

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – FISIOLOGIA ANIMAL
COMPARADA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO NAS CÉLULAS
ESPERMÁTICAS DE ZEBRAFISH, *Danio rerio*.

IZANI BONEL ACOSTA

Orientadora: Prof. Dra. Carine Dahl Corcini

Rio Grande, Janeiro 2015

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO NAS CÉLULAS
ESPERMÁTICAS DE ZEBRAFISH, *Danio rerio*.**

IZANI BONEL ACOSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Carine Dahl Corcini

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Rio Grande, Janeiro 2015

AGRADECIMENTOS

Dedico esta importante conquista à Sabedoria Divina, que sempre se fez presente:

Na minha intenção de fazer o certo e o melhor,
Nas pessoas que eu convivi durante todo este tempo,
Nas lições que aprendi conhecendo colegas, ajudando e sendo ajudada,
No crescimento profissional e pessoal ao longo desta caminhada
Na luz que surgia quando tudo parecia escuro,
Na força que me empurrava para frente quando o desânimo não me permitia avançar,
Na alegria que sentia em cada resultado alcançado,
No conhecimento e apoio dos professores que orientaram este estudo.

Dedico todo meu amor ao meu esposo, minha alma gêmea e meu grande amor, pelo incentivo, pelo companheirismo, por todos os momentos que estive ausente e por todos aqueles que tivestes que ser pai e mãe dos nossos tesouros. Obrigada pelo incentivo de todos os dias. Te amo !!

Aos meus filhos, amores da minha vida, Juan e Carolina agradeço pela oportunidade de experimentar a mais pura forma de amor, e por terem acompanhado com amor e paciência esse momento, dando-me a certeza de que todos os dias, são maravilhosos.

Aos meus pais Lira e Clovis (*in memoriam*) pela minha vida, pelos ensinamentos, meu eterno respeito e amor.

Dedico aos meus sogros Ieda e Jose Arnaldo, que sempre me apoiaram, pela dedicação e amor infinito aos seus netos. Minha sogra meu carinhoso obrigada por todos os dias e noites que com sua incansável dedicação e ternura zelou pelos meus, pelos “nossos filhotes”.

À minha Mana Josiane, que me incentivou a não desistir, que criou oportunidades, que impulsionou a trocar de caminho. Obrigada pela ajuda, para que finalmente encontrasse meu objetivo e felicidade profissional. Devo muito a você esse momento!!

Meus sinceros e carinhosos agradecimentos a minha orientadora Dra. Carine Corcini por dividir comigo seus conhecimentos, pela confiança em me acolher, pela oportunidade que me deu de crescimento profissional e pessoal, compreendendo minhas limitações.

Aos colegas e amigos Juliana, Fernanda, Daniele, Janaina, Clarissa, Joziel e Jean, obrigada pelo incentivo e torcida.

A minha querida amiga Estela, sou grata pela sua amizade, pela paciência, pela companhia, pelas conversas e também pela disponibilidade em sempre ajudar independente da hora ou dia. Pelas palavras de apoio nos inúmeros e conturbados

experimentos. Sua ajuda nesse trabalho foi de extrema importância e conclusão. Muito obrigada !!!

Ao professor Dr. Antonio Sergio, por todas as conversas, idéias, trabalhos, e principalmente pelas análises no citômetro.

A minha amiga Tainã que mesmo tão longe, foi de extrema importância na finalização deste trabalho.

Ao professor Rodrigo Desessards Jardim pela orientação no estágio de docência que foi desafiador e contribuiu fundamentalmente para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal pela oportunidade da realização deste sonho

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos

Á Deus, pois Ele também foi meu orientador, não do mestrado, mas de toda minha vida. Por conceder a bênção de poder concluir mais esta etapa, dando-me sabedoria nas escolhas e força para continuar. Por isso, eu dedico á Ele !!!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
1. INTRODUÇÃO GERAL	6
1.1 O Ambiente Aquático	6
1.2 A poluição do ambiente aquático	7
1.3 Os Metais e a Poluição Aquática	8
1.4 O Cádmio como poluente e seus mecanismos de toxicidade	9
1.5 A Toxicidade Reprodutiva do Cádmio.....	11
1.6 Motilidade, estruturas e estresse oxidativo em espermatozoide, como marcadores em estudos toxicológicos	12
1.7 Zebrafish: um vertebrado destaque em estudos de toxicologia	17
1.8 A importância de experimento in vitro para estudos de Toxicologia	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
4. MANUSCRITO.....	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUCTION.....	23
2. MATERIALS AND METHODS.....	24
2.1 Assessment of sperm motility using computer-aided semen analysis (CASA)	25
2.2 Flow cytometry	26
2.3 Integrity of the plasma membrane.....	26
2.4 Fluidity of the plasma membrane.....	26
2.5 Mitochondrial functionality	26
2.6 DNA fragmentation index	27
2.7 Concentration of reactive oxygen species (ROS)	27
2.8 Statistical Analysis	27
3. RESULTS	27
4. DISCUSSION.....	30
5. CONCLUSION.....	32
6. REFERENCES	33
DISCUSSÃO GERAL.....	38
REFERÊNCIAS GERAIS	39

RESUMO GERAL

O Cádmiio (Cádmiio) é um elemento natural encontrado na crosta terrestre que geralmente está associado a outros metais, sendo usado na fabricação de baterias, em pigmentos para tintas e plásticos, em vários tipos de ligas e em revestimentos anticorrosivos. Mas devido aos impactos causados pela atividade humana, esse metal tem aumentado seus valores no ambiente aquático, prejudicando a reprodução de animais aquáticos, diminuindo assim a taxa de fertilização de organismos como peixe. Assim o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do cádmio em diferentes concentrações (controle fresco, controle (após 10 minutos de incubação); 0,5; 5; 10 µg/L de cádmio), pelo período de 10 minutos de incubação, através do uso das células espermáticas do modelo experimental da espécie Zebrafish, (*Danio rerio*). Diferentes dos experimentos tradicionais o presente estudo expôs o poluente diretamente nas células espermáticas (*in vitro*) de 10 animais, nas diferentes concentrações pelo período de 10 minutos, para análise das estruturas de integridade e fluidez de membrana plasmática, produção de espécies reativas de oxigênio, funcionalidade mitocondrial e índice de fragmentação de DNA através do método citometria de fluxo, e também análise de parâmetros espermáticos de: motilidade, tempo de motilidade, velocidade curvilínea, velocidade média de percurso e velocidade retilínea em µm/s, pelo sistema Computer-assisted sperm analysis (CASA). Nos parâmetros avaliados no sistema de citometria de fluxo foram obtidos resultados significativos nas concentrações de 5 e 10 µg/L de cádmio no índice de integridade da membrana plasmática e fragmentação de DNA quando comparados com o controle fresco, enquanto que no sistema de avaliação CASA os parâmetros de velocidade de trajeto, velocidade retilínea, velocidade curvilínea, tempo de motilidade, motilidade progressiva e total, diferiram em todas as concentrações com relação ao controle fresco. Os resultados mostraram que o cádmio afeta negativamente alguns parâmetros de reprodução em *D. rerio* nas condições deste experimento, podendo reduzir a taxa de fertilidade desses animais.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O Ambiente Aquático

Os ambientes aquáticos, marinhos e continentais abrigam uma gama de organismos animais e vegetais como, por exemplo, algas, bactérias, macrófitas, invertebrados e vertebrados (Esteves, 1998). No plano geográfico-ambiental, a água recobre dois terços da superfície de nosso planeta e circula permanentemente, através da evaporação, formação de nuvens, precipitação sob a forma de chuva, neve, etc., e alimenta os rios, lagos e mares. Seu ciclo desempenha importante papel na morfogênese da superfície do planeta, no condicionamento do clima, na manutenção da biosfera e na distribuição geográfica das espécies vegetais ou animais (Bastos e Carvalho, 2002).

Todas as formas de vida existentes na Terra dependem da água. Apesar da maior parte da superfície do nosso planeta ser recoberta por água, 97,3% desta água do mundo é água salgada, inadequada para beber e para a maioria dos usos agrícolas. Os lagos e rios são as principais fontes de água potável; porém, constituem menos de 0,01% do suprimento total de água (Azevedo, 1999; Baird, 2002).

O uso da água pode ser diferenciado em grandes categorias: uso social, contemplando, por exemplo, a alimentação, a higiene, a produção industrial, a geração de energia, irrigação, navegação, pesca e lazer, evacuação e diluição de esgotos, drenagem e controle de enchentes, combate a incêndios, entre outros. Essa diversidade de atividades faz com que a água seja o recurso natural intensamente utilizado pelo homem na atualidade e as conseqüências desses tipos de uso apresentam características muito diferenciadas no que diz respeito aos efeitos que produzem sobre os recursos hídricos de uma maneira geral (Andreoli e Carneiro, 2005).

Assim, a utilização racional dos recursos hídricos é imprescindível, levando em consideração que de toda água da Terra, somente cerca de 3% é água doce. Diante disso, a ecologia da conservação e da restauração dos corpos d'água tem uma função muito importante, visto que pesquisas nessas áreas podem ajudar o homem a utilizar a água de maneira racional, tornar viável o controle da qualidade desses ambientes e na recuperação dos ecossistemas aquáticos degradados (Likens, 2001; Tundisi, 2008).

1.2 A poluição do ambiente aquático

O ambiente aquático é um dos ecossistemas que mais sofre impactos causados pela ação antrópica, porque constitui o compartimento final de vários produtos gerados pela atividade humana, sendo assim um importante indicador de poluição (Arias, 2007). A vida ecológica desses ecossistemas acaba refletindo com facilidade os efeitos de várias atividades que ocorrem ao seu redor, ou seja, os ambientes aquáticos estão expostos aguda e cronicamente à agentes químicos, que podem atuar como poluentes, que por sua vez, prejudicam o desenvolvimento da biota. O comprometimento de processos fisiológicos vitais como respiração, reprodução e crescimento são exemplos das diversas perturbações metabólicas que os contaminantes ambientais podem causar aos organismos aquáticos (Stegeman *et al.*, 1994).

A formação de grandes aglomerados urbanos e industriais, com a crescente necessidade de água para o abastecimento, além de irrigação e lazer, faz com que quase

a totalidade das atividades humanas seja cada vez mais dependente da disponibilidade das águas continentais. Porém, grande parte dos efluentes domésticos e industriais é lançado diretamente nos corpos d'água, reduzindo cada vez mais a disponibilidade dos recursos hídricos (Esteves, 1998).

A degradação dos ecossistemas aquáticos continentais tornou-se uma preocupação mundial e tem levado pesquisadores e administradores de muitos países a buscar soluções de controle e preservação desses ecossistemas. Especificamente no Brasil, existe uma grande disponibilidade hídrica, com uma reserva de água doce de aproximadamente 12% do total mundial (MMA, 2003).

Entretanto existem órgãos que são responsáveis pela regulamentação de limites aceitáveis de efluentes para o meio ambiente, como o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que com a resolução nº 430, de 13 de maio de 2011, que dispõe sobre os parâmetros, condições, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de águas receptores, a qual alterou parcialmente e complementou a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de águas superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes.

