



Universidade Federal do Espírito Santo

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular

**POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CÁDMIO EM DOSE SEMELHANTE À DE
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL NA GÊNESE DE COMPLICAÇÕES NO
TRATO REPRODUTIVO DE RATAS WISTAR**

CHARLES SANTOS DA COSTA

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Doutorado em Ciências Fisiológicas

Vitória, fevereiro de 2023

CHARLES SANTOS DA COSTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profº. Dr. Jones Bernardes Graceli.

Vitória - ES

2023

S237p Santos da Costa, Charles, 1990-
POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CÁDMIO EM DOSE
SEMELHANTE À DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL NA
GÊNESE DE COMPLICAÇÕES NO TRATO REPRODUTIVO
DE RATAS WISTAR / Charles Santos da Costa. - 2023.
97 f. : il.

Orientador: Jones Bernardes Graceli.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cádmio. 2. Desregulador endócrino. 3. Eixo hipotálamo
hipófise-ovário. 4. Síndrome do ovário policístico. 5. Falência
ovariana prematura. I. Bernardes Graceli, Jones. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DA CANDIDATA AO GRAU DE
DOUTORA PELO PPGCF CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS.

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada "POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CÁDMIO EM DOSES SEMELHANTES ÀS OBSERVADAS EM TRABALHADORES EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE NA GÊNESE DE COMPLICAÇÕES DO TRATO REPRODUTIVO EM RATAS WISTAR" elaborada por Charles Santos da Costa, candidato ao Grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 16 de fevereiro de 2023, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

☒ (x) Aprovada

☐ () Reprovada



Documento assinado digitalmente
LEANDRO MIRANDA ALVES
Data: 17/02/2023 10:54:29-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Vitória, 16 de fevereiro de 2023.

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli
(PPGCF - Ufes) – Orientador

Prof. Dr. Leandro Miranda Alves
(UFRJ) – Titular externo

Profª. Drª. Alessandra Simão Padilha
(PPGCF - Ufes) – Titular interno

Prof. Dr. Leandro Ceotto Freitas Lima
(IOCB Prague) – Titular externo

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos
(PPGCF - Ufes) – Titular interno



Campus Universitário de Maruípe – Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória – ES, 29043-900
Tel. (27)3335-7340 | cienciasfisiologicas.ufes.br | secretaria.ppgcf.ufes@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ALESSANDRA SIMAO PADILHA - SIAPE 2482917
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 22/02/2023 às 18:10

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/655744?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ROGER LYRIO DOS SANTOS - SIAPE 2531318
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 22/02/2023 às 21:24

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/655779?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JONES BERNARDES GRACELI - SIAPE 2630280
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 23/02/2023 às 14:38

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/656275?tipoArquivo=O>

“Devemos fazer o desenvolvimento para o homem e não condicionar o homem à sua prática. A grande revolução a que aspiramos, a qual, ao nosso entender, precede a do próprio progresso econômico, é a educação do povo.”

Leonel Brizola

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar e sustentar até aqui, por sempre me mostrar o caminho certo, mesmo que por enigmas ou por caminhos que eu não tinha certeza se dariam em algo, por sempre estar lá (em todos os lugares e em algumas pessoas também) para me ouvir, me estender a mão e me aconselhar.

À minha Família, hoje formada por minha esposa Fernanda, nossa primeira filha Mel e a primeira filha humana Liz que está quase chegando. Obrigado por tentar ter paciência comigo, entender minha ausência e minhas correrias, e que eu faço isso (Ciência), por ser a realização de um sonho. Obrigado por todo o carinho e cuidados, pelo seu abraço, por estar sempre lá quando precisei, por acreditar em mim, e enxergar uma pessoa boa, com capacidade e talentos que nem mesmo eu consigo enxergar.

À minha avó Penha (que na verdade chamo de mãe por ter me criado desde bebê) e ao meu irmão, Eric, por me apoiarem mesmo que de longe, por orar e acreditar em mim, por suportar e entender meus sumiços, minha demora para ir vê-los ou até mesmo para fazer uma ligação e ver se estava tudo certo.

