido a essa função na GPx, o Se provavelmente interage com qualquer nutriente que afete o balanço anti e pró-oxidante celular (Navarro-Alarcon & Lopez-Martinez, 2000).

Durante as últimas décadas, o interesse pelos compostos orgânicos de Se tem se intensificado, principalmente devido ao fato de que uma variedade destes compostos possui propriedades farmacológicas (Nogueira, Zeni, & Rocha, 2004). Já foi demonstrado que organocalcogênios, podem ser melhores nucleófilos (e, portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos (Arteel & Sies, 2001).

Entre esses compostos podemos citar como exemplo o disseleneto de difenila (PhSe)₂. Estudos demonstraram que o (PhSe)₂ apresenta propriedades anti-úlceras (Savegnago, Trevisan, Alves, Rocha, Nogueira, & Zeni, 2006), anti-inflamatória e antinociceptiva (Savegnago, Pinto, Jesse, Alves, Rocha, Nogueira, et al., 2007) anti-hiperglicêmica (Barbosa, Rocha, Wondracek, Perotoni, Zeni, & Nogueira, 2006), neuroprotetora (Ghisleni, Porciuncula, Cimarosti, Batista, Salbego, & Souza, 2003) e pode retardar o desenvolvimento de câncer (de Vargas Barbosa, Nogueira, Guecheva, Bellinaso Mde, & Rocha, 2008), também possui efeito protetor contra a lipoperoxidação em ratos e camundongos (Santos, Oro, Zeni, Rocha, do Nascimento, & Nogueira, 2004; Santos, Zeni, Rocha, do Nascimento, Marques, & Nogueira, 2005).

Outro exemplo que podemos citar é o ebselen (2-fenil-1,2-benzilsoselenazol-3(2H)-ona), um composto orgânico de selênio cujas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias têm merecido destaque no campo da farmacologia. Esse composto apresenta propriedades antioxidantes, anti-nociceptiva, neuroprotetora e anti-inflamatória em diversos modelos experimentais (Meotti, Stangherlin, Zeni, Nogueira, & Rocha, 2004; Nogueira, Quinhones, Jung, Zeni, & Rocha, 2003; Porciuncula, Rocha, Cimarosti, Vinade, Ghisleni, Salbego, et al., 2003), além de um estudo recente que demonstrou um efeito protetor sobre o desenvolvimento de catarata (Aydemir, Guler, Kaya, Deniz, & Ustundag, 2012). Dessa forma, a atividade antioxidante exibida por compostos orgânicos de Se parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que tem o estresse oxidativo como processo central no seu desenvolvimento.

2.5.1 Seleno-Furanosídeo

A química de organoselênios continua a atrair considerável atenção devido ao seu papel na síntese de um vasto número de compostos biológicos, como seleno-aminoácidos e seleno-peptídeos. O Se é um elemento essencial na dieta humana, tendo um papel importante sob o sistema imune, envelhecimento e também sob a reprodução masculina (Clark, Combs, Turnbull, Slate, Chalker, Chow, et al., 1996; Kryukov, Castellano, Novoselov, Lobanov, Zehtab, Guigo, et al., 2003).

Os compostos organoselênios surgiram como uma classe de estruturas que serviram como compostos terapêuticos importantes, como atividade anti-viral e anti-cancerígenos (N.A., 1984).

O Seleno-Furanosídeo (Figura 3) é um composto orgânico de selênio inédito, constituído por uma molécula simples de carboidrato contendo uma molécula de Se. Os derivados de carboidratos têm despontado como uma classe de compostos com grande potencial de estudos, devido à sua semelhança química com moléculas de ocorrência natural. Sabe-se que o metabolismo da xilose em leveduras consiste em sua redução a xilitol por intermédio da enzima xilose redutase que requer como cofator o $\text{NADPH}^+ \text{H}^+$, seguida da oxidação à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, que requer como cofator o NAD (Felipe, 2003).

Os selenocarboidratos, em especial, têm sido alvo de estudos importantes para avaliação de suas atividades biológicas (Kobayashi, Ogra, Ishiwata, Takayama, Aimi, & Suzuki, 2002). Em um estudo utilizando selenocarboidratos mostrou que estes podem ter um papel regulador importante na síntese de melanina, sendo que selenocarboidratos derivados da D-glucose e D-galactose apresentaram efeitos inibitórios sobre a tirosinase, uma enzima que participa da síntese de melanina (Ahn, Koketsu, Ishihara, Lee, Ha, Lee, et al., 2006).

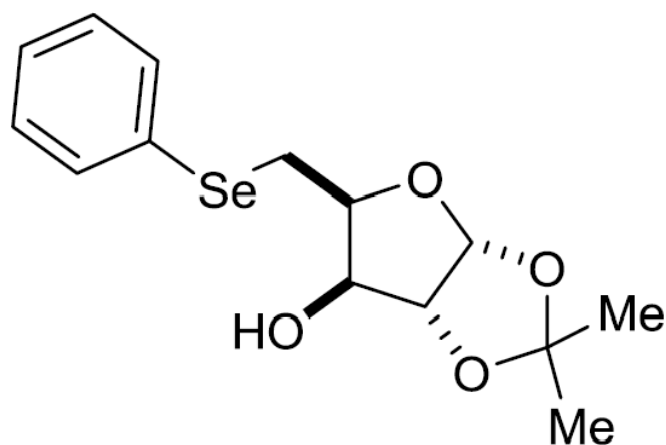


Figura 3: Estrutura Química do Seleno- Furanosídeo (Braga, Stefani, Paixão, Santos, & Lüdtke, 2010)

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do cádmio e do seleno-furanosídeo sobre a atividade da enzima δ -ALA-D de ovário, *in vitro* e *ex vivo*.

3.2 Objetivo Específico

- Determinar a atividade da enzima δ -ALA-D no tecido ovariano *in vitro*, na presença de diferentes concentrações de cloreto de cádmio.
- Analisar o possível mecanismo de inibição do cádmio sobre a atividade da δ -ALA-D, através do DTT e do $ZnCl_2$.
- Avaliar a atividade da enzima δ -ALA-D no tecido ovariano *in vitro*, na presença de diferentes concentrações de seleno-furanosídeo, bem como a interação deste com o cádmio.
- Investigar a atividade da enzima δ -ALA-D em ovário de camundongas, após a exposição aguda ao cloreto de cádmio em associação com o composto orgânico de selênio (seleno-furanosídeo), com a finalidade de avaliar o papel protetor deste frente à um possível efeito tóxico do metal.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo, o qual foi publicado pela revista *Journal of Applied Toxicology*.