1.3 Os Metais e a Poluição Aquática

A ação antrópica tem gerado uma grande variedade de substâncias que atuam diretamente sobre o meio ambiente, incluindo, por exemplo, herbicidas, pesticidas, detergentes, metais pesados e substâncias químicas de natureza diversa. A capacidade do homem de explorar e manipular metais proporcionou um importante marco no desenvolvimento de nossa sociedade (Wilson, 1996). Os metais possuem efeitos negativos quando liberados em elevadas concentrações no meio ambiente (Han *et al.*, 2002), sendo classificados como poluentes e causando impactos para a saúde humana (Duruibe *et al.*, 2007) e para ecossistemas aquáticos e terrestres (Sánchez, 2008).

Metais são contaminantes ambientais estáveis e persistentes uma vez que não podem ser degradados ou destruídos. Entre os elementos químicos conhecidos 53 são designados como metais, e destes apenas 17 são biodisponíveis e importantes para o ecossistema (Carranza-Álvarez, 2008). Embora os metais em geral, existam em baixas concentrações na crosta terrestre, sendo designados também como metais traço ou elementos traço (Baird, 1998), a intensa mineração destes elementos durante o século

XX aumentou significativamente suas concentrações no meio ambiente aquático (Callender, 2004).

Quando liberados nos corpos hídricos os metais primeiramente são adsorvidos por partículas orgânicas ou inorgânicas e são então incorporados ao sedimento pelo processo de sedimentação, resultando em níveis mais elevados de metais neste compartimento (Botté *et al.*, 2007). Assim, as concentrações de metais no sedimento são maiores do que na coluna d'água (Brekhovskikh *et al.*, 2002).

Os metais traço poluentes mais comuns enumerados pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) são: arsênio (As), cádmio (Cádmio), cromo (Cr), cobre (Cu), mercúrio (Hg), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zi) (Athar e Vohora, 2001), e suas principais fontes antropogênicas de contaminação são: a mineração, a eliminação de efluentes não tratados ou parcialmente tratados contendo metais tóxicos, quelatos metálicos de diferentes indústrias e o uso indiscriminado de fertilizantes e pesticidas contendo metal pesado em áreas agrícolas (Hatje *et al.*, 1998 , Ammann *et al.*, 2002;. Nouri *et al.*, 2008).

Alguns metais como o Cu, Fe (ferro), Mn (manganês), Ni e Zn são essenciais como micronutrientes para diversos processos vitais em animais e plantas, enquanto outros como Cádmio, Cr, Pb e Co (cobalto) não tem atividade fisiológica conhecida (Kar *et al.*, 2008; Suthar e Singh, 2008;. Aktar *et al.*, 2010), além de serem tóxicos em concentrações elevadas (Ghosh e Singh, 2005). Entre os metais pesados mais importantes está o Cádmio que se bioacumula no fitoplâncton e, em complexas teias alimentares que envolvem animais aquáticos, tais como moluscos, peixes e crustáceos (Cardoso e Chasin, 2001).

1.4 O Cádmio como poluente e seus mecanismos de toxicidade

O Cádmio (Cádmio) é um elemento natural encontrado na crosta terrestre e geralmente está associado a outros metais, como o zinco, o cobre e o chumbo (Cardoso e Chasin, 2001) é um elemento químico de número atômico 48 na classificação periódica dos elementos, sendo um metal não-essencial aos organismos conhecido como metal traço. Os metais traço são denominados tóxicos à grande maioria dos organismos podendo ocasionar, em concentrações subletais, danos em curto e longo prazos (Baird, 2002; Bouraoui *et al.*, 2007), como o efeito de biomagnificação na cadeia trófica e bioacumulação nos tecidos animais (Baird, 2002)

Pelo fato do Cádmio ser um poluente quando encontrado em elevadas concentrações devido principalmente a ação antrópica, os países estipularam concentrações seguras deste metal em recursos hídricos. No Brasil, por exemplo, a concentração máxima permitida em água doce da classe I, II e III (consumo, recreação, irrigação, proteção das comunidades aquáticas e aquicultura) é de 0,001 e 0,01 mg.L-1 de cádmio é de 10 µg/L (CONAMA, 2005), já em outros países é de 1 mg / L nos EUA (EPA, 2001) e 5 mg / L na Europa (CEE, 1983).

Peixes possuem a capacidade de bioacumular Cádmio principalmente nas brânquias e paredes intestinais, além de outros órgãos como fígado e rins (Cardoso e Chasin, 2001). Além disso, o Cádmio, ao passar pelas brânquias, é transportado para as células através de vias de transporte de Ca^{+2} (Sloman, 2007). Essa bioacumulação é possível, pois o peixe passa a expressar a proteína metalotioneína (MT), que se liga ao metal, inativando-o. Embora esta estratégia tenha sua eficiência limitada e dependente das concentrações do metal (De Conto Cinier *et al.*, 1998).

Este metal entra na corrente sanguínea, sendo absorvido pelo estômago ou intestino após a ingestão do alimento ou da água, sendo fortemente retido, podendo mesmo em baixas doses, constituir um nível fisiologicamente prejudicial ao organismo (Marettová *et al.*, 2010).

Uma vez absorvido, o cádmio é transportado pela corrente sanguínea até o fígado. Pequenas quantidades desse complexo proteína-cádmio passam continuamente do fígado para a corrente sanguínea, para ser transportado até os rins. O rim excreta de 1 a 2% do cádmio obtido diretamente das fontes ambientais. A concentração do metal nos rins é aproximadamente 10 mil vezes mais alta que a da corrente sanguínea (Burger, 2008). Em mamíferos, além do fígado, rim e pulmões, outros órgãos também são danificados por exposição ao cádmio, incluindo o sistema reprodutor, o sistema imunológico e o sistema nervoso (Jarup e Kesson, 2009).

A toxicidade do cádmio está relacionada com a sua capacidade de substituir o cálcio nas reações biológicas. Cádmio e cálcio são dois elementos intimamente relacionados, com similaridades em muitos aspectos, devido a sua semelhança nos raios iônicos. A captação celular de cádmio, ocorre principalmente através dos canais de Ca^{+2} , como resultados dessa captação ocorre o bloqueio ou inibição dos canais de Ca^{+2} (Beyersmann e Hechtenberg, 1997), pois este metal compete com íons essenciais à regulação das funções do organismo, principalmente os divalentes, como o Ca^{2+} , já que o elemento se torna biodisponível como cátion Cádmio²⁺ (Mc Geer *et al.*, 2000)

O cádmio também é capaz de causar um aumento no estresse oxidativo pela ligação a grupos sulfidrila de proteínas e pela diminuição da glutatona (Valko *et al.*, 2006). Conseqüentemente, o estresse oxidativo pode promover alteração nos mecanismos de reparo do DNA e indução da proliferação celular, que, por sua vez, pode levar a tumorigênese (Beyersmann e Hartwig, 2008). Além disso, o cádmio se liga preferivelmente a resíduos de cisteína de proteínas, em particular com a metalotioneína e também pode inibir diversas enzimas. A metalotioneína é uma proteína importante no transporte e armazenamento do cádmio e outros metais (WHO, 2008).

1.5 A Toxicidade Reprodutiva do Cádmio

A mortalidade de peixe tem sido evidenciada como como alto nível de poluição, entetsnto mesmo concetrações menores que não tenham como efeito imediato a morte tambe podem trzer prejuízos a uma população de peixes , com por exemplo a diminuição da fecundidade, que a longo prazo pode ocasionar a extinção da espécie afetada. Nos peixes teleósteos com fertilização externa, no momento em que ocorre a desova, os gametas são lançados no ambiente para que ocorra a fertilização, nesse instante, os gametas estão expostos a vários contaminantes presentes na água, entre eles, os metais pesados como mercúrio, zinco, chumbo, cobre e cádmio (Kime e Nash, 1999).

Os metais, incluindo o Cádmio, podem prejudicar a reprodução de animais aquáticos, afetando o sistema endócrino e agindo nos órgãos reprodutivos desses organismos. Como resultado desse distúrbio, o processo de desenvolvimento das gônadas é seriamente prejudicado juntamente com a taxa de fertilização (Rurangwa, 1998; Dietrich *et al.*, 2004).

Os mecanismos de toxicidade reprodutiva do Cádmio são relatados em estudos *in vivo* e *in vitro* que indicam o cádmio como um agente que diminui a concentração de testosterona em ratos (Monsefi *et al.*, 2009), afeta de maneira significativa o tecido testicular por perturbação da barreira hematotesticular em ratos (Chung, e Cheng, 2001), diminui a concentração e motilidade de espermática em peixe-arroz, *Oryziaslatipes* e zebrafish, *D. rerio* (Coward et al., 2002.), aumentar a peroxidação lipídica em carpa, *Cyprinus carpio* (De Conto Cinier *et al.*, 1998) e alterar a maturação espermática em estudos com robalo (Abascal et al., 2007).

Finalmente, os diversos mecanismos de toxicidade do Cádmio à reprodução são motivo de preocupação, uma vez que a reprodução é considerada uma das mais

relevantes funções biológicas, relacionadas com a estabilidade das populações a longo prazo. Nesse âmbito, as avaliações de qualidade espermática, poderão evidenciar distúrbios reprodutivos ocasionados pela poluição ambiental, ou seja, podendo ser utilizada como um biomarcador (Harayashiki *et al.*, 2013).

1.6 Motilidade, estruturas e estresse oxidativo em espermatozoide, como marcadores em estudos toxicológicos

A viabilidade espermática é fundamental para o sucesso reprodutivo e os danos ao espermatozoide tem sido aplicados como biomarcadores em estudos ecotoxicológicos, através das análises espermáticas, as quais são uma alternativa mais simples e rápida em relação aos testes com embriões (Anderson *et al.*, 1991; His *et al.*, 1999; Nipper, 2000; Losso *et al.*, 2007; Beiras e Bellas, 2008).

Os conceitos iniciais sobre a qualidade do esperma foram descrito pelos autores Alvarez *et al.*, 1987 e Aitken e Clarkson, 1987, os quais auxiliaram na compreensão da importância da qualidade dessa, bem como outras pesquisas que destacaram uma gama de propriedades dos espermatozoides indicando que são capazes de expressar marcadores visíveis de capacidade fertilizante (Cabrita *et al.*, 2014). A representação esquemática de possíveis variáveis relacionadas à capacidade fertilizante que podem servir como um indicador para estudos toxicológico encontra-se na Figura 1.