À minha amiga e irmã Evellyn, por sua amizade, seu companheirismo, carinho e por ser meu grande exemplo de persistência, perseverança, profissionalismo e empatia. Por sempre dividir comigo os papos mais aleatórios que vão de Naruto até astronomia e pelas incontáveis caronas que muitas vezes serviram de terapia.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular (LETC) antigos e atuais, por me receberem tão bem e me ajudarem em tudo, por todo o ensinamento pessoal e profissional, pelas risadas e conversas, experimentos realizados com sucesso ou nem tanto sucesso assim. Ao meu irmão colombiano Oscar por ser o melhor parceiro de doutorado em todos os momentos, sempre solícito e carismático. Aos incríveis colegas do doutorado Eduardo, Jordana, Edgar, Cidália, do mestrado Flávia e Natália, e à IC mais dedicada e engraçada Jeanini, enfim a todos por seu companheirismo, seus conhecimentos e por todo apoio técnico, teórico e até emocional. Ao Leandro, que apesar de não estar mais no laboratório, contribuiu muito durante meu mestrado, e até hoje é um incentivador e também para mim uma referência de

pessoa e pesquisador. Aos demais colegas da pós-graduação que sempre me trataram com respeito e de certa forma contribuíram para meu desenvolvimento. Por todos os momentos de aprendizado e de diversão também, como as tardes na varanda, no Café com Ciência e nos Cursos de Férias. E aos amigos que mesmo fora da UFES fizeram parte desse momento, sempre me animando e dando aquela força independentemente da distância.

Ao sem dúvidas, melhor orientador que Deus poderia providenciar, Jones Bernardes Graceli. Inicialmente por ter dado a oportunidade a um desconhecido de outra cidade, de outra realidade e que só precisava de uma chance, pra dar um passo muito importante na vida. Pelo acolhimento e por ter depositado sua confiança em mim, por todos os ensinamentos, todas as formas de apoio, tanto dentro quanto fora da UFES. Por me ajudar a realizar alguns sonhos, como fazer ciência, conhecer outro país, conhecer outras universidades e me tornar uma pessoa melhor. Por ser um orientador presente, diferencial e participativo, e por sempre fazer de tudo para o desenvolvimento pessoal, profissional, intelectual e técnico dos seus alunos. Obrigado pelas cobranças e puxões de orelha, e por sempre tentar melhorar nossos trabalhos e por observar os mínimos detalhes.

A todos professores da pós-graduação, por toda contribuição acadêmica e pessoal, por todas as incríveis aulas teóricas, práticas e discussões construtivas, que com certeza serão fundamentais para minha formação como futuro pesquisador e professor. E claro, por todas as parcerias que me permitiram conhecer outras linhas de pesquisa, outros assuntos e que alguns momentos me ajudaram a sair da zona de conforto.

Aos Laboratórios Multiusuários de Histotécnicas, Histologia Molecular e Imunohistoquímica e no de Análises Biomoleculares, e os técnicos envolvidos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Às Ratas que deram suas vidas para que o trabalho fosse executado, mas sei que as tratei com todo respeito e carinho possível.

A UFES, CAPES, FAPES e CNPQ pelo apoio financeiro e por todas as oportunidades acadêmicas que o mesmo proporcionou.