Cadmium inhibits the ovary δ -aminolevulinatase dehydratase activity *in vitro* and *ex vivo*: protective role of seleno-furanoside

Laura Musacchio Vargas^a, Melina Bucco Soares^a, Aryele Pinto Izaguirry^a, Diogo Seibert Lütke^{b,c}, Hugo C. Braga^b, Lucielli Savegnago^d, Suzi Wollenhaupt^a, Daniela dos Santos Brum^a, Fábio Gallas Leivas^a and Francieli Weber Santos^{a*}

ABSTRACT: Cadmium (Cd) toxicity is a concern to the tobacco-smoking sub-population which includes millions of people worldwide. Although this metal may cause severe damage to embryos and the reproductive organs, the precise mechanisms underlying its toxicity remain unclear. In the present study, the Cd effect on ovary δ -aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) activity was investigated *in vitro* and *ex vivo*. We observed that low concentrations of Cd inhibited cow ovary δ -ALA-D activity *in vitro* and the IC_{50} value obtained was 19.17 μ M. Furthermore, the protective effect of a novel organic selenium compound (seleno-furanoside) in restoring enzyme activity was evaluated. Seleno-furanoside (10, 50, 100, 200, 400 and 1000 μ M) did not reverse the Cd toxicity in bovine ovarian tissue *in vitro*. According to the *in vitro* results, acute Cd exposure (2.5 and 5 mg kg⁻¹) caused a significant inhibition in ovary δ -ALA-D activity in mice (around 27% and 34%, respectively). Therapy with seleno-furanoside (100 μ mol kg⁻¹) was able to restore enzyme activity. Thus, we demonstrated for the first time that δ -ALA-D activity from ovary is inhibited by Cd both *in vitro* and *ex vivo*. Additionally, seleno-furanoside therapy was effective in restoring ovarian enzyme activity inhibited by Cd exposure in mice, but it did not reverse the *in vitro* metal effect. This study detected a new toxicity marker of Cd toxicity on ovarian tissue as well as the beneficial effect of a new compound to manage the metal effect after acute exposure. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: cadmium; ovary; δ -ALA-D; seleno-furanoside; mice

Introduction

Cadmium (Cd) is an industrial and environmental pollutant, arising primarily from battery, electroplating, pigment, plastic, fertilizer industries and cigarette smoke (Stohs and Bagchi, 1995). It has no known biological function, and prolonged exposure causes long-term toxic effects to humans and animals. Mainly because of its low rate of excretion from the body, Cd has a long biological half-life and accumulates over time in the blood, kidney and liver (ATSDR, 1999) as well as in the reproductive organs, including the placenta, testis and ovaries (Piasek et al., 2001). In fact, a wide spectrum of deleterious effects on the reproductive tissues and the developing embryo has also been described (Thompson and Bannigan, 2008).

In this way, higher concentrations of Cd were found in the follicular fluid and in the placentas of smokers, who had reduced levels of progesterone (Piasek et al., 2001; Yang et al., 2006). These observations support the concept that cigarette smoking is an important additional source of Cd contamination. Thus, the reproductive organs of smokers are at higher risk of exposure to toxic levels of Cd. The reproductive toxicity of Cd has become of great concern in recent years, although its toxic mechanism still remains unknown (Zhang et al., 2007), and research on its prevention and cure still lacks sufficient understanding.

δ -Aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D), a sulfhydryl enzyme, catalyzes the asymmetric condensation of two molecules of

δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) to porphobilinogen in the initial steps of heme biosynthesis (Gibson et al., 1955). Taking into account that δ -ALA-D is a metalloenzyme that requires zinc ions for its activity (Jaffe et al., 1995), this enzyme could be inhibited by substances that compete with zinc and/or oxidize the -SH groups (Brandão et al., 2010; Farina et al., 2001; Nogueira et al., 2003a) and it is linked to situations associated with oxidative stress (Tandon et al., 2002). Numerous metals such as mercury (Peixoto et al., 2007), lead (Wang et al., 2011), Cd (Brandão et al., 2009, 2010; Luchese et al., 2007; Santos et al., 2005a,b, 2006) and other compounds that oxidize sulfhydryl groups can modify the

*Correspondence to: Francieli W. Santos, Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil. E-mail: francieliweber@yahoo.com.br

^aLaboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, CEP 91501-570, Porto Alegre, RS, Brazil

^dCentro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTEC, Unidade: Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

enzyme activity (Flora et al., 2002; Wang and Fowler, 2008). In this way, δ -ALA-D activity could be used as a marker of metal toxicity.

The molecular mechanism responsible for the toxic effects of Cd is far from being completely understood. The oxidative stress induced by this metal in a biological system may be as a result of increased lipid peroxidation, which may be attributed to alterations in the antioxidant defense system (Brzóška et al., 2011; Gonçalves et al., 2010).

Thus, several authors have shown that antioxidants should be one of the important components of an effective treatment for Cd poisoning (El-Demerdash et al., 2004; Ognjanovic et al., 2010). Synthetic developments and the design of new organoselenium compounds have been attracting considerable attention, especially because these compounds have the capacity to mimic natural compounds with important biological properties (e.g. antioxidant, antitumor, anti-inflammatory and anti-infective activity) (Nicolau and Petasis, 1984; Shamberger, 1983). Previously, we demonstrated that diphenyl diselenide [(PhSe)₂] was effective in restoring acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes (Brandão et al., 2009; Santos et al., 2004, 2005a). In this way, a class of selenium-containing carbohydrates has been studied to evaluate their antioxidant potential and toxicological effects. Recently, we verified that seleno-furanosides and a carbohydrate-derived diselenide presented an inhibitory effect on rat liver δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity *in vitro*. On the other hand, one of the tested compounds did not inhibit enzyme activity, demonstrating a low toxicity and antioxidant potential (Braga et al., 2010).

In the present study, we examined the effect of Cd on δ -ALA-D activity from cow ovary *in vitro*. Furthermore, we studied the protective effect of a novel organic selenium compound (seleno-furanoside) in restoring ovary δ -ALA-D activity inhibited by Cd. Taking into account that the *in vitro* observations provide only a rough guide to the Cd toxicity and the antioxidant-metal interactions, an *ex vivo* study was done to determine Cd toxicity on ovarian tissue as well as to verify the effect of seleno-furanoside and their interaction with metal in mice ovaries.

Materials and Methods

Chemicals

δ -Aminolevulinic acid (δ -ALA), cadmium chloride (CdCl₂), *p*-dimethylaminobenzaldehyde, ascorbic acid, dithiothreitol (DTT), zinc chloride (ZnCl₂) and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Seleno-furanoside was synthesized according to Braga et al. (2010) (see Fig. 1).

Analyzes of the ¹HNMR and ¹³CNMR spectra showed that seleno-furanoside synthesized exhibited analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. Seleno-furanoside was dissolved in DMSO. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

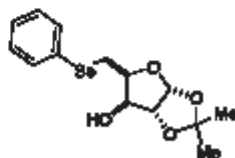


Figure 1. Structure of seleno-furanoside.

The *in vitro* Effect of Cd and Seleno-furanoside on Cow Ovary δ -ALA-D Activity

Sample

Bovine ovaries were obtained from a local slaughterhouse (Frigoeste, Uruguaiana, RS, Brazil) and were transported in saline at 20 °C to the laboratory. The ovaries were rapidly homogenized in 50 mM Tris-Cl, pH 7.4 (1/5, w/v) and centrifuged at 2400 g for 15 min. The low-speed supernatants (S1) were separated and used for enzyme assay.