A morfologia espermática é semelhante nas diferentes espécies, sendo essas células alongadas, com uma peça intermediária variando em tamanho, e geralmente encontradas na parte posterior do núcleo (Billard *et al.*, 1995). O número de mitocôndrias varia entre as espécies (2 a 9 pares de mitocôndrias por espermatozoide), e se apresentam freqüentemente em forma de colar. Os espermatozoides de peixes apresentam um único flagelo, porém algumas espécies como *Ictalurus punctatus* e *Poecilia reticulata*, podem apresentar dois flagelos (Billard *et al.*, 1995; Cosson *et al.*, 1999). Esta característica está fortemente relacionada com a duração da motilidade (Yao *et al.*, 1999)

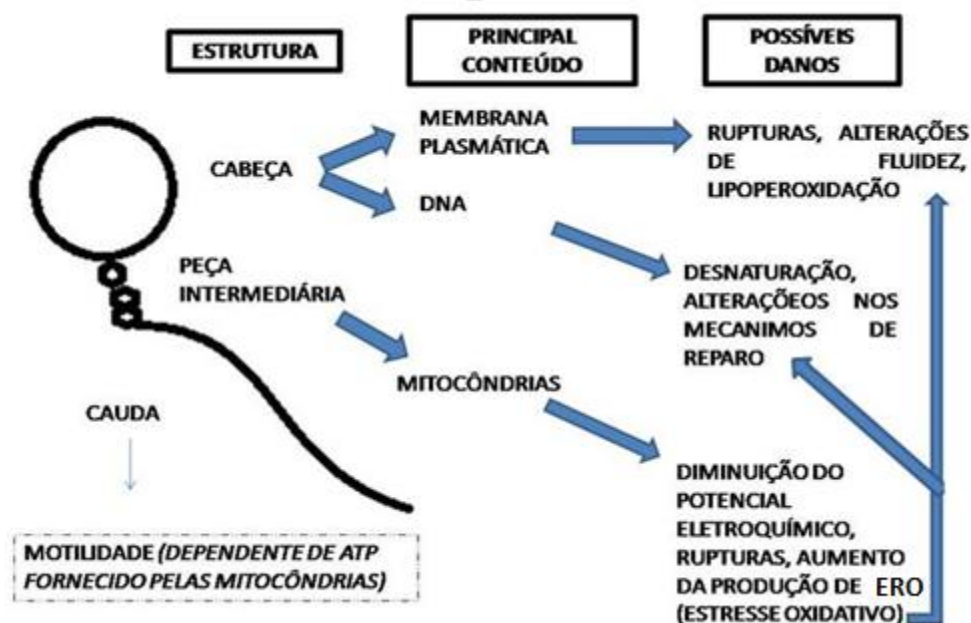


Figura 1 – Representação esquemática das principais estruturas e funções espermiáticas que podem ser afetadas por poluentes como o Cádmio.

No que diz respeito aos possíveis danos causados nas células espermiáticas, como por um poluente, a primeira análise realizada é sobre os parâmetros de motilidade, sendo o fator mais utilizado para avaliar a qualidade espermiática entre as espécies. É usualmente expressa pela porcentagem de espermatozoides móveis em sêmen adequadamente ativado, sendo sua duração também comumente avaliada. Essa análise espermiática informa a aptidão do organismo para a reprodução, pois sem motilidade o espermatozoide não encontrará o ócito para a fecundação. (Cosson, *et al.*, 1999). Essa função espermiática pode ser avaliada através de microscopia óptica de campo claro em lâmina sob lamínula (Sorensen, 1979), de modo subjetivo, ou de modo automatizado através do sistema de análise de sêmen assistida por computador (do inglês, CASA) que avalia motilidade total (MT), em porcentagem; velocidade de trajeto (VAP), em micrômetro por segundo; velocidade retilínea (VSL), em micrômetro por segundo; velocidade curvilínea (VCL), em micrômetro por segundo; amplitude lateral de cabeça (ALH), em micrômetro; frequência de batimentos (BCF), em Hz; e linearidade (LIN), em porcentagem (Burness *et al.*, 2004; Haugland *et al.*, 2009).

A membrana plasmática e as mitocôndrias devem permanecer intactas e funcionais para permitir a competência celular, sendo essenciais à proteção, ao funcionamento celular e ao processo de fertilização (Arruda e Celeghini, 2003). A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e é o componente mais externo.

Embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozoides e com sua natureza diferindo regionalmente (Flesh e Gadella, 2000; Khosro Beygi e Zarghami, 2007), é uma estrutura fina, flexível, autosselante e seletivamente permeável aos solutos polares, com espessura de apenas 7,5 a 10nm, formada quase que inteiramente por proteínas e lipídios (Guyton e Hall, 1997), sendo que proporções relativas desses componentes são distintas em diferentes tipos de membranas (Lehninger *et al.*, 2000).

A integridade da membrana plasmática é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem a capacitação espermática, ligação à zona pelúcida e fusão dos gametas (Papa *et al.*, 2000). Danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com posterior morte celular. Estudos *in vivo*, com a membrana plasmática do espermatozóide, afuncional torna-se incapaz de realizar a fertilização (Silva e Gadella, 2006).

As análises com a membrana plasmática são importantes porque, além de ser uma barreira determinante para o intercâmbio de moléculas entre o meio intra e extracelular, responde a estímulos físicos e químicos do ambiente e assim é fundamental para manutenção do metabolismo espermático (Meer *et al.*, 2008). As preparações empregando a combinação de sondas fluorescentes ou fluorocromos, avaliadas através de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, destacam-se como as mais estudadas e utilizadas na determinação da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides, gerando dados qualitativos sobre a permeabilidade relativa das membranas, conferindo especificidade na discriminação entre células funcionais e afuncionais (Martínez-Rodríguez, 2003). Essas sondas fluorescentes comumente utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática são o diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e SYBR-14 associadas ao iodeto de propídio, em combinação. O DCF é um éster não polar, não fluorescente e penetrante à membrana plasmática intacta, que sofre hidrólise por esterases inespecíficas no interior da célula e, a partir disto, é convertido em carboxifluoresceína, que fluoresce em verde e não atravessa à membrana plasmática íntegra (Silva e Gadella, 2006). Assim nos espermatozoides íntegros, o diacetato de carboxifluoresceína permeia a membrana plasmática dando a coloração verde ao gameta. O iodeto de propídio por possuir afinidade ao DNA cora de vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (Gillan, *et al.*, 2005; Rawe *et al.*, 2001).

A membrana plasmática também é avaliada através da sua fluidez, sendo determinada pela sonda fluorescente hidrofóbica, a merocianina 540 (2,7 mM) e

Hoechst 33342 (16,2 μM), onde as células são classificadas quanto à alta fluorescência (alta fluidez) e baixa fluorescência (baixa fluidez) (Fernández-Gago *et al.*, 2013).

As mitocôndrias são as principais organelas responsáveis pela produção de energia em forma de ATP para motilidade espermática, localizadas na peça intermediária do espermatozoide, liberam energia durante reações de oxidação na cadeia respiratória. Portanto, essa organela é necessária para a movimentação da cauda (ATP), pois mudanças na morfologia das mitocôndrias podem levar a consequências drásticas, impossibilitando seu funcionamento (Bereiter-Hahn e Voth, 1994; Rowland e Voeltz, 2012), refletida por exemplo, na alteração da motilidade espermática (Gravance, *et al.*, 2001). A função mitocondrial pode ser avaliada através de sondas como Rodamina 123, Mito Tracker Green FM e Mito Tracker Red que permitem verificar a qualidade do potencial de membrana das mitocôndrias em células vivas (Arruda *et al.*, 2003). A avaliação da funcionalidade mitocondrial feita através da sonda fluorescente rodamina 123, que cora as mitocôndrias e concentra-se naquelas com a funcionalidade alta (alto potencial eletroquímico) emitindo fluorescência verde mais intensa, sendo os espermatozoides classificados com elevada funcionalidade (fluorescência elevada, maior acúmulo de rodamina) e baixa funcionalidade quando a emissão da fluorescência tem intensidade fraca (fluorescência baixa, menor acúmulo de rodamina) (Gillan *et al.*, 2005).

Outra importante estrutura que pode servir como marcador de toxicidade no espermatozoide é o DNA, sendo este responsável pela transmissão da herança genética de todos os seres vivos, portanto qualquer dano que o DNA venha sofrer poderá acarretar em diversas anomalias, tanto para a célula, como para o ser vivo como um todo. Para avaliação estrutural da cromatina espermática é utilizado *acridine orange*, um corante que se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta apresenta-se íntegra; todavia quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA ou ao RNA, a *acridine* emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra (Arruda, *et al.*, 2003). Outras técnicas também são utilizadas para avaliar a estrutura do DNA espermático, como por exemplo métodos microscópicos que incluem o ensaio COMETA (Irvine *et al.*, 2000), a avaliação de TUNEL (Host *et al.*, 2000), e o teste ensaio de estrutura da cromatina espermática (SCSA) (Evenson *et al.*, 2002), os quais detectam danos no DNA.

Os espermatozoides possuem limitado volume de citoplasma, o que resulta em baixos níveis de um importante antioxidante intracelular, a glutatona reduzida. Assim

os espermatozoides são dependentes do apoio antioxidante do plasma seminal (Alvarez, *et al.*, 1987). Eles também possuem limitado sistema de ação enzimática antioxidante natural devido à impossibilidade de transcrever e/ou traduzir o material genético, pois o mesmo é fortemente enovelado. Além disso, os espermatozoides são suscetíveis a peroxidação lipídica porque os lipídios da membrana são ricos em ácidos graxos poliinsaturados (Baumber *et al.*, 2000). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas espontaneamente durante a respiração celular e interação com substâncias orgânicas, como também por sistema intracelular de enzimas, tal como a NADPH-oxidase (Aitken, 2004) e, em níveis fisiológicos, atuam como sinalizadores celulares, participando de processos de fusão espermatozoide-ocito, dentre outras funções. Contudo, quando as ERO superam a capacidade antioxidante da célula, esta entra em estresse oxidativo, o qual pode provocar danos ao DNA, proteínas e lipídios.

O estresse oxidativo pode ser ocasionado por contaminantes presentes no meio aquático. Segundo Thevenod, 2009 à nível celular o Cádmio induz estresse oxidativo em muitos organismos, o que pode resultar em danos fisiológicos a diferentes órgãos, entre eles os rins, fígado, pulmão, pâncreas, testículos, placenta, e osso (Nawrot *et al.*, 2008; Jarup e Kesson 2009). Por este motivo, além das análises de estrutura espermática descritas acima, a análise de concentração de ERO é um parâmetro importante a ser analisado, uma vez que pode ser o agente desencadeador de danos às estruturas espermáticas, como membranas, mitocôndrias e DNA que irão comprometer a funcionalidade espermática afetando variáveis como a motilidade. A utilização de sondas fluorescentes é uma técnica para quantificar o nível de ROS na célula. Os fluoróforos depois de incorporados na célula podem ser modificados por reação oxidativa através de emissores de fluorescência. A intensidade da fluorescência emitida é proporcional aos níveis de ROS, podendo ser quantificada por vários métodos, tais como a microscopia de fluorescência, citometria de fluxo ou espectrofotometria, sendo utilizado o reagente dihydroethidium (DHE) para quantificar o ânion superóxido (Hagedorn *et al.*, 2012).

Portanto, a análise de motilidade e de estruturas espermáticas e a medida de concentração de ROS como um marcador de efeitos toxicológicos tem sido validada por inúmeros trabalhos já realizados até o momento, e seus resultados são considerados de extrema importância para avaliação toxicológica de um ambiente (Anderson *et al.*, 1991; Macken *et al.*, 2009; Macova *et al.*, 2010; Coulaud *et al.*, 2011).

Estes estudos tornam-se cada vez mais promissores por serem uma alternativa mais simples e rápida em relação aos testes com embriões e com organismos propriamente ditos.