RESUMO

O cádmio (Cd) é um metal pesado tóxico conhecido por ser um importante desregulador endócrino. Contudo, poucos estudos exploram os efeitos da exposição ao Cd no desenvolvimento de características da síndrome do ovário policístico (SOP) e da falência ovariana prematura (FOP). Neste estudo, avaliamos se a exposição subaguda ao Cd a uma dose similar à de exposição ocupacional resulta em anormalidades no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG) e alterações relacionadas a SOP e FOP. Ratas Wistar foram expostas a CdCl₂ (100 ppm em água por 30 dias) e os níveis de Cd no soro, eixo HPG e útero foram avaliados. Além disso, avaliamos fatores metabólicos, função do eixo HPG, morfofisiologia do trato reprodutivo, inflamação, estresse oxidativo e fibrose. A exposição ao Cd elevou seus níveis no soro, no eixo HPG e útero. As ratas Cd apresentaram danos metabólicos, redução da adiposidade, dislipidemia e resistência à insulina (RI). O Cd também causou o funcionamento inadequado no eixo HPG. Constataram-se irregularidades no ciclo estral, expressão de mRNA hipotalâmica anormal com superexpressão de Kisspeptina 1 (Kiss1), receptor de androgênio (AR) e proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTOR) e menor expressão dos receptores de Kiss1 (Kiss1R) e de leptina (LepR) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), altos níveis do hormônio luteinizante (LH), baixos níveis do hormônio anti-Mülleriano (AMH) e desenvolvimento folicular ovariano anormal, redução da reserva ovariana e do número de folículos antrais foram observados, sugerindo depleção ovariana. Além disso, a exposição ao Cd causou diminuição na espessura da camada da granulosa e do número de corpos lúteos juntamente com um aumento de folículos císticos e atresícos. A exposição ao Cd aumentou a inflamação, estresse oxidativo e o remodelamento no trato reprodutivo. Finalmente, correlações positivas foram identificadas entre os níveis de Cd sérico e no trato reprodutivo com resistência à insulina, dislipidemia e duração do ciclo estral, folículos císticos, atresícos, níveis de LH e inflamação. Assim, esses dados sugerem que a exposição subaguda ao Cd com dose similar à de exposição ocupacional altera a função do eixo HPG, levando a características da SOP e FOP, além de anormalidades metabólicas em ratas.

Palavras-chave: Cádmio, desregulador endócrino; eixo hipotálamo-hipófise-ovário; síndrome do ovário policístico; falência ovariana prematura.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal known to be a major endocrine disruptor. However, few studies have explored the effects of Cd exposure on developing polycystic ovary syndrome (PCOS) features and premature ovarian failure (POF). In this study, we evaluated whether subacute exposure to Cd at a dose similar to that of occupational exposure results in damage to the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and abnormalities related to PCOS and FOP. Wistar rats were exposed to CdCl₂ (100 ppm in water for 30 days), we evaluated the levels of Cd in the blood, HPG axis and uterus. In addition, we evaluated metabolic factors, HPG axis function, reproductive tract morphophysiology, inflammation, oxidative stress and fibrosis. Exposure to Cd raised its levels in serum, HPG axis and uterus. The Cd rats presented metabolic damage, adiposity reduction, dyslipidemia and insulin resistance (IR). Cd also caused the HPG axis to malfunction. Irregularities in the estrous cycle, abnormal hypothalamic mRNA expression with overexpression of Kisspeptin 1 (Kiss1), androgen receptor (AR) and rapamycin mechanistic target protein (mTOR) and lower expression of Kiss1 (Kiss1R) and leptin receptors (LepR) were observed and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), high levels of luteinizing hormone (LH), low levels of anti-Müllerian hormone (AMH) and abnormal ovarian follicular development, reduced ovarian reserve and follicle number antral were observed, suggesting ovarian depletion. Furthermore, exposure to Cd decreases the granulosa layer thickness and the corpora lutea counting and increases the cystic and atretic follicles. Cd exposure increased inflammation, oxidative stress, and remodeling in the reproductive tract. Finally, positive correlations were observed between serum and reproductive tract Cd levels with insulin resistance, dyslipidemia and estrous cycle duration, cystic and atretic follicles, LH levels and inflammation. Thus, these data suggest that subacute exposure to Cd at a dose similar to that of occupational exposure alters the function of the HPG axis, leading to PCOS and FOP features besides metabolic abnormalities in female rats.

Keywords: Cadmium, endocrine disruptor; hypothalamic-pituitary-gonadal axis; polycystic ovary syndrome; premature ovarian failure.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	31
3. OBJETIVO GERAL	32
4. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	32
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 Animais e exposição	33
5.2 Químicos	34
5.3 Eutanásia	34
5.4 Ciclo estral	34
5.5 Quantificação tecidual de Cádmio	34
5.6 Análise do perfil lipídico.....	35
5.7 Análise do perfil hormonal	35
5.8 PCR RT-quantitativo (RT-PCR).....	35
5.9 Análise morfológica tecidual e histopatológica	36
5.10 Análise da inflamação tecidual	37
5.10.1 Contagem de mastócitos	38
5.10.2 Processamento tecidual para análise da atividade de NAG e MPO	38
5.10.3 MPO (Atividade de neutrófilos)	39
5.10.4 NAG (Atividade de macrófagos)	39
5.11 Deposição de colágeno tecidual.....	39
5.12 Análise do estresse oxidativo	40
5.12.1 Glutathione reduzida (GSH).....	40
5.12.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	40
5.12.3 Ensaio de ânion superóxido.....	41
5.13 Análise estatística	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Os níveis de cádmio tecidual se encontraram elevados nas ratas expostas ao Cd.....	42
6.2 O Cd não alterou o consumo alimentar e hídrico, mas alterou a massa corporal	43