Enzyme assay

The activity of cow ovary δ -ALA-D was assayed according to the procedure of Sassa (1982). The principle of the method is based on incubation of the enzyme with excess δ -aminolevulinic acid (δ -ALA). The porphobilinogen, which is formed within a fixed time, is mixed with modified Ehrlich's reagent, and the color developed is measured photometrically (555 nm) against a blank. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (δ -ALA) to a final concentration of 2.2 mM in a medium containing 45 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 and 300 μ l of ovary tissue (S1). The incubation was carried out for 180 min at 37 °C.

Effect of Cd on δ -ALA-D Activity

The CdCl₂ effect on cow ovary δ -ALA-D activity was determined in the presence of different concentrations of metal (0.1–1000 μ M). The ovarian tissue (S1) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with cadmium and after this time, the substrate (δ -ALA) was mixed to start the reaction. After the evaluation of data the *K*₅₀ value was determined. This concentration was utilized to study the protective effect of seleno-furanoside.

Taking into account that δ -ALA-D activity could be inhibited by compounds that oxidizes the -SH groups or that removes Zn²⁺ from enzyme structure, we studied the possible mechanism of cadmium toxicity. Thus, we verified the effect of dithiothreitol (DTT) (3 mM) or zinc chloride (ZnCl₂) (100 μ M) in reversing δ -ALA-D inhibition caused by cadmium (*K*₅₀). In this way, Cd was pre-incubated with ovary tissue (S1) for 10 min at 37 °C. After this time, the reaction was started by the addition of substrate (δ -ALA) and DTT or ZnCl₂.

Effect of Seleno-furanoside on Cow Ovary δ -ALA-D Activity in the Presence of Cd

The protective effect of the organic selenium compound (seleno-furanoside) was studied in the presence of Cd (*K*₅₀). The ovarian tissue (S1) was pre-incubated at 37 °C for 10 min with Cd plus seleno-furanoside (10, 50, 100, 200, 400 and 1000 μ M).

Acute Cd Exposure and Seleno-furanoside Therapy

Animals

Female adult Swiss albino mice (30–35 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept in a separate animal room, on a 12 h light/dark cycle, at a room temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food (Puro Trato, RS, Brazil) and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee

on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil.

Exposure

A group of six mice was usually tested in each experiment. The mice were injected intraperitoneally (i.p.) with a single dose of CdCl₂ (2.5 or 5 mg kg⁻¹) (dissolved in saline at 0.25 and 0.5 mg ml⁻¹) and 30 min later they received seleno-furanoside (100 μ mol kg⁻¹) subcutaneously (s.c.), an effective and non-toxic dose previously used in other organic compound studies (diphenyl diselenide) (Santos *et al.*, 2004, 2005a). The Cd intoxication protocol was chosen based on previously published papers in which testicular damage in mice occurred (Brandão *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2004, 2005a) as well as according Yalin *et al.* (2006).

Animals were euthanized 24 h after Cd treatment, the ovaries were then rapidly dissected, placed on ice and weighed. The protocol of mice treatment is given below:

- Group 1: saline (i.p.) + DMSO (s.c.)
- Group 2: CdCl₂ (2.5 mg kg⁻¹, i.p.) + DMSO (s.c.)
- Group 3: CdCl₂ (5 mg kg⁻¹, i.p.) + DMSO (s.c.)
- Group 4: saline (i.p.) + seleno-furanoside (100 μ mol kg⁻¹, s.c.)
- Group 5: CdCl₂ (2.5 mg kg⁻¹, i.p.) + seleno-furanoside (100 μ mol kg⁻¹, s.c.)
- Group 6: CdCl₂ (5 mg kg⁻¹, i.p.) + seleno-furanoside (100 μ mol kg⁻¹, s.c.)

Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Duncan's test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. The IC₅₀ value was reported as geometric means accompanied by their 95% confidence limits. The IC₅₀ value was determined by linear regression from individual experiments using "GraphPad Software" (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

Results

In Vitro

Effect of cadmium on the cow ovary δ -ALA-D activity

Cadmium significantly reduced δ -ALA-D activity in cow ovary. In fact, 1 μ M of this metal inhibited around 21% the enzyme activity. Cadmium (100 μ M) totally inhibited enzyme activity (Fig. 2). The value of calculated IC₅₀ was 19.17 μ M (95% confidence interval, CI: 9.65–28.69 μ M). The 20- μ M concentration was used to determine a possible protective effect of seleno-furanoside.

DTT (3 mM) was able to restore the inhibition of δ -ALA-D activity caused by Cd (20 μ M) and this dithiol agent potentiated enzyme activity compared with the control level (around threefold the control value). In contrast, the effect of metal (20 μ M) was not restored by ZnCl₂ (100 μ M) (Fig. 3).

Effect of seleno-furanoside on δ -ALA-D inhibition induced by cadmium

Seleno-furanoside did not demonstrate an inhibitory effect *per se* on δ -ALA-D activity at all concentrations studied. However,

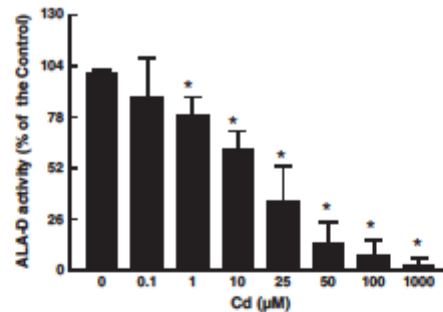


Figure 2. Effect of cadmium chloride (CdCl₂) on ovary δ -ALA-D activity. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$. δ -ALA-D activity of control (100%) was of 4.47 \pm 0.66 (mean \pm SD) nmol of porphobilinogen per mg protein per hour. (*) Denoted $P < 0.05$ as compared with the control (one-way ANOVA/Duncan).

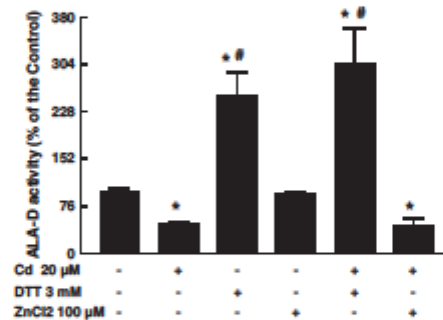


Figure 3. Effect of dithiothreitol (DTT) (3 mM) and ZnCl₂ on ovary δ -ALA-D inhibition cadmium (Cd) induced. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), $n = 5$. δ -ALA-D activity of the control (100%) was of 5.22 \pm 0.80 (mean \pm SD) nmol of porphobilinogen per mg protein per hour. (*) Denoted $P < 0.05$ as compared with the control (one-way ANOVA/Duncan). (#) Denoted $P < 0.05$ as compared with Cd 20 μ M (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

this compound was not able to restore inhibition of enzyme activity caused by cadmium (20 μ M) (Fig. 4).

Ex Vivo

Ovary δ -ALA-D activity of mice exposed to Cd and seleno-furanoside

Acute Cd exposure inhibited δ -ALA-D activity in the ovaries of mice. Exposure to 2.5 and 5 mg kg⁻¹ of Cd caused a significant reduction in enzyme activity compared with the control group (around 26% and 33% of inhibition, respectively) (Fig. 5).