Os estudos com toxicologia tem usado as variáveis relacionadas a capacidade fertilizante espermática como marcador devido à capacidade destes testes de exibir resultados confiáveis no que diz respeito a degradação de tóxicos diretamente nas células espermáticas, pois a perturbação de estruturas espermáticas poderá gerar danos, causando prejuízos em futuras proles ou até mesmo a extinção de determinado organismo.

1.7 Zebrafish: um vertebrado destaque em estudos de toxicologia

Seres aquáticos são animais convenientes para a compreensão toxicologica de diversos contaminantes, uma vez que são afetados diretamente, pela captação da água, e indiretamente pela dieta, seja esta de vegetais, invertebrados e, dependendo da espécie, de peixes menores. Assim, os peixes podem refletir a contaminação de outros organismos e níveis tróficos em ecossistemas aquáticos, além de fazerem parte da dieta de mamíferos e aves aquáticas (Han *et al.*, 2009).

Recentemente tem sido utilizado em grande escala como modelo experimental a espécie Zebrafish, (*Danio rerio*) que apresenta características vantajosas para pesquisa como o seu tamanho diminuto (3-5 cm quando adultos), permitindo fácil manipulação, bem como a rápida absorção de substâncias que são adicionadas diretamente na água (Spence *et al.*, 2008). *Danio rerio* (Figura 1) é um peixe teleósteano de água doce tropical nativo da Índia. Ele tem sido amplamente utilizado para testes toxicológicos, farmacêuticos, terapêuticos e mutagênicos, além de estudos de desenvolvimento e envelhecimento. Este peixe, que anteriormente era criado apenas como ornamental, tem sido utilizado em diversos estudos, desde células tronco até as bases das mudanças comportamentais induzidas por vício em drogas. Essa rápida mudança se tornou possível devido a avanços em tecnologia, conjuntamente com uma caracterização detalhada do animal em nível genético e molecular (López-Olmeda e Sánchez-Vázquez, 2011).

Esta espécie possui vida média em torno de três anos, sua primeira maturação ocorre com 3 meses de vida e se reproduz na temperatura média de 18-26°C, por cerca

de 18 meses. A fêmea deste teleósteo pode desovar cerca de 100-200 ovos semanalmente (McGonnell e Fowkes, 2006).



Figura 1 – *Danio rerio*

Fonte: www.fishbase.se

O zebrafish também surgiu como um sistema bastante atraente para estudos com câncer em humanos, isso se deve a biologia do câncer na zebrafish ser muito semelhante ao câncer em seres humanos (Shive, 2013), ambos são histologicamente e geneticamente semelhantes (Chen *et al.*, 2014). Além disso, uma comparação das seqüências dos genomas do peixe-zebra e humanos, demonstra a conservação dos genes do ciclo celular, supressores de tumor, oncogenes (Etchin *et al.*, 2011).

Nesse contexto, esse animal tem sido considerado uma das alternativas atuais sobre o uso de espécies alternativas em saúde humana, bem com em pesquisas que envolvam impactos e desastres ecológicos (Perkins *et al.*, 2013).

1.8 A importância de experimento in vitro para estudos de Toxicologia

A utilização disseminada dos animais em pesquisas, tem sido motivo de diversas discussões, principalmente de caráter ético, em função do grande número de animais requerido e do sofrimento causado durante alguns tipos de experimento (White, 2001; Meyer, 2003). Por esta razão, a reavaliação da utilização de animais nos experimentos é tendência mundial, concretizada a partir da fundação de diversas instituições, que objetivam desenvolver e validar novos métodos, e da implementação regulatória de testes alternativos em diversos países, a fim de legalizar e harmonizar o uso dos mesmos. Muitas dessas mobilizações surgiram a partir do surgimento de um programa internacionalmente reconhecido denominado de 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement), que objetiva, além de diminuir o número de animais utilizados na

pesquisa, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (Russel, 2000; Schechtman, 2002).

Um das formas de minimizar ou diminuir o uso de animais são os estudos *in vitro*, que vem sendo utilizado com frequência, devido ao grande rigor nos laboratórios com o uso de animais. São estudos que permitem prever a toxicidade de uma substância em animais com a utilização de micro-organismos como bactérias, fungos; enzimas; proteínas; culturas celulares, entre outros (Rogerio *et al.*, 2003; Bednarczuk *et al.*, 2010).

Em ensaios *in vitro* é possível controlar o número das variáveis experimentais como o controle de pH, de temperatura, da pressão osmótica, tornando as condições fisiológicas relativamente constantes, fatores estes que não são encontrados nos testes com animais. Outra vantagem é com relação a sua execução, ser mais simples e mais rápida que testes *in vivo*, podendo substituir os animais ou, ao menos, servirem como um estudo precedente ao teste *in vivo* (Rogerio *et al.*, 2003; Rogerio *et al.*, 2000).

O interesse por métodos alternativos cresce dentro da comunidade científica na tentativa de diminuir o número de animais utilizados em experimentação e também reduzir o custo dos experimentos. Portanto, as análises com organelas espermáticas como marcadores, propostas como testes *in vitro* são um promissor ponto de partida para o desenvolvimento de testes de toxicidade, sendo cada vez mais adaptados às necessidades de ecotoxicologia ambiental. Futuras descobertas nesse campo ajudariam a aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos básicos que determinam os danos causados pelo cádmio, permitindo um maior conhecimento da sua toxicidade. Neste sentido este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do Cádmio sobre as células espermáticas de Zebrafish servindo como um antecessor a experimentos *in vivo*, através de análises como motilidade total, progressiva, parâmetros de velocidade espermática (VAP, VCL e VSL) tempo de motilidade, integridade e fluidez de membrana plasmática, produção de espécies reativas do oxigênio, funcionalidade de mitocôndria e índice de fragmentação de DNA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar os efeitos de diferentes concentrações de Cádmio sobre as células espermáticas de *Danio rerio in vitro*

2.2 Objetivos específicos

Determinar os danos causados pelo Cádmio em estruturas e parâmetros de motilidade e velocidade espermática de Zebrafish, *Danio rerio*, através das análises de:

- ✓ Integridade de membrana plasmática
- ✓ Funcionalidade de mitocôndria
- ✓ Fluidez de membrana plasmática
- ✓ Concentração de espécies reativas de oxigênio
- ✓ Índice de fragmentação de DNA
- ✓ Motilidade total e progressiva
- ✓ Tempo de motilidade
- ✓ Velocidade curvilínea
- ✓ Velocidade média do percurso
- ✓ Velocidade em linha reta

4. MANUSCRITO

Efeitos da exposição ao Cádmiio nas células
espermáticas de Zebrafish, *Danio Rerio*.

“Manuscrito a ser submetido para revista *Aquatic Toxicology*”

**EFFECTS OF EXPOSURE TO CADMIUM IN SPERM CELLS OF
ZEBRAFISH, *Danio Rerio***

Izani Bonel Acosta ^{a,b}, Antonio Sergio Varela Junior ^{a,c}, Estela Fernandes e Silva ^{a,b},
Tainã Figueiredo Cardoso ^{ab}, Jôsie Schwartz Caldas ^c, Rodrigo Desessards Jardim ^{a,b},
Carine Dahl Corcini ^{b,d*}

^a Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, Av. Italy 8 km, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil

^b Post-Graduate Program in Physiological Sciences - Comparative Animal Physiology, Av 8 km Italy, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

^c Post-Graduate Program in Aquatic Environments Continental Biology, Federal University of Rio Grande, Av. Italy 8.96203 to 900 km Rio Grande, RS, Brazil

^d Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, University Campus, PO Box 354, 96001-970 Pelotas, Brazil

E-mail address: izanibonel@hotmail.com (Izani Bonel Acosta); corcinicd@gmail.com (Carine Dahl Corcini)

Corresponding author: corcinicd@gmail.com (Carine Dahl Corcini)

ABSTRACT

Cadmium is a natural element found in the earth's crust, it is usually associated with other metals, but due to the impacts caused by human activity their concentration has increased in the aquatic environment. This metal may damage the aquatic animal reproduction, decreasing the rate of fertilization of organisms such as fish. Thus, this study aimed to evaluate the toxicity *in vitro* of Cadmium in different concentrations (control – 0; 0.5; 5; and 10µg/L of Cadmium) through the use of sperm cells of the experimental model Zebrafish, *Danio rerio*. Was analyzed structural parameters of

integrity and fluidity of plasma membrane, concentration of oxygen species, mitochondrial function and DNA fragmentation by flow cytometry method, as well as sperm movement parameters: motility, time of motility, curvilinear velocity, average path velocity and straight line velocity in $\mu\text{m/s}$, through on the computer assisted sperm analysis (CASA) system. In the evaluated parameters were obtained significant results in the path speed, straight speed, curvilinear velocity, motility time, progressive and total motility, integrity index of the plasma membrane and DNA. The results showed that cadmium can negatively affect some reproductive parameters in *D. rerio*, which may reduce fertility rates of these animals.

Keywords: cadmium, reproduction, *Danio rerio*, spermatozoa, motility.

1. INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is a major heavy metals present in the earth's crust and usually it is associated with other metals such as zinc, copper and lead. Cadmium is able to bioaccumulate in phytoplankton and complex food webs involving aquatic animals as molluscs, fish and crustaceans (Cardoso and Chasin, 2001). Because of its pollution power when in high concentrations, there are regulatory rules which stipulate safe concentrations of this metal in water resources. In Brazil, for example, the maximum concentration permitted by CONAMA in fresh water for classes I, II and III (consumption, recreation, irrigation, protection of aquatic and aquaculture communities) is 0.01 mg L^{-1} (10 g / L) (CONAMA, 2005). However, in other places like the US and Europe is 1 and 5 mg / L of cadmium respectively (EPA, 2001; EEC, 1983).

Cadmium's toxicity is related to its ability in replace calcium (Ca^{2+}) in biological reactions due to the fact that these elements have characteristics in common, having similar ionic radii, for example. Therefore, cellular uptake of Cd occurs mainly through Ca^{2+} channels, inhibiting the uptake of Ca^{2+} . So, the Cd acts as a potent blocker of these channels (McGeer et al., 2011), leading to deleterious effects due the necessity of Ca^{2+} in various cell signaling pathways (Marchetti, 2013).

Reproductive toxicity mechanisms of Cd are reported in *in vivo* and *in vitro*. This metal can lower testosterone levels in rats (Monsefi et al., 2009), affecting significantly the testicular tissue by change the hematotesticular barrier in rats (Chung, and Cheng, 2001), and reducing the concentration and sperm motility in Fish-rice, *Oryziaslatipes* and Zebrafish, *Danio rerio* (Coward et al., 2002), besides increase lipid

peroxidation in Carp, *Cyprinus carpio* (Tale Cinier et al., 1998) and change the sperm maturation in studies of Common snook, *Centropomus undecimalis* (Abascal et al., 2007).