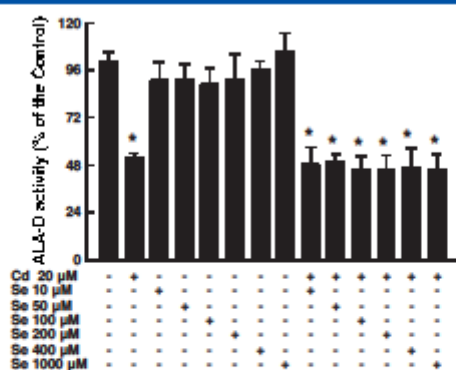


Figure 4. Effect of seleno-furanoside on ovary δ -ALA-D inhibition by cadmium (Cd)-induced. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), $n = 5$. δ -ALA-D activity of the control (100%) was of 4.88 \pm 0.62 (mean \pm SD) nmol of porphobilinogen per mg protein per hour. (*) Denoted $P < 0.05$ as compared with the control (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

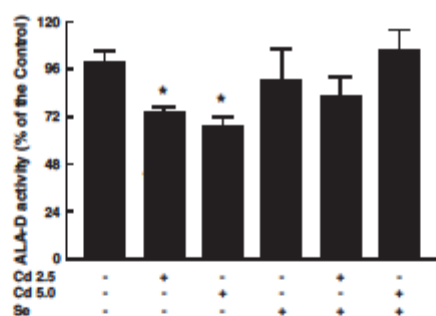


Figure 5. Effect of seleno-furanoside on cadmium-induced alterations in ovary δ -ALA-D activity in mice. Tissue was pre-incubated at 37 °C for 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). δ -ALA-D activity of control (100%) was of 8.54 \pm 0.96 (mean \pm SD) nmol of porphobilinogen per mg protein per hour. (*) Denoted $P < 0.05$ as compared with the control (one-way ANOVA/Duncan). The positive and negative signs mean added or not to the assay.

We verified that seleno-furanoside therapy did not alter enzyme activity, suggesting that the dose employed was not toxic on this parameter in mouse ovary. Furthermore, this compound was able to restore the inhibition of enzyme activity caused by Cd exposure (2.5 and 5 mg kg⁻¹) (Fig. 5).

Discussion

Over the past decade, environmental levels of Cd have consistently increased, and mammals are very susceptible to the

action of this metal (Zhang et al., 2008). Non-occupational exposure is mainly from diet and smoking (Satarug and Moore, 2004). In this context, Varga et al. (1993) demonstrated that the amount of Cd in ovaries was elevated in smokers compared with non-smokers.

Cadmium reproductive toxicity has become especially concerning in recent years, although the toxic mechanism for this remains unknown (Zhang et al., 2007), and research on its prevention and cure still lacks sufficient scientific evidence. In several species, long-term exposure to this metal produces organ damage or functional deficiency (Sharara et al., 1998); susceptible organs include those of both the male and female reproductive system, resulting in decreased fertility (Paksy et al., 1997; Leoni et al., 2002). In the female, Cd accumulation modifies endocrine pathways, inhibiting vitellogenesis in fish (Le Guevel et al., 2000) whereas in mammals Cd has been found to influence ovarian function both directly and indirectly. Additionally, epidemiological research in humans has shown that this metal accumulates in the ovaries and blood (Varga et al., 1993), supporting the role of ovarian tissue as a susceptible organ to Cd toxicity.

In the present study, we demonstrated for the first time that δ -ALA-D activity from the ovary is inhibited by Cd both *in vitro* and *ex vivo*. Previously, we demonstrated that this metal reduced testes δ -ALA-D activity in mice (Santos et al., 2004, 2005a). These observations demonstrate that this metal causes a toxic effect on the reproductive system in males and females and the δ -ALA-D activity could be a marker of Cd toxicity.

DTT was efficient in restoring enzyme activity inhibited by Cd in bovine ovaries whereas ZnCl₂ did not restore enzyme activity. Thus, we can propose that the mechanism involved in the effect of Cd on δ -ALA-D activity in ovarian tissue is related to its ability to oxidize -SH groups from enzymes, but not by displacing zinc from the enzyme structure. Of particular importance, the inhibition of δ -ALA-D can lead to the accumulation of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) (Bechara et al., 1993; Emanuelli et al., 2001), which may autoxidize to form reactive oxygen species, such as hydroperoxides (Douki et al., 1998), which are toxic, because they may react with numerous biomolecules leading to tissue injury and cell death. In accordance, Neal et al. (1997) observed the pro-oxidant effects of δ -ALA on hamster ovary cells.

Kumar et al. (2009) observed that supplementation of Se either through an organic or inorganic source resulted in an improved performance of lambs, particularly with respect to their growth rate, antioxidant status and humoral immune response; and between two the sources, organic Se was more effective than inorganic Se. Of particular importance for the design of new therapeutic approaches, synthetic antioxidant compounds such as organoselenium compounds have increased the interest mainly owing to the fact that these compounds display important biological activities.

We verified that the seleno-furanoside therapy was effective in restoring ovarian δ -ALA-D activity inhibited by acute Cd exposure in mice. On the other hand, we verified that this compound was not effective in restoring the enzyme inhibition Cd-induced in bovine ovary *in vitro*. This discrepancy between *in vitro* and *ex vivo* findings may be attributed to the bioavailability of the organic compound and/or interactions between dietary factors and endogenous substances. Furthermore, it is important to mention that the seleno-furanoside compound is likely to be chemically modified by hepatic metabolism, which may then

lead to a metabolite with beneficial biological properties. In fact, toxicological studies with selenium organic compounds such as diphenyl diselenide (PhSe)₂ demonstrated that a direct injection at a high dose into the brain of mice did not cause seizures whereas this compound when administered using the i.p. route induced seizures and death in mice (Nogueira *et al.*, 2003b) indicating that it must be first metabolized to exert a toxic effect. Thus, considering the differences *in vitro* and *ex vivo* in relation to the protective role of seleno-furanoside on enzyme activity, we could propose that this compound must be first metabolized to protect against Cd toxicity.

In previous studies, we reported that (PhSe)₂ reversed δ -ALA-D inhibition caused by acute cadmium exposure in the testes of mice (Santos *et al.*, 2004, 2005a). In contrast, this compound did not restore the inhibitory effect of Cd on δ -ALA-D activity in the lung of a rat *in vitro* (Luchese *et al.*, 2007). Moreover, opposed to previous studies that demonstrated the *in vitro* inhibitory effect of organic and inorganic forms of selenium on mammalian δ -ALA-D (Brüning *et al.*, 2009; Farina *et al.*, 2001), the present study indicated that the seleno-furanoside compound did not present an inhibitory effect on ovarian δ -ALA-D activity both *in vitro* and *ex vivo*, demonstrating a low toxicity to this compound.

In conclusion, these results showed an *in vitro* and *ex vivo* relationship of the Cd effect on ovary δ -ALA-D activity. Additionally, seleno-furanoside therapy was effective in reversing Cd toxicity on ovaries after acute exposure to the metal. However, further studies are needed to determine the clinical utility and adverse effects of this compound and/or other as well as their interaction with Cd in ovarian tissue. Considering the importance of studies to define the toxicity mechanisms of Cd as well as to explore new therapeutic approaches to manage its toxicity, this study detected a new toxicity marker of Cd on ovarian tissue as well as demonstrating the helpful effect of a new compound in reversing the metal toxicity after acute exposure.

Acknowledgments

The financial support by CNPq and FAPERGS is gratefully acknowledged. F.W.S. is a recipient of CNPq fellowships. FAPERGS is also acknowledged for financial support (grant 0702382-7 to D.S.L.) and a MSc Fellowship to H.C.B.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- ATSDR. 1999. Toxicological profile of cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Bechara EJH, Medeiros MHG, Monteiro HP, Hermes-Lima M, Pereira B, Demasi M, Acosta CA, Abdalla DSP, Onuki J, Wendel CAM, 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.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Braga HC, Stefani HA, Paixão MW, Santos FW, Lütke DS. 2010. Synthesis of 5'-seleno-xylofuranosides. *Tetrahedron* 66: 3441-3446.
- Brandão R, Oliveira R, Nogueira CW. 2010. Association between diphenyl diselenide and cadmium chloride attenuates the toxicity of both in tissues of mice *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* 26: 1736-1742.
- Brandão R, Santos FW, Oliveira R, Roman SS, Nogueira CW. 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.
- Brüning CA, Prigol M, Barancelli DA, Nogueira CW, Zeni G. 2009. Disubstituted diaryl diselenides inhibit δ -ALA-D and Na⁺,K⁺-ATPase activities in rat brain homogenates *in vitro*. *Mol. Cell. Biochem.* 332: 17-24.
- Brzóska MM, Rogalska J, Kupraszewicz E. 2011. The involvement of oxidative stress in the mechanisms of damaging cadmium action in bone tissue: A study in a rat model of moderate and relatively high human exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250: 327-335.
- Douki T, Onuki J, Medeiros MHG, Bechara EJH, Cadet J, 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.
- El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. 2004. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood haematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. *Food Chem. Toxicol.* 42: 1563-1571.
- Emanuelli T, Pagel FW, Alves LB, Regner A, Souza DO. 2001. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. *Neurochem. Int.* 38: 213-218.
- Farina M, Folmer V, Andrade LH, Zeni G, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JBT. 2001. Selenoxides inhibits δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol. Lett.* 119: 27-37.
- Flora SJS, Dubey R, Kannan GM, Chauhan RS, Pant BP, Jaiswal DK. 2002. Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and monosoyamyl DMSA effect on gallium arsenide induced pathological liver injury in rats. *Toxicol. Lett.* 132: 9-17.
- Gibson KD, Neuberger A, Scott JJ. 1955. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* 61: 618-628.
- Gonçalves JF, Florenza AM, Spanevello RM, Mazzanti CM, Bochi GV, Antes FG, Stefanelli N, Rubin MA, Dressler VL, Morsch VM, Schetinger MRC. 2010. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chem. Biol. Interact.* 186: 53-60.
- Jaffe EK, Ali S, Mitchell LW, Taylor KM, Volin M, Markham GD. 1995. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. *Biochemistry* 34: 244-251.
- Kumar N, Garga AK, Datta RS, Chaturvedi VK, Mudgal V, Varshney VP. 2009. Selenium supplementation influences growth performance, antioxidant status and immune response in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153: 77-87. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2009.06.007
- Le Guevel R, Petit FG, Le Goff P, Metivier R, Valotaire Y, Pakdel F. 2000. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biol. Reprod.* 63: 256-259.
- Leoni G, Bogliolo L, Delana G, Berlinguer F, Rosati I, Pintus PP, Ledda S, Naitana S. 2002. Influence of cadmium exposure on *in vitro* ovine gamete dysfunction. *Reprod. Toxicol.* 16: 371-377.
- Luchese C, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW, Santos FW. 2007. Cadmium inhibits δ -aminolevulinic acid dehydratase from rat lung *in vitro*: Interaction with chelating and antioxidant agents. *Chem. Biol. Interact.* 165: 127-137.
- Neal R, Yang P, Flecht J, Yildiz D, Gurer H, Ercal N. 1997. Pro-oxidant effects of 6-aminolevulinic acid (δ -ALA) on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. Lett.* 91: 169-178.
- Nicolaou KC, Petasis NA. 1984. *Selenium in Natural Products Synthesis*. CS, Inc., Philadelphia, PA.
- Nogueira CW, Soares FA, Nascimento PC, Müller D, Rocha JBT. 2003a. 2,3-Dimercaptopropyl-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology* 184: 85-95.
- Nogueira CW, Meotti FC, Curte E, Pilissão C, Zeni G, Rocha JBT. 2003b. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183: 29-37.
- Ognjanovic BI, Markovic SD, Dordevic NZ, Trbojevic IS, Stajin AS, Saicic ZS. 2010. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reprod. Toxicol.* 29: 191-197.
- Paksy K, Rajczy K, Forgacs Z, Lazar P, Bernard A, Gatti L. 1997. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *J. Appl. Toxicol.* 17: 321-327.
- Peixoto NC, Kratz CP, Roza T, Morsch VM, Pereira ME. 2007. Effects of HgCl₂ on porphobilinogen-synthase (EC. 4.2.1.24) activity and on mercury levels in rats exposed during different precocious periods of postnatal life. *Cell Biol. Int.* 31: 1057-1062.

- Piasek M, Blanus M, Kostial K, Laskey JW. 2001. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod. Toxicol.* **15**: 673–681.
- Santos FW, Oro T, Zeni G, Rocha JBT, Nascimento PC, Nogueira CW. 2004. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol. Lett.* **152**: 255–263.
- Santos FW, Rocha JBT, Nogueira CW. 2006. 2,3-Dimercaptopropanol, 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase lead-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase in vitro and ex vivo. *Toxicol. In Vitro* **20**: 317–323. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.08.006
- Santos FW, Zeni G, Rocha JBT, Nascimento PC, Marques MS, Nogueira CW. 2005a. 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 FW, Zeni G, Rocha JBT, Wels SN, Fachineto JM, Favero AM, Nogueira CW. 2005b. 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, Moore MR. 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health Perspect.* **112**: 1099–1103.
- Shamberger RJ. 1983. *Biochemistry of Selenium*. Plenum: New York, NY.
- Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA. 1998. Environmental toxicants and female reproduction. *Fert. Ster.* **70**: 613–622.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 321–336.
- Tandon SK, Singh S, Prasad S, Srivastava S, Siddiqui MKJ. 2002. Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat. *Environ. Res. Sect. A* **90**: 61–66.
- Thompson J, Bannigan J. 2008. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol.* **25**: 304–315.
- Varga B, Zsolnai B, Paksy K, Náray M, Ungváry G. 1993. Age dependent accumulation of cadmium in the human ovary. *Reprod. Toxicol.* **7**: 225–228.
- Wang G, Fowler BA. 2008. Roles of Biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **233**: 92–99.
- Wang Q, Ye LX, Zhao HH, Chen JW, Zhou YK. 2011. Benchmark dose approach for low-level lead induced haematogenesis inhibition and associations of childhood intelligences with ALAD activity and ALA levels. *Sci. Total Environ.* **409**: 1806–1810.
- Yalin S, Comelekoglu U, Bagis S, Sahin NO, Ogenler O, Hatungil R. 2006. Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **65**: 140–144.
- Yang K, Julian L, Rubio F. 2006. Cadmium reduces 11- hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**: E135–E142.
- Zhang W, Pang F, Huang Y, Yan P, Lin W. 2008. Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. *Toxicol. Lett.* **182**: 18–23.
- Zhang W, Yang J, Wang J, Xia P, Xu Y, Jia H, Chen Y. 2007. Comparative studies on the increase of uterine weight and related mechanisms of cadmium and p-nonylphenol. *Toxicology* **241**: 84–91.