Aquatic organisms are animals commonly used for toxicological understanding of various contaminants, since they are directly affected by contact with water, and indirectly through the diet, be it plant, invertebrate, and depending on the species of smaller fish (Bernardi et al., 2008). Thus, the fish may reflect contamination of other organisms and trophic levels in aquatic ecosystems, besides being an important part of mammalian diet and waterfowl (Han et al., 2009). The species of fish Zebrafish, *Danio rerio* has been used extensively as an experimental model for study to provide advantageous features such as its small size, allowing easy handling as well as rapid absorption of substances which are added directly into the water. (Spence et al., 2008).

The *D. rerio* is a kind of external fertilization as most teleost fish, ie the male and female gametes are released into the aquatic environment and they need to find to that fertilization occurs (Coward et al., 2002). Thus, even where the body has defenses to detoxification that can cause reproductive effects, the release of spermatozoa into the water exposes the gamete directly to pollutants such as cadmium. Moreover the spermatozoa have a poor antioxidant defense system, being highly prone to oxidative stress induced by pollutants (Valencia and War, 2007), besides not having metallothionein been identified in fish sperm cell that could aid in reducing the toxicity of Cd (Tale Cinier et al., 1998). Therefore, experiments to assess the direct exposure of spermatozoa to Cadmium mimicking more closely the reproductive biology of teleost fish that are in this situation in nature, is a form of environmentally relevant assessment. This study aimed to analyze the effect of different concentrations of cadmium in *Danio rerio* sperm cells on the in vitro parameters.

2. MATERIALS AND METHODS

The animals were euthanized by section of the spinal cord - accepted method, with restrictions, according the Federal Council of Veterinary Medicine (Resolution no. 05/2012 1000), since the use of anesthetics may affect the results the spermatic analysis. The methodology used in this research was approved in Ethics Committee in Federal

University of Pelotas/Rs - Brazil, under number 10016. The gonads was withdrawal of 10 male Zebrafish adults aged 4-6 months in reproductive phase through dissected by abdominal incision. The gonads were placed individually in type Eppendorf tubes containing 1.5 mol Beltsville Thawing Solution (BTS) (Varela et al., 2012), with pH 7.4 and osmolarity 350 mOsm, and sectioned to aid release of the spermatozoa. Sperm motility was assessed for motility rate and motility time for obtaining the parameter pre-treatment (only fresh semen diluted with BTS assessed before incubation period), by the activation using Milli Q water to check the sperm characteristic of each male and excludes non-motile samples (indicative of sperm death). Then, each male's semen was diluted at a 1: 1 (v / v) for each treatment with a final concentrations of 0 (control, only BTS), 0.5, 5.0 and 10 µg /L Cadmium.

The different concentrations of cadmium were established on the basis of the values accepted by Resolution 357 of CONAMA for fresh water of the type I, II and III (consumption, recreation, irrigation, protection of aquatic and aquaculture communities), which is 1 µg /L and 10 µg /L of cadmium. The samples were incubated at temperature 20 ° C for 10 minutes with the contaminant. The temperature was determined to be acceptable for survival of the studied species which lives at temperatures between 18 and 26 °C (Froese & Pauly, 2014), and also, the fact that higher temperatures, such as 22 and 25 ° C had deleterious effects on sperm survival in previous experiments, conducted by the research group (unpublished data).

After the incubation period was performed sperm analysis of total motility, progressive sperm velocity parameter - progressive velocity (VSL), track speed (VCL) and path velocity (VAP), motility of time, fluidity and integrity of the plasma membrane, production of reactive oxygen species, mitochondrial functionality and DNA fragmentation index

2.1 Assessment of sperm motility using computer-aided semen analysis (CASA)

To estimate the motility was added 1µl of diluted semen and 4µl of Milli-Q water Cadmium (at concentrations of 0.5, 5 and 10 µg /L cadmium) on slides under coverslips and analyzed by means of HOUSE.

The images generated are reproduced and analyzed efficiently and objectively through the Sperm Class Analyzer software - SCA, assessing the overall motility parameters, progressive motility, VSL), VCL and VAP in nm/s (Verstegen et al., 2002).

The motility of time, or duration of motility, since activation was evaluated by the total arrest the progressive movement of spermatozoa, following the method described by Sorensen Junior (1979).

2.2 Flow cytometry

We used the Cytometer Flow Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems). For detection of sperm population, non-sperm events were removed by FSC x SSC scatter plots (Petrunina et al, 2005; Piehler et al, 2005) and for the elimination of debris was used staining of the cells by Hoechst 33342 at concentration of 16.2 mM (Sigma-Aldrich Co. - St. Louis, MO, USA), except for DNA fragmentation index. A total of 10,000 events per sample sperm with a flow of 200 cells/s. The results were analyzed using the Cytometric Attune Software V2.1 program.

2.3 Integrity of the plasma membrane

For verification of the integrity of the plasma membrane, we used 20.0 mM of carboxyfluorescein diacetate (DCF), which fluoresces green and 7.3 uM propidium iodide (PI), which fluoresces red (Sigma-Aldrich Co. - St. Louis, MO, USA). The sperm were classified as non-injured (DCF + / IP-) and injured (DCF + / IP +; DCF- / IP +; DCF- / IP-) (Gillan et al, 2005; Fernandez-Gago et al, 2013).

2.4 Fluidity of the plasma membrane

This parameter was checked by hydrophobic merocyanine 540 dye (M540) at a final concentration of 2.7 uM (Sigma-Aldrich Co. - St. Louis, MO, USA) and YO-PRO fluoresces green as the final concentration of 0.1 uM (Invitrogen - Eugene, OR, USA). Only live sperm (YO-PRO negative) were selected and classified into high fluidity cells (M540 high concentration) and low fluidity (low concentration M540) (Fernandez-Gago et al., 2013).

2.5 Mitochondrial functionality

Was used fluorescent dyes Rhodamine 123 (13 uM) which fluoresces green and PI (7.3 uM)(Sigma-Aldrich Co. - St. Louis, MO, USA). Only intact sperm (IP-) were selected and classified into cells with high functionality (high fluorescence, high

accumulation of Rhodamine) and low functionality (low fluorescence, low accumulation of Rhodamine) (GILLAN al., 2005).

2.6 DNA fragmentation index

DNA fragmentation was measured by the integrity of sperm chromatin structure assay (SCSA). For this evaluation, was added in 10 μ L of semen , 5 μ L TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, and pH 7.2) after 30 seconds, 10 μ L of Triton (Triton X-100 0 , 1%) (v / v) and finally, after 30 seconds, 5 μ L acridine orange (Sigma-Aldrich Co. - St. Louis, MO, USA). This solution was incubated for 5 minutes. Results from flow cytometry were expressed as percentage of sperm with fragmented DNA (Everson et al., 1994).

2.7 Concentration of reactive oxygen species (ROS)

For this evaluation was used the fluorescent dye 2',7-dichlorofluorescein diacetate at a final concentration of 1.0 μ M, which emits green fluorescence when oxidized by intracellular ROS and IP (7.3 μ M final concentration). We used the median intensity of green fluorescence only the living sperm (IP-) (Domínguez-Rebolledo et al., 2011).

2.8 Statistical Analysis

In this work, the descriptive data (mean and mean standard error) were generated of each of the dependent variables: Total sperm motility, progressive sperm velocity (VCL, VAP and VSL), mitochondrial functionality, reactive oxygen species, Integrity of the plasma membrane, DNA fragmentation index and Fluidity of the plasma membrane.

For all these dependent variables was performed to normal analysis by the Shapiro-Wilk test. After was conducted Kruskal Wallis test for nonparametric data, because none of the variables had normal. Was used the Statistix® 2009 software.

3. RESULTS

Total and progressive motility, and motility time showed similar pattern, where all the different cadmium concentrations differed from the control fresh and the control after the incubation ($P < 0.01$) (Table 1).

Table 1: Progressive motility (PM), total motility (TM) and time of motility (Temot), analyzed by CASA of sperm *D. rerio* exposed to Betsville Thawing Solution (BTS) with 0; 0.5; 5.0 to 10 $\mu\text{g/L}$ Cadmium at 20 °C for 10 minutes.

	Fresh semen	10 minute incubation at 20 ° C			
		0 (only BTS)	0,5	5,0	10
PM (%)	46.0 $\pm 3.63^A$	37.7 $\pm 2.95^A$	26.3 $\pm 3.1^B$	27.1 $\pm 2.86^B$	25.2 $\pm 3.56^B$
TM (%)	53.9 \pm 3.6 ^A	52.3 $\pm 2.5^A$	33.9 $\pm 3.3^B$	33.8 $\pm 3.07^B$	34.6 $\pm 3.6^B$
TeMot (s)	133.3 $\pm 11.5^A$	103.2 $\pm 13.1^A$	77.5 \pm 16.48 ^B	68.7 $\pm 8.45^B$	71.2 $\pm 13.3^B$

Data are expressed as mean and standard error of the mean. Different letters in the same line mean statistical difference by the nonparametric Kruskal-Wallis test with 0.01 significance level.

The VAP and VCL variables although not show differences between the different treatments of Cadmium ($P > 0.01$), differ regarding control and fresh semen ($P < 0.01$) (Figure 1). For the VSL parameter different cadmium concentrations did not differ and control. However, all concentrations differed in relation to fresh semen (Figure 1).

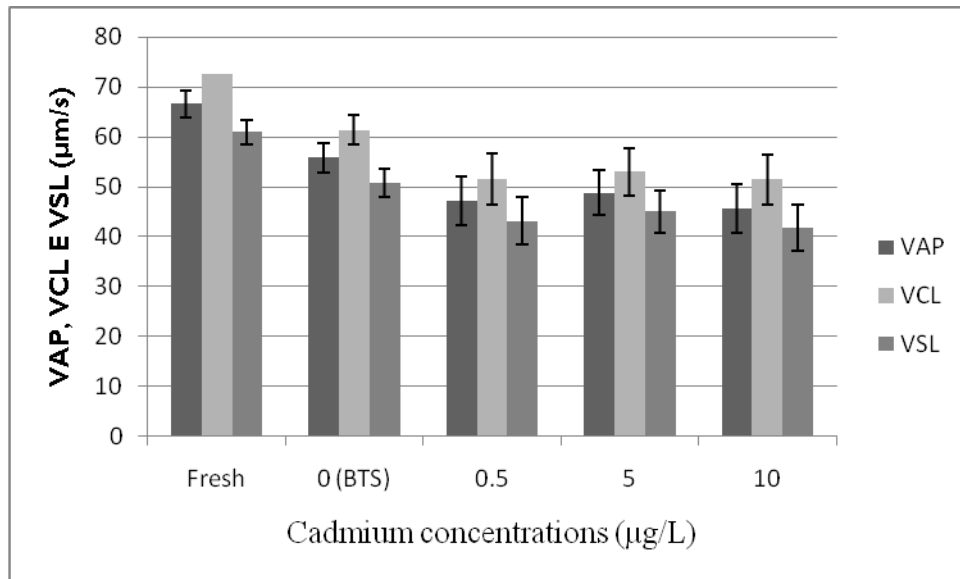


Figure 1 - Track speed (VCL), path velocity (VAP), progressive velocity (VSL) in µm/s sperm cells of *D. rerio*: Gamete exposed to Betsville Thawing Solution (BTS) with 0; 0.5; 5;10 µg/L Cadmium at 20 ° C for 10 minutes. Data are expressed as mean and standard error of the mean. Different letters indicate statistical difference by the nonparametric Kruskal-Wallis with 0:01 significance level.