4 CONCLUSOES

Com o trabalho, verificou-se que:

- Baixas concentrações de Cd inibiram a atividade da enzima δ -ALA-D em ovário de vaca *in vitro*, e o valor da IC₅₀ obtido foi de 19,17 μ M.
- O Seleno- furanosídeo (10, 50, 100, 200, 400 e 1000 μ M) não foi capaz de reverter a toxicidade do Cd no tecido ovariano bovino *in vitro*.
- Foi demonstrado que o DTT (3mM) protegeu a inibição da atividade da enzima causada pelo Cd, enquanto o ZnCl₂ (100 μ M) não protegeu o efeito inibitório do metal, sugerindo que a inibição da atividade da enzima estaria relacionado a oxidação dos grupos tiólicos.
- No estudo *ex vivo* utilizando camundongos Swiss (fêmeas adultas), a exposição aguda ao Cd (2,5 e 5 mg/kg intraperitoneal) provocou uma inibição significativa da atividade da δ -ALA-D de ovário (cerca de 27% e 34%, respectivamente). A terapia com o seleno-furanosídeo *ex vivo* (100 μ mol/kg) foi capaz de restaurar a atividade enzimática.

Assim, foi demonstrado pela primeira vez que a atividade da enzima δ -ALA-D ovariana é inibida pelo Cd tanto *in vitro* como *ex vivo*. Além disso, a terapia com o seleno-furanosídeo foi eficaz em restaurar a atividade da enzima inibida pela exposição ao Cd em ovário de camundongas, mas não foi eficaz em reverter o efeito do metal *in vitro*.

Neste estudo, foi encontrado um novo marcador de toxicidade de Cd no tecido ovariano, bem como o efeito benéfico de um novo composto para tratar o efeito do metal após a exposição aguda do Cd.

5 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Avaliar o efeito do Seleno- Furanosídeo em um modelo de exposição crônica ao cádmio, para verificar o efeito de uma exposição crônica ao metal sobre a atividade da enzima δ -ALA-D de ovário, bem como posterior avaliação histológica dos ovários.
- Em um modelo de exposição aguda ao Cd e ao seleno-furanosídeo, determinar dos níveis de antioxidantes não- enzimáticos, como Glutationa (GSH) e Ácido Ascórbico, e outros enzimáticos, como Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutationa Redutase (GR), bem como determinar os níveis de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e o dano de DNA através de ensaio cometa.
- Determinar os níveis de progesterona, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante, com o objetivo de investigar se o cádmio altera os níveis destes hormônios e se o composto poderia interferir nestes parâmetros.
- Avaliar o efeito do Seleno- Furanosídeo em um modelo de exposição aguda ao cádmio em camundongos, a fim de elucidar os efeitos do composto sobre o sistema reprodutor masculino, para posterior avaliação de parâmetros antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), avaliação histológica dos testículos, assim como avaliação espermática levando em consideração a concentração, motilidade, morfologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, S. J., Koketsu, M., Ishihara, H., Lee, S. M., Ha, S. K., Lee, K. H., Kang, T. H., & Kima, S. Y. (2006). Regulation of melanin synthesis by selenium-containing carbohydrates. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *54*(3), 281-286.
- Akerstrom, M., Barregard, L., Lundh, T., & Sallsten, G. (2013). The relationship between cadmium in kidney and cadmium in urine and blood in an environmentally exposed population. *Toxicol Appl Pharmacol*, *268*(3), 286-293.
- Angelopoulou, R., Lavranos, G., & Manolakou, P. (2009). ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reproductive Toxicology*, *28*(2), 167-171.
- Aramini, J. M., Hiraoki, T., Ke, Y., Nitta, K., & Vogel, H. J. (1995). Cadmium-113 NMR studies of bovine and human alpha-lactalbumin and equine lysozyme. *J Biochem*, *117*(3), 623-628.
- Arteel, G. E., & Sies, H. (2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol*, *10*(4), 153-158.
- ATSDR, A. f. T. S. a. D. R. (2008). Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). In). Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- ATSRD. (2011). Detailed data table for the 2011 priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles. . In).
- Aydemir, O., Guler, M., Kaya, M. K., Deniz, N., & Ustundag, B. (2012). Protective effects of ebselen on sodium-selenite-induced experimental cataract in rats. *J Cataract Refract Surg*, *38*(12), 2160-2166.
- Barbosa, N. B., Rocha, J. B., Wondracek, D. C., Perottoni, J., Zeni, G., & Nogueira, C. W. (2006). Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chem Biol Interact*, *163*(3), 230-238.
- Bechara, E. J. H., Dutra, F., Cardoso, V. E. S., Sartori, A., Olympio, K. P. K., Penatti, C. A. A., Adhikari, A., & Assunção, N. A. (2007). The dual face of endogenous α -aminoketones: Pro-oxidizing metabolic weapons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *146*(1-2), 88-110.
- Bernhoft, R. A. (2013). Cadmium toxicity and treatment. *ScientificWorldJournal*, *2013*, 394652.
- Bianchi, M. L. P., Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de nutrição*, *12*, 123-130.
- Bonfanti, G., Ceolin, R. B., Valcorte, T., De Bona, K. S., de Lucca, L., Goncalves, T. L., & Moretto, M. B. (2011). delta-Aminolevulinatase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress. *Clinical Biochemistry*, *44*(13), 1105-1109.
- Border, E. A., Cantrell, A. C., & Kilroe-Smith, T. A. (1976). The in vitro effect of zinc on the inhibition of human delta-aminolevulinic acid dehydratase by lead. *Br J Ind Med*, *33*(2), 85-87.
- Borges, L. P., Brandão, R., Godoi, B., Nogueira, C. W., & Zeni, G. (2008). Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chem Biol Interact*, *171*(1), 15-25.
- Brandao, R., Borges, L. P., de Oliveira, R., Rocha, J. B., & Nogueira, C. W. (2008). Diphenyl diselenide protects against hematological and immunological alterations induced by mercury in mice. *J Biochem Mol Toxicol*, *22*(5), 311-319.
- Brandao, R., de Oliveira, R., & Nogueira, C. W. (2010). Association between diphenyl diselenide and cadmium chloride attenuates the toxicity of both in tissues of mice in vitro. *Toxicol In Vitro*, *24*(6), 1736-1742.