For DNA fragmentation index and plasma membrane integrity (MP) the concentrations of 5.0 and 10 µg/L Cadmium was differed from the control ($P < 0.05$). Regarding the functionality of the mitochondria (MI) there was no significant difference between over treatment and the control. For the fluidity of plasma membrane (FLU) the Cadmium concentrations were not different between all treatments and the control. The concentration of ROS, in treatments containing cadmium were observed a slight reduction compared to the control, although this difference was not statistically verified (Table 2).

Table 2: Spermatozoa of *D. rerio* exposed to Betsville Thawing Solution (BTS) (control); 0.5; 5;10 µg/L Cadmium at 20 °C for 10 minutes, evaluated for fluidity of the plasma membrane (FLU), integrity of the plasma membrane (IME), mitochondrial functionality (FMI), DNA fragmentation index (DNA) and production of reactive species oxygen (ROS) (n = 10). * ROS expression by the median fluorescence intensity

[Cd ⁺²]	DNA	IME (%)	FMI (%)	FLU (%)	ROS
0 (BTS)	7.27 ±	83.40 ± 8.5 ^A	74.87 ± 8.3 ^A	81.60 ± 3.1 ^A	3428.8 ±

	1.0 ^A				886.2 ^A
0.5	9.53 ±	73.93 ±	69.04 ± 6.1 ^A	78.54 ± 3.7 ^A	2584.3 ±
	1.2 ^A	8.7 ^{AB}			654.5 ^A
5	13.72 ±	47.85 ± 9.0 ^B	65.82 ± 5.2 ^A	77.39 ± 4.3 ^A	2145.0 ±
	3.0 ^B				356.9 ^A
10	14.29	41.52 ±	64.47 ± 5.8 ^A	77.11 ± 3.3 ^A	2279.5 ±
	±3.3 ^B	10.1 ^B			428.2 ^A

Data are expressed as mean and standard error of the mean. Different letters in the same column mean statistical difference by the nonparametric Kruskal-Wallis test with 0.05 significance level.

4. DISCUSSION

If we consider the exposure for 10 minutes at a controlled temperature, total and progressive motility assessments as well as for the time of motility to the different Cadmio concentrations tested did not differ between each one, but all concentrations differ from the fresh control and control with BTS (after incubation). The lack of difference between the fresh semen and control with BTS (after incubation) shows that the diluent medium did not affect semen quality, only the addition of cadmium, regardless of the concentration used.

The other spermatozoa movement variables, VCL and VAP were negatively affected in the presence of cadmium concentration. There was a decline for these variables between the control (after incubation) and the fresh semen, however the VSL variable the difference in concentrations occurred only when compared with fresh control. A similar result was found by Dietrich et al., (2010) for the VAP with rainbow trout at low concentrations of cadmium (up to 10 µg/L of cadmium). According to the review of Browne et al., (2015) the speed sperm to external fertilization fish is essential for longevity because high-speed sperm will enable rapid location of oocytes in open water before the end of his motility time .

These data corroborate with what occurred in sperm rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, which with doses in excess of 1 µg/L of Cd⁺² had significant results (Grzegorz et al., 2010), being able to interfere in motility, demonstrating the

increased susceptibility to environmental stressors in these speed parameters with respect to motility. Furthermore, VAP and VCL parameters, the same as in this study had a significant decline, in sperm *A. Crassispina* showed a strong correlation (0.928 and 0.902, respectively) with fertilization rates (Au et al., 2001), thus this parameter can be useful in predicting reproductive harm.

In addition to the automated analysis CASA this study presents the analysis by flow cytometry hitherto little explored in reproductive toxicology studies in different sperm structures, which are fundamental to the maintenance and viability of sperm fertilizing capacity. So for analysis of the plasma membrane integrity and DNA fragmentation index, we can see a decline in relation to the control, of mode dependent dose. However, such a decrease dose dependent was not statistically checked for mitochondrial functionality and plasma membrane fluidity, possibly because the semen sample is a biological sample that has a great variability, and which is hardly presents normal distribution in several experiments that evaluate sperm quality (Hernandez et al, 2007; Satorre et al, 2012; Silva et al 2012).

Regarding the integrity of the plasma membrane, the concentrations 5 and 10 mg/L of cadmium showed a significant decrease compared to the control. This information can be critical for clarify how occur the injury of the fertilizing capacity of teleost fish (Hi and Woods, 2004). It is possible that the plasma membrane of sperm, due to being the first barrier is more sensitive to different types of pollutants, such as shown by Harayashiki et al., (2013) and Lopes et al., (2014), in the *Poecilia vivipara* and *D. rerio* sperm, respectively, where the animals were subjected to different glyphosate concentrations, and also suffered decline in the integrity of membrane integrity. The significant loss of membrane integrity is important because this organelle keeps the selective permeability of the spermatozoa, supporting metabolism. The membrane may be impaired due to the anionic character of this structure (Ercal et al., 2001), causing the cadmium interact intensely, causing breakages, since the blockade of calcium channels by cadmium, can cause by cell death due to low cytosolic calcium. Similar results were found with *Sinopotamon henanense* by DanDan et al. (2013) in which the sperm cells exposed to cadmium also showed lesions in the plasma membrane at concentrations above 7.5 mg / L

Urchin sea sperm (*Anthocardaris crassispina*) exposed to cadmium presented a deformation of mitochondrial crest (Au et al., 2001), corroborating the present study that, although, without providing statistical difference was observed a decrease in

mitochondrial functionality, this cadmium action is important because mitochondrial injuries can cause risks to fertilizer capacity due to the need for such structures for the production of ATP, accountable for provides power for sperm motility (Gravance, et al., 2010).

A significant increase in DNA fragmentation of sperm cell when exposed to cadmium at concentrations above 5 µg/L was observed. The DNA integrity, maintaining the genetic code to be transmitted to the strain is of paramount importance, decreasing the chance of mutations or deaths in hatching stage in fish (Santos et al., 2013). It is suggested that in this way as the plasma membrane was damaged, the DNA layer was exposed to the effects of cadmium.

Percentage of cells with low membrane fluidity and concentration of reactive oxygen species did not differ among the different concentrations of cadmium and also compared to the control. According Ercal et al. (2001), the anionic nature of biological membranes is a facilitator for cadmium injury, because it penetrates directly into the cell via calcium channels, thereby not interfering with the pollutant mosaic composition that is fluid, and thus does not meddle with the membrane fluidity of the as shown in the present study.

The concentration of ROS showed no difference between treatments, probably because they do not alter the mitochondrial chain, because when there is an excess of calcium in the cytosol of the cell, due to the cadmium input, occurs inhibition of mitochondrial function, and so there is no production of hydroxyl, suggesting that the species under study may be more complex compared with different species, and yet we did not find similar data conditions the present study. Unlike the results of this study, Dandan et al., (2013) observed increased oxidative stress in sperm crab (*Sinopotamon henanense*) directly exposing to concentration of 7.7 mg /L of cadmium for a period of up to 7 days. Another possibility to explain the not increase concentration of ROS would be due to the fast exposure time.

5. CONCLUSION

The experiment in vitro conditions with semen *D. rerio* demonstrate that even Cadmium concentrations allowed by CONAMA, have harmful effects sperm cells.

Acknowledgements

Financial support is acknowledged to ‘Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior’ (CAPES, Programa Ciências do Mar, Brasília, DF, Brazil) and Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil).

6. REFERENCES

Abascal, F.J., Cosson, J., Fauvel, C. 2007. Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *J. Fish. Biol.* 70, 509-522. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01322.x>

Au, D.W.T., Reunovb, A.A., Wua, R.S.S. 2001. Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development., *Environmental Pollution*. 111, 11–20. [http://dx.doi: 10.1016 / S0269-7491 \(00\) 00036-1](http://dx.doi: 10.1016 / S0269-7491 (00) 00036-1)

Bernardi, M.M., Moraes, R.C., Varoli, F.M.F., Osti, S.C. 2008. *Ecotoxicologia*. In: Spinosa, H.S., Gómiak, S.L., Palermo-neto, J. *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. São Paulo: Manole, 942 p.

Browne, R.K., Kaurova, S.A., Uteshev, V.K., Shishova, N.V., McGinnity, D., Figiel, C.R., Mansour, N., Agnew, D., Wu, M., Gakhova, P.T., Dzyuba, B., Cosson, J. 2015. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*. 83, 1–13. <http://dx. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.09.018>

Cardoso, L.M.N., Chasin, A.A.M, 2001. *Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos*. Série Cadernos de Referência Ambiental. Vol. 6.

Chung, N., Cheng, Y. 2001. Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology*. 142: 1878-88. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.142.5.8145>

Chyb, J., Kime, D.E., Szczerbik, P., Mikołajczyk, T., Epler, P. 2001. Computer-assisted analysis (CASA) of common carp *Cyprinus carpio* L. spermatozoa motility in the presence of cadmium. *Arch. Pol. Fish.* 9, 173–181.

CONAMA nº. 357. 2005. *Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e outras providências*. Brasília.

Coward, K., Bromage, N.R., Hibitt, O. 2002. Parrington, J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.12, p.33-58.

Dandan, M., Yuhua, H., Lijun, D., Li, N., Xuan, R., Wang, F., Jing, W., Wang, Lan. 2013. Oxidative damages and ultrastructural changes in the sperm of freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 98, 244-249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.08.004>

De Conto Cinier, C.; Petit-Ramel, R., Faure, R., Bortolato, M., 1998. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 793-799. <http://dx.doi.org/10.1007/s001289900830/> Springer-Verlag. 1998-12-01

Dietrich, M.A., Żmijewski, D., Karol, H., Hejmej, A., Bilińska, B., Jurecka, P., Irnazarow, I., Słowińska, M., Hliwa, P., Ciereszko, A., 2010. Isolation and characterization of transferrin from common carp (*Cyprinus carpio* L) seminal plasma. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 66–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.015>.

Domínguez-Rebolledo, AE., Martínez-Pastor, F., Bisbal, A.F., Ros-Santaella, JL., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, AJ., Garde, JJ., Fernández-Santos MR. 2011. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reprod Domest Anim.* 46, 393–403. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01677.x>.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529–539. <http://dx.doi.org/10.2174/1568-0260.13394831>.

Evenson, D.P., Thompson, L., Jost, L. 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology.* 41, 637–51. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90174-h](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x(94)90174-h)

Fernández-Gago, R., Domínguez, J.C., Martínez-Pastor, F. 2013. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology.* 80, 400-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.003>

Froese, R., Pauly, D. Editors. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (11/2014). www.fishbase.org, versão (11/2014).

Garcia-Santos, S., Monteiro, S., Malakpour-Kolbadinezhad, S., Fontainhas-Fernandes, A., Wilson, J. 2015. Effects of Cádmiio injection on osmoregulation and stress indicators in freshwater Nile tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology*

Parte C: Toxicologia e Farmacologia. 167, 81-89. <http://dx.doi: 10.1016/j.cbpc.2014.09.002>

Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 63, 445–457. [http://dx. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.024](http://dx.doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.024)

Graham, J. K. 2001. Assessment of sperm quality. *AAEP Proceedings*. 47, 302-305.

Han, S., Fan, Y., Xu, X., Qin, J, Wu, B., Wang, X., Aglioti, SM., Mao, L. 2009. Empathic neural responses to others' pain are modulated by emotional contexts. *Human Brain Mapping*. 30, 3227-3237. <http://dx.doi: 10.1002 / hbm.20742>.

Harayashiki, C. A. Y., Junior, A. S. V., Machado, A. A. S., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Bianchini, A., Corcini, C. D., 2013, Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water, *Aquatic Toxicology*. 142-143, 176– 184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.006>

He, S., Woods, C. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*. 48, 254–262. <http://dx.doi:10.1016/j.cryobiol.2004.01.009>

Hernández, M., Roca, J., Gil, M.A., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. 2007. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability *Theriogenology*. 67, 1436–1445. <http://dx. doi: 10.1016 / j.theriogenology.2007.02.012>

Kar, D., Sur, P., Mandal, S.K., Saha, T., Kole, R.K. 2008. Assessment of heavy metal pollution in surface water. *Int. J. Environ. Sci. Tech*. 5, 119-124.

Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 130, 425–433. [http://dx. doi: 10.1016 / s1532-0456 \(01\) 00270-8](http://dx. doi: 10.1016 / s1532-0456 (01) 00270-8)

Lopes, F.M., Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Silva, A.C., Guazzelli, V.G., Tavares, G., Rosa, C.E. 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio* *Aquatic Toxicology*. 155, 322–326. <http://dx.doi: org/10.1016/j.aquatox.2014.07.006>

Marchetti, C. 2013. Role of calcium channels in heavy metal toxicity *ISRN Toxicol*. 184.369. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/184360>

McGeer, J.C., Niyogi, S., Smith, D.S. 2011. Cadmium. *Fish Physiology*. 31 125-184. [http://dx.doi:10.1016/S1546-5098\(11\)31025-4](http://dx.doi:10.1016/S1546-5098(11)31025-4)

Monsefi, M., Alaei, S., Moradshahi, A., Rohani, L. 2009. Cadmium induced male infertility in male mice. *Environ Toxicol*. 25, 94-102. <http://dx.doi:10.1002/tox.20468>.

Petrunkina, A.M., Volker, G., Weitze, K.F., Beyerbach, M., Töpfen-Petersen, E., Waberski, D. 2005. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology*. 63, 2278-2299. <http://dx.doi:10.1016/j.theriogenology.2004.10.008>

Piehler, E., Petrunkina, A.M., Ekhlesi-Hundrieser, M., Töpfer-Petersen, E. 2006. Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation in vitro. *Cytomet*. 69, 1062–70. <http://dx.doi:10.1002/cyto.a.20338>

Sánchez, M.L. 2008. *Causes and Effects of Heavy Metal Pollution*. Nova Science Publishers, Hauppauge, p. 392.

Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Porcher, J.M., Bony, S., Sanchez, W. 2013. Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback *Reprod. Toxicol*. 36, 6–11. <http://dx.doi:10.1016/j.reprotox.2012.11.004>.

Satorre, M.M., Breininger, E., Beconi, M.T. 2012. Cryopreservation with α -tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm *Theriogenology*. 78, 1548–1556.

Shi, L., Macinko, J., Starfield, B., Politzer, R., Wulu, J., Xu, J. 2005. Primary Care, Social Inequalities, and All-Cause, Heart Disease, and Cancer Mortality in U.S. Counties: A Comparison of Urban and Rural Areas. *Public Health*. 119, 699–710. <http://dx.doi:10.1016/j.theriogenology.2012.06.023>

Silva, E.C.B., Cajueiro, J.F.P., Silva, S.V., Vidal, A.H., Soares, P.C., Guerra, M.M.P. 2012. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide *Animal Reproduction Science*. 132, 155–158. <http://dx.doi:10.1016/j.anireprosci.2012.05.014>

Sishuo, C., Wentao, X., Nan, Z., Yan, W., YunBo, L., Xiaoyun, H., Kunlun, H. 2012. A Mitochondria-Dependent Pathway Mediates the Apoptosis of GSE-Induced Yeast *PLoS One*. 7 (3), e32943. <http://dx.doi:10.1371/journal.pone.0032943>.

Sorensen, A.M. 1979 A laboratory for animal reproduction. Massachusetts: American Press. 4^a ed.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 83, 13–34. [http://dx. doi: 10.1111 /j.1469-185x.2007.00030.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x)

Valença, R.M.B., Guerra, M.M.P. 2007. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte. 31, 47-53.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter*. 160, 1-40. [http://dx. doi: 10.1016 / j.cbi.2005.12.009](http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009)

Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Gheller, S.M.M., Jardim, R.D., Lucia Jr., T., Streit Jr., D.P., Figueiredo, M.R.C., 2012. Use of amides as cryoprotectants in extend-ers for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomu*. *Theriogenology* .78, 244–251. [http://dx. doi: 10.1016 / j.theriogenology.2012.02.029](http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.029)

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Oclin, K. 2002. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57, 149-179. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1)

DISCUSSÃO GERAL

O vertiginoso crescimento agrícola e industrial gera o aumento da poluição de diversos ecossistemas incluindo os aquáticos. O Cádmio é um dos poluentes que tem aumentado suas concentrações em ambientes aquáticos, sendo este um evento crítico devido a seus mecanismos de toxicidade, como a capacidade de bloquear canais de Cálcio e gerar estresse oxidativo.

Um importante fator a ser investigado quando se considera a poluição por Cádmio é a reprodução que pode ser afetada de diversas maneiras, como por exemplo, através da perturbação da maturação espermiática, diminuição de concentração e motilidade. Nesse contexto, os espermatozoides, especialmente de peixes teleósteos, são vulneráveis a ação deste metal, pois uma vez ejaculados na água, devido à fecundação externa, entram em contato direto com poluentes como o Cádmio. Nesse contexto, a avaliação direta do espermatozoide no que se refere a parâmetros de capacidade fertilizante, como motilidade e integridade de organelas como as mitocôndrias, mostra-se uma alternativa atraente para avaliar efeitos tóxicos do Cádmio sobre a reprodução de espécies aquáticas.

Embora as concentrações avaliadas no presente estudo (0,5; 5 e 10 µg/L Cádmio) estejam dentro dos limites permitidos pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) para as classes I, II e III (consumo, recreação, irrigação, proteção das comunidades aquáticas e aquicultura) nossos resultados demonstraram que esses limites permitidos pelo CONAMA causam danos na velocidade espermiática, que poderão prejudicar as taxas de fertilização, pois se o espermatozoide apresentar redução na velocidade da sua locomoção, o mesmo não chegará ao ovócito, impedindo a fertilização. Além disso, a concentração de 5 e 10µg/L demonstrou diminuição da integridade de membrana que também poderá comprometer a capacidade fertilizante em função da perda da permeabilidade seletiva exercida por esta estrutura. Assim sendo, nas condições do presente estudo foi possível verificar a viabilidade da utilização das avaliações *in vitro*, pois através destas obteve-se dados relevantes com relação à toxicidade do Cádmio, que poderão ser verificados para outros poluentes.

REFERÊNCIAS GERAIS

Abascal, F.J., Cosson, J., Fauvel, C. 2007. Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *J. Fish. Biol.* 70, 509-522.

Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC). 1993. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins*, Lyon, IARC Press. pp. 245–395.

Aitken, R.J., Baker, M.A. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Develop.* 16, 581-588.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of ROS by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81, 459–469.

Aktar, M.W., Paramasivam, M., Ganguly, M., Purkait, S., Sengupta, D. 2010. Assessment and occurrence of various heavy metals in surface water of Ganga river around Kolkata: a study for toxicity and ecological impact. *Environ. Monitor Assess.* 160, 207-213.

Alvarez, J.G., Touchstone, C., Blasco, L., Storey, B.T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J. Androl.* 8, 338–348.

Ammann, A.A., Michalke, B., Schramel, P. 2002. Speciation of heavy metals in environmental water by ion chromatography coupled to ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 448-452.

Anderson, B.S., Middaugh, D.P., Hunt, J.W., Turpen, S.L. 1991. Copper toxicity to sperm, embryos and larvae of topmelt *Atherinops affinis*, with notes on induced spawning. *Marine Environm. Res.* 31, 17- 35.

Andreoli, C.V., Carneiro, C. 2005. *Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados*. Curitiba: SANEPAR.

Arias, A.R.L., Buss, D.F., Albuquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciênc. saúde coletiva [online]* 12, 61-72.

Arruda, R.P., Celeguini, E.C.C. 2003. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. *Acta. Scient. Veter.* 31, 230-231.

Azevedo, E.B. 1999. Poluição vs. Tratamento de água: duas faces de uma mesma moeda. *Quím. Nova na Escola.* 10, 21-25.

Baird, C. 2002. *Química Ambiental.* Porto Alegre. 2ª ed. Cap. 7, p 430.

Baird, C. 1998. *Environmental chemistry.* New York: Freeman and Company. 698p.

Bastos, A.R.R. Carvalho, J.G. 2002. *Manejo do Solo e Adubação para Plantas Ornamentais.* Lavras. Ed. UFLA. 147 p.

Baumber, J.; Ball, B.A.; Linfor, J.J. 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am. Jour. Veter. Res.* 66, 772-779.

Bednarczuk, V.O., Verdam, M.C.S, Miguel, M.D., Miguel, O. G. 2010. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica, Curitiba,* vol. 11, 2.

Beiras, R., Bellas, J. 2008. Inhibition of embryo development of the *Mytilus galloprovincialis* marine mussel by organic pollutants; assessment of its extensive culture in the Galician Rias. *Aquaculture.* 27, 208–212.

Benoff, S., Centola, G., Millan, C, Napolitano, B., Maumar, J., Hurley I. 2003. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum. Reprod.* 18, 374-83.

Bereiter-Hahn, J., Voth, M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198–219.

Beyersmann, D., Hartwig, A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82, 493-512.

Beyersmann, D., Hechtenberg, S. 1997. Cadmium, gene regulation and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 247–261.

Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M. 1995. Sperm physiology and quality in: broodstock management and Egg and larval quality. Eds. Bromage, N. R. and Roberts, Eds Blackwell Science. 424, 25-52.

Botté, S.E., Hugo, F.R., Marcovecchio, J.E. 2007. Dissolved Heavy Metal (Cádmio, Pb, Cr, Ni) Concentrations in Surface Water and Porewater from Bahia Blanca Estuary Tidal Flats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 415–421.

Bouraoui, Z., M. Banni, M., J. Ghedira, J., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F., Boussetta, H. 2008. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata* Fish Physiology and Biochemistry. 34, 201-207.

Brekhovskikh, V.F., Volkova, Z.V., Katunin, D.N., Kazmiruk, V.D., Kazmiruk, T.N., Ostrovskaya, E.V. 2002. Heavy Metals in Bottom Sediment in the Upper and Lower Volga. *Water Resources.* 29, 539–547.

Burger, J. 2008 Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci.Total. Environment.* 389, 37-45.