- Brandão, R., Santos, F. W., Oliveira, R., Roman, S. S., & 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. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(4), 324-333.
- Brito, V. B., da Rocha, J. B., Puntel, G. O., da Luz, S. C., Barbosa, N. B., de Carvalho, N. R., & Folmer, V. (2011). Inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase is not closely related to the development of hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice. *Exp Toxicol Pathol*, 63(5), 443-451.
- Clark, L. C., Combs, G. F., Jr., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G. F., Gross, E. G., Kronrad, A., Leshner, J. L., Jr., Park, H. K., Sanders, B. B., Jr., Smith, C. L., & Taylor, J. R. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*, 276(24), 1957-1963.
- Costa, C. A., Trivelato, G. C., Pinto, A. M., & Bechara, E. J. (1997). Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin Chem*, 43(7), 1196-1202.
- da Silva, A. C., Rocha, J. B. T., Morsch, A. L. B., Zanin, R. F., Kaizer, R., Maldonado, P. A., Arantes, L. C., Silva, L. A., Morsch, V. M., & Schetinger, M. R. C. (2007). Oxidative stress and δ -ALA-D activity in chronic renal failure patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(2-3), 180-185.
- Das, S., & Mukherjee, D. (2013). Effect of cadmium chloride on secretion of 17 β -estradiol by the ovarian follicles of common carp, *Cyprinus carpio*. *General and Comparative Endocrinology*, 181(0), 107-114.
- de Vargas Barbosa, N. B., Nogueira, C. W., Guecheva, T. N., Bellinaso Mde, L., & Rocha, J. B. (2008). Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. *Arch Toxicol*, 82(9), 655-663.
- Dumont, E., Vanhaecke, F., & Cornelis, R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, 385(7), 1304-1323.
- Emanuelli, T., Rocha, J. B., Pereira, M. E., Nascimento, P. C., Souza, D. O., & Beber, F. A. (1998). delta-Aminolevulinic acid dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state. *Pharmacol Toxicol*, 83(3), 95-103.
- Felipe, M. G. A. (2003). Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. . *Simpósio nacional de fermentações*.
- Flora, S. J. S., Dubey, R., Kannan, G. M., Chauhan, R. S., Pant, B. P., & Jaiswal, D. K. (2002). Meso 2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and monoisoamyl DMSA effect on gallium arsenide induced pathological liver injury in rats. *Toxicol Lett*, 132(1), 9-17.
- Folmer, V., Soares, J. C., & Rocha, J. B. (2002). Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(10), 1279-1285.
- Fontanellas, A., Navarro, S., Moran-Jimenez, M. J., Sanchez-Fructuoso, A. I., Vegh, I., Barrientos, A., & de Salamanca, R. E. (2002). Erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase activity as a lead marker in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*, 40(1), 43-50.
- Ghisleni, G., Porciuncula, L. O., Cimarosti, H., Batista, T. R. J., Salbego, C. G., & Souza, D. O. (2003). Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoreactivity. *Brain Res*, 986(1-2), 196-199.
- Golombieski, R. M., Graichen, D. A. S., Pivetta, L. A., Nogueira, C. W., Loreto, E. L. S., & Rocha, J. B. T. (2008). Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] inhibits *Drosophila melanogaster* delta-aminolevulinic acid dehydratase (delta-ALA-D) gene transcription and enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 147(2), 198-204.

- Goncalves, T. L., Benvegna, D. M., Bonfanti, G., Frediani, A. V., Pereira, D. V., & Rocha, J. B. (2009). Oxidative stress and delta-ALA-D activity in different conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. *Clinical Biochemistry*, 42(7-8), 602-610.
- Haouem, S., Najjar, M. F., El Hani, A., & Sakly, R. (2008). Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Exp Toxicol Pathol*, 59(5), 307-311.
- Heinemann, I. U., Jahn, M., & Jahn, D. (2008). The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 474(2), 238-251.
- IARC, I. A. f. R. o. C. (1993). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. . In *Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Industry*, vol. 58 (pp. 119-238). Lyon: IARC.
- Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Y., Uetani, M., Oishi, M., Nakagawa, H., & Nogawa, K. (2005). Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol Lett*, 159(2), 192-201.
- Jaffe, E. K. (2004). The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. *Bioorg Chem*, 32(5), 316-325.
- Jihen el, H., Imed, M., Fatima, H., & Abdelhamid, K. (2008). Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: histology and Cd accumulation. *Food Chem Toxicol*, 46(11), 3522-3527.
- Johansen, P., Mulvad, G., Pedersen, H. S., Hansen, J. C., & Riget, F. (2006). Accumulation of cadmium in livers and kidneys in Greenlanders. *Sci Total Environ*, 372(1), 58-63.
- Kade, I. J., Paixao, M. W., Rodrigues, O. E. D., Barbosa, N. B. V., Braga, A. L., Avila, D. S., Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. T. (2008). Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. *Neurochemical Research*, 33(1), 167-178.
- Klaassen, C. D., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 267-294.
- Klaassen, C. D., Liu, J., & Diwan, B. A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3), 215-220.
- Klimisch, H. J. (1993). Lung deposition, lung clearance and renal accumulation of inhaled cadmium chloride and cadmium sulphide in rats. *Toxicology*, 84(1-3), 103-124.
- Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N., & Suzuki, K. T. (2002). Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25), 15932-15936.
- Koizumi, T., & Li, Z. G. (1992). Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health*, 37(1), 25-36.
- Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehab, O., Guigo, R., & Gladyshev, V. N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300(5624), 1439-1443.
- Liao, X. Y., Chen, T. B., Xie, H., & Liu, Y. R. (2005). Soil As contamination and its risk assessment in areas near the industrial districts of Chenzhou City, Southern China. *Environ Int*, 31(6), 791-798.
- Luchese, C., Brandao, R., de Oliveira, R., Nogueira, C. W., & Santos, F. W. (2007). Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol Lett*, 173(3), 181-190.
- Luchese, C., Zeni, G., Rocha, J. B., Nogueira, C. W., & 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(2), 127-137.