Burness, G., Casselman, S.J., Schulte-Hostedde, A.I., Moyes, C.D. 2004. Montgomerie, R. Sperm swimming speed and energetic vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecol. Sociobiol.* 56, 65– 70.

Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Sarasquete, C., Herráez, M.P., Robles, V. 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for spermanalysis, *Aquaculture.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>

Callender, E. 2004. Heavy metals in the environment- historical trends. In: Lollar, BS. *Treatise on geochemistry- Environmental Geochemistry.* Spain: Elsevier. Pergamon. 9, 67-105.

Cardoso, L.M.N., Chasin, A.A.M. 2001. Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. *Série Cadernos de Referência Ambiental.* Vol. 6, 121.

Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A.J., Alfaro-de La Torre, M.C., García-de La Cruz, R.F. 2008. Accumulation and Distribution of Heavy Metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an Artificial Lagoon in San Luis Potosí, México. *Water Air Soil Pollut.* 188, 297–309.

Chung, N., Cheng, Y. 2001. Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology.* 142, 1878-88.

CONAMA n°. 357. 2005. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e outras providências. Brasília.

Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dréanno, C. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm in: *The Male Gamete*. Chapter. 16, 161-186.

Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A. 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res.* 45, 6417–6429.

Coward, K., Bromage, N.R., Hibitt, O. 2002. Parrington, J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 12, 33-58.

De Conto Cinier, C., Petit-Ramel, R., Faure, R., Bortolato, M. 1998. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bull. Environm. Contam. Toxicology.* 61, 793-799.

Dietrich, F.S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pohlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R.A., Flavier, A., Gaffney, T.D., Philippsen, P. 2004. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science.* 304, 304- 307.

Duruibe, J.O., Ogwoegbu, M.O.C, Ekwurugwu, J.N. 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int. J. Phys. Sci.* 2, 112–118.

EEC. European Environment Council., 1983. On limit values and quality objectives for cadmium discharges. Last accession: Jan. 12, 2015.

El-Shahat, A., Gabr, A., Meki, A., Mehana, E. 2009. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract. *Int. J. Morphol.* 27, 757-64.

EPA. 2001. United States Environmental Protection Agency. Update of ambient water quality criteria for cadmium. Last accession: Jan. 12, 2015.

Esteves, F. 1998. *Fundamentos de limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2 ed. 602p.

Etchin, J., Kanki, J.P., Look, A.T. 2011. Zebrafish as a model for the study of humancancer. *Methods. Cell Biol.* 105, 309–337.

Evenson, D.P., Larson K.L., Jost L.K. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 23, 25–43.

Fernández-Gago, R., Domínguez, J.C., Martínez-Pastor, F. 2013. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology.* 80, 400-10.

Flesh, F.M., Gadella, B.M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys.* 1469, 197-235.

Froese, R., Pauly, D. Editors. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (11/2014). www.fishbase.org, versão (11/2014).

Ghosh, M., Singh, S.P. 2005. Review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts: *Applied. Ecology Res.* 3, 1-18.

Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology.* 63,445–457.

Gravance, C.G., Garner, D.L., Miller, M.G., Berger, T. 2001. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod. Toxicol.* 15, 5–10.

Guyton, A.C., Hall, J.E. 1997. *Tratado de fisiologia médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9.ed. 1014p.

Hagedorn, M., McCarthy, M., Carter, V.L., Meyers, S.A. 2012. Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Plos One*, Vol. 7(6), e39397.

Han, F.X., Banin, A., Su, Y., Monts, D.L., Plodinec, M.J., Kingery, W.L., And Triplett, G. E. 2002. Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. *Naturwissenschaften.* 89, 497–504.

Han, S., Fan, Y., Xu, X., Qin, J, Wu, B., Wang, X., Aglioti, SM., Mao, L. 2009. Empathic neural responses to others' pain are modulated by emotional contexts. *Human Brain Mapping.* 30, 3227-3237.

Harayashiki, C.A.Y., Varela Junior, A.S., Machado, A.A.S., Cabrera, L. C., Primel, E.G., Bianchini, A., Corcini, C. D., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water, *Aquatic Toxicology.* 142-143, 176– 184.

Hatje, V., Bidone, E.D., Maddock, J.L. 1998. Estimation of the natural and anthropogenic components of heavy metal fluxes in fresh water Sinos river, Rio Grande do Sul state, South Brazil. *Environ. Tech.* 19, 483-487.

Haugland, T., Rudolfson, G., Figenschou, L., Folstad, I. 2009. Sperm velocity and its relation to social status in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Anim. Reprod. Sci.* 115, 231–237.

His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water. Res.* 33, 1706–1718.

Host, E., Lindenberg, S., Smidt-Jensen, S. 2000. Quebras no DNA de espermatozoides humanos: correlação com a fertilização in vitro oligozoospermicos e em homens com infertilidade inexplicada. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 79, 189-93.

Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J. Androl.* 21, 33–44.

Jarup, L., Kesson, A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharm.* 238, 201–208.

Kar, D., Sur, P., Mandal, S.K., Saha, T., Kole, R.K. 2008. Assessment of heavy metal pollution in surface water. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 5, 119-124.

Khosro Beygi, A. e Zarghami, N. 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids.* Vol.77, 117.

Kime, D.E.; Nash, J.P. 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Sci. Total Environm.* 233, 123-129.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2000. *Princípios de Bioquímica.* São Paulo: Sarvier. 2.ed. 838p.

Leoni, G., Bogliolo, L., Deiana, G., Berlinguer, F., Rosati, I., Pintus, P., Ledda, S., Naitana, S. 2002. Influence of Cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reprod. Toxicol.* 16, 371-377.

Likens, G.E. *Biogeochemistry, the watershed approach: some uses and limitations.* 2001. In: *Frontiers of Catchment Biogeochemistry.* CSIRO Land and Water, Canberra, Australia. *Mar. Freshwater Res.* 52, 5-12.

Lopez-Olmeda, J.F., Sanchez-Vazquez, F.J. 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Therm. Biol.* 36, 91–104.

Losso, C., Picone, M., Arizzi Novelli, A., Delaney, E., Ghetti, P.F., Volpi Ghirardini, A. 2007. Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates

with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas*, and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 220–226.

Macken, A., Giltrap, M., Ryall, K., Foley, B., McGovern, E., McHugh, B., Davoren, M. 2009. A test battery approach to the ecotoxicological evaluation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. *Ecotoxicology* 18, 470–480

Mc Geer, J.C., Szebedinszky, C., Mc Donald, D.G., Wood, C.W. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cádmió or Zn in rainbow trout 1: iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology.* 50, 231–243

Macova, M., Escher, B.I., Reungoat, J., Carswell, S., Lee Chue, K., Keller, J., Mueller, J.F. 2010. Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced waste water treatment with ozonation and activated carbon filtration. *Water Res.* 44, 477–492.

Marettová, E., Mareta, M., Legath, J. 2010 Changes in the peritubular tissue of rat testis after cadmium treatment. *Biol. Trace. Elem. Res.* 134, 288-295.

Martínez-Rodríguez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Dom. Anim.* 38, 312-18.

McGonnell, I.M. & Fowkes, R.C. 2006. Fishing for gene function--endocrine modelling in the zebrafish. *J. Endocrinol.* 189, 425-39.

Meer, G.V., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 112–124.

Meyer, O. 2003. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicol. Letters.* 140- 141, 21-30.

Ministério Do Meio Ambiente, águas subterrâneas, 2003. Disponível em: www.mma.gov.br, acesso em 15/08/2014.

Monsefi, M., Alae, S., Moradshahi, A., Rohani, L. 2009. Cadmium induced male infertility in male mice. *Environ. Toxicol.* 25, 94-102.

Nawrot, T.S., Van Hecke, E., Thijs, L., Vangronsveld, J., Van-Hecke, E. 2008. Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. *Environ. Health. Perspect.* 116, 1620–1628.

Nipper, M. 2000. Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessments in coastal environments: *Braz. Perspec. Aquatic Ecosystem Health and Managem.* 3, 433–447.

Nouri, J., Mahvi, A.H., Jahed, G.R., Babaei, A.A. 2008. Regional distribution pattern of groundwater heavy metals resulting from agricultural activities. *Environ. Geo.* 55, 1337-1343.

Papa, F.O., Gabaldi, S.H., Wolf, A. 2000. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 24, 39-44.

Perkins, E.J., Ankley, G.T., Crofton, K.M., Garcia-Reyero, N., LaLone, C.A., Johnson, M.S. 2013. Perspectivas atuais sobre o uso de espécies alternativas na saúde humana e os impactos dos desastres ecológicos. *Environ. Saúde Perspect.* 121, 1002-1010.

Rawe, V.Y., Galaverna, G.D., Acosta, A.A., Olmedo, S.B., Chemes, H.E. 2001. Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Human Reprod.* 16, 879-886.

Rogero, S. O., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Cruz, A.S. 2003. Testes in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials. Res.* 6, 317-320.

Rogero, S.O., Higa, O.Z., Saiki, M., Correa, O.V., Costa, I. 2000. Toxicology in vitro. 14, 497-504.

Rowland, A.A., Voeltz, G.K. 2012. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Ver. Mol. Cell. Biol.* 13, 607-625.

Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D. E. and Ollevier, F. 1998. The minimum effective spermatozoa:egg ratio for artificial insemination and effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *J. Fish Biol.* 53, 402-13.

Russel, W.M.S., Burch, R.L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. <http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm>. Acesso em: 14 maio 2003.

Sánchez, M.L. 2008. Causes and Effects of Heavy Metal Pollution, Nova Science Publishers, Hauppauge. p. 392.

Shive, H.R. 2013. Zebrafish models for human cancer. *Vet. Pathol.* 50, 468-482.

Silva, P.F.N., Gadella, B.M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 65, 958-78.

Sloman, K.A. 2007. Effects of trace metals on salmonid fish: the role of social hierarchies. *App. An. Behavior. Sci.* 104, 326–345.

Sorensen, A.M. 1979. *Laboratory for animal reproduction*. Massachusetts: American Press., 4^a ed.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Reviews.* 83, 13–34.

Stegeman, J. J., Hahn, M. E. 1994. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: current on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: *Aquatic Toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives*. p. 87-206

Suthar, S. & Singh, S. 2008. Vermicomposting of domestic waste by using two epigenic earthworms (*Perionyx excavatus* and *Perionyx sansibaricus*). *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 5, 99-106.

Thevenod, F. 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharm.* 238, 221–239.

Tundisi, J.G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. *Estud. av. São Paulo*, 22, 2008.

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

Waalkes, M.P. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533, 107–120.

White, W.J. The use of laboratory animals in toxicologic research. In: Hayes, A. W. *Principles and methods of toxicology*. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. 16, 773-818.

Wilson, A. J. 1996. *The Living Rock: The Story of Metals Since Earliest Time and Their Impact on Civilization*. Whitehurst & Clark, Flemington. p. 272.

World Health Organization (WHO), 2008. Cadmium. In: *Guidelines for drinking-water quality, 3rd edition incorporating 1st and 2nd addenda*. Vol. 1. Recommendations. Geneva, World Health Organization, pp. 317–319

Yao, Z., Richardson, G., Crim, L. 1999. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. *Aquaculture*. 174, 183–193.