- Meotti, F. C., Stangherlin, E. C., Zeni, G., Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. (2004). Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res*, 94(3), 276-282.
- Messaoudi, I., Hammouda, F., El Heni, J., Baati, T., Saïd, K., & Kerkeni, A. (2010). Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(3), 281-288.
- Moriwaki, H., Osborne, M. R., & Phillips, D. H. (2008). Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicol In Vitro*, 22(1), 36-44.
- N.A., K. C. N. P. (1984). *Selenium in Natural Products Synthesis*. Hardcover: C I S, Incorporated.
- Navarro-Alarcon, M., & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ*, 400(1-3), 115-141.
- Navarro-Alarcon, M., & Lopez-Martinez, M. C. (2000). Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ*, 249(1-3), 347-371.
- Nogueira, C. W., Quinhones, E. B., Jung, E. A., Zeni, G., & Rocha, J. B. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res*, 52(2), 56-63.
- Nogueira, C. W., Zeni, G., & Rocha, J. B. T. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews*, 104(12), 6255-6285.
- Onuki, J., Medeiros, M. H., Bechara, E. J., & Di Mascio, P. (1994). 5-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe²⁺ ions. *Biochim Biophys Acta*, 1225(3), 259-263.
- Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., & Khanna, K. K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, 9(7), 775-806.
- Patel, A., & Athawale, A. (2009). Blood lead levels in children with encephalopathy. *Indian Pediatr*, 46(10), 845-848.
- Peixoto, N. C., Kratz, C. P., Roza, T., Morsch, V. M., & Pereira, M. E. (2007). Effects of HgCl₂ on porphobilinogen-synthase (E.C. 4.2.1.24) activity and on mercury levels in rats exposed during different precocious periods of postnatal life. *Cell Biol Int*, 31(9), 1057-1062.
- Piasek, M., Blanusa, M., Kostial, K., & Laskey, J. W. (2001). Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reproductive Toxicology*, 15(6), 673-681.
- Pimentel Vieira, V. L., Rocha, J. B., Schetinger, M. R., Morsch, V. M., Rodrigues, S. R., Tuerlinckz, S. M., Bohrer, D., & do Nascimento, P. C. (2000). Effect of aluminum on delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse blood. *Toxicol Lett*, 117(1-2), 45-52.
- Porciuncula, L. O., Rocha, J. B., Cimarosti, H., Vinade, L., Ghisleni, G., Salbego, C. G., & Souza, D. O. (2003). Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunoccontent of inducible nitric oxide synthase. *Neurosci Lett*, 346(1-2), 101-104.
- Predki, P. F., & Sarkar, B. (1992). Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J Biol Chem*, 267(9), 5842-5846.
- Putarov, T. C. (2010). Avaliação de fontes de selênio e seus efeitos no perfil metabólico e condição reprodutiva de cães. In *Dissertação de Mestrado*. Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista.
- Rikans, L. E., & Yamano, T. (2000). Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, 14(2), 110-117.
- Rocha, J. B. T., Saraiva, R. A., Garcia, S. C., Gravina, F. S., & Nogueira, C. W. (2012). Aminolevulinic acid dehydratase ([small delta]-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. *Toxicology Research*, 1(2), 85-102.
- Santos, F. W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J. B. T., do Nascimento, P. C., & Nogueira, C. W. (2004). Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicology Letters*, 152(3), 255-263.

- Santos, F. W., Rocha, J. B., & 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(3), 317-323.
- Santos, F. W., Zeni, G., Rocha, J. B., Weis, S. N., Fachinetto, J. M., Favero, A. M., & Nogueira, C. W. (2005). Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact*, 151(3), 159-165.
- Santos, F. W., Zeni, G., Rocha, J. B. T., do Nascimento, P. C., Marques, M. S., & Nogueira, C. W. (2005). Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 43(12), 1723-1730.
- Savegnago, L., Pinto, L. G., Jesse, C. R., Alves, D., Rocha, J. B., Nogueira, C. W., & Zeni, G. (2007). Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. *Eur J Pharmacol*, 555(2-3), 129-138.
- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J. B., Nogueira, C. W., & Zeni, G. (2006). Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ Toxicol Pharmacol*, 21(1), 86-92.
- Schneider, C. D. O., A.R. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. In *Rev Bras Med Esporte*, vol. 10 (pp. 308-313). Scielo
- Schwartz, E. W. A., C.L. . (1923). Studies on the pharmacology of cadmium and zinc with particular reference to emesis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 21, 1-22.
- Shia, L. X., W.; Yuea, W.; Zhanga, C.; Rena, Y.; Shia, L.; Wanga, Q.; Yanga, R.; Lei, F. . (2011). Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Ruminant Research*, 96, 49-52.
- Shiverick, K. T., & Salafia, C. (1999). Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and placental effects. *Placenta*, 20(4), 265-272.
- Soares, M. B., Izaguirry, A. P., Vargas, L. M., Mendez, A. S. L., Spiazzi, C. C., & Santos, F. W. (2013). Catechins are not major components responsible for the beneficial effect of *Camellia sinensis* on the ovarian δ -ALA-D activity inhibited by cadmium. *Food and Chemical Toxicology*, 55(0), 463-469.
- Souza, J. B., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., Borges, V. C., Kaizer, R. R., Morsch, V. M., Dressler, V. L., Martins, A. F., Flores, E. M. M., & Schetinger, M. R. C. (2007). Delta-aminolevulinic acid dehydratase (delta-ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. *Clinical Biochemistry*, 40(5-6), 321-325.
- Spiazzi, C. C., Manfredini, V., Barcellos da Silva, F. E., Flores, É. M. M., Izaguirry, A. P., Vargas, L. M., Soares, M. B., & Santos, F. W. (2013). γ -Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. *Food and Chemical Toxicology*, 55(0), 526-532.
- Stadtman, T. C. (1980). Selenium-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem*, 49, 93-110.
- Stephens, G. A. (1920). Cadmium poisoning. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 2, 129.
- Thompson, J., & Bannigan, J. (2008). Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*, 25(3), 304-315.
- Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Volpe, M. G., Parisi, E., & Scudiero, R. (2006). Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 144(3), 272-278.
- Viaro, R. S. V., M.S.; Fleck, J. . (2001). Importância bioquímica do selênio para o organismo humano. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Biológicas e da Saúde*, 2(1), 17-21.
- Waalkes, M. P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res*, 533(1-2), 107-120.
- Wang, G., & Fowler, B. A. (2008). Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol*, 233(1), 92-99.

- Wang, Q., Ye, L. X., Zhao, H. H., Chen, J. W., & Zhou, Y. K. (2011). Benchmark dose approach for low-level lead induced haematogenesis inhibition and associations of childhood intelligences with ALAD activity and ALA levels. *Sci Total Environ*, *409*(10), 1806-1810.
- Wang, R., Sun, B., Zhang, Z., Li, S., & Xu, S. (2011). Dietary selenium influences pancreatic tissue levels of selenoprotein W in chickens. *J Inorg Biochem*, *105*(9), 1156-1160.
- Whittaker, M. H., Wang, G., Chen, X. Q., Lipsky, M., Smith, D., Gwiazda, R., & Fowler, B. A. (2011). Exposure to Pb, Cd, and As mixtures potentiates the production of oxidative stress precursors: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, *254*(2), 154-166.
- WHO. (2010). Preventing disease through healthy environments. In *Exposure to cadmium: A major public health concern*. Geneva, Switzerland: International Programme On Chemical Safety.
- Xiang, G., Wen, S., Wu, X., Jiang, X., He, L., & Liu, Y. (2012). Selective cloud point extraction for the determination of cadmium in food samples by flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, *132*(1), 532-536.
- Yalin, S., Comelekoglu, U., Bagis, S., Sahin, N. O., Ogenler, O., & Hatungil, R. (2006). Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *Ecotoxicol Environ Saf*, *65*(1), 140-144.
- Zhai, L. M., Liao, X. Y., Chen, T. B., Yan, X. L., Xie, H., Wu, B., & Wang, L. X. (2008). Regional assessment of cadmium pollution in agricultural lands and the potential health risk related to intensive mining activities: A case study in Chenzhou City, China. *Journal of Environmental Sciences-China*, *20*(6), 696-703.
- Zhang, W. C., Yang, J. S., Wang, J. L., Xia, P. C., Xu, Y. Q., Jia, H. M., & Chen, Y. S. (2007). Comparative studies on the increase of uterine weight and related mechanisms of cadmium and p-nonylphenol. *Toxicology*, *241*(1-2), 84-91.

APÊNDICE A – Esquema representativo dos resultados