6.3	Exposição ao Cd reduziu a massa das gorduras, adiposidade e dos ovários	44
6.4	Ratas expostas ao Cd apresentaram alteração no perfil metabólico	45
6.5	Alteração no ciclo estral foi observado nas ratas expostas ao Cd	47
6.6	Ratas expostas ao Cd apresentaram aumento de LH e alteração no perfil de controle gênico do hipotálamo	49
6.7	A exposição ao Cd levou à redução dos níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano	50
6.8	Exposição ao Cd reduziu a reserva folicular e alterou o desenvolvimento dos folículos ovarianos.....	51
6.9	A análise histopatológica nos ovários expostos ao Cd indica infiltração inflamatória e edema	53
6.10	Exposição ao Cd alterou a morfologia uterina	54
6.11	A análise histopatológica nos úteros do grupo Cd indica hiperplasia glândular e perfil fibrótico.....	55
6.12	Exposição ao Cd levou a um processo inflamatório no trato reprodutivo.....	56
6.13	Exposição ao Cd alterou marcadores de estresse oxidativo no trato reprodutivo	57
6.14	Ratas expostas ao Cd apresentam aumento na deposição de colágeno no trato reprodutivo	59
6.15	Correlação entre níveis de Cd e parâmetros metabólicos e características de SOP e FOP	60
7.	DISCUSSÃO.....	63
8.	REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Fontes de exposição ao Cd e formas de absorção no intestinal.</i>	18
<i>Figura 2: Estrutura corporal relacionada à doença itai-itai.</i>	20
<i>Figura 3: Órgãos e tecidos afetados pela exposição ao Cd</i>	24
<i>Figura 4: Ação direta e indireta do Cd na geração de EROs e dano intracelular.</i>	27
<i>Figura 5: Modelo de exposição dos grupos CON e Cd ao longo de 30 dias.</i>	34
<i>Figura 6: Avaliação de folículos antrais e morfometria uterina.</i>	37
<i>Figura 7: Quantificação tecidual de cádmio em ratas CON e Cd.</i>	43
<i>Figura 8: Consumo alimentar e hídrico e a massa corporal das ratas CON e Cd.</i>	43
<i>Figura 9: Massa dos depósitos de tecido adiposo branco e adiposidade das ratas CON e Cd.</i>	44
<i>Figura 10: Perfil do metabolismo glicêmico e lipídico das ratas CON e Cd.</i>	47
<i>Figura 11: Avaliação do ciclo estral das ratas CON e Cd.</i>	48
<i>Figura 12: Níveis de gonadotrofinas e expressão gênica em ratas CON e Cd.</i>	50
<i>Figura 13: Exposição ao Cd e desenvolvimento folicular ovariano em ratas.</i>	53
<i>Figura 14: Análise histopatológica do tecido ovariano.</i>	54
<i>Figura 15: Exposição ao Cd e atrofia uterina em ratas.</i>	55
<i>Figura 16: Análise histopatológica do tecido uterino.</i>	55
<i>Figura 17: Exposição ao Cd e inflamação do trato reprodutivo.</i>	56
<i>Figura 18: Exposição ao Cd e estresse oxidativo no trato reprodutivo de ratas.</i>	58
<i>Figura 19: Exposição ao Cd e deposição de colágeno no trato reprodutivo.</i>	59
<i>Figura 20: Resumo da exposição ao Cd sobre o eixo HPG.</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Subclassificações da SOP e FOP de acordo com as características.	29
Tabela 2 – Sequências de pares base de primers usados nos ensaios PCR em tempo real.	36
Tabela 3 – Massa dos órgãos corrigida pela massa corporal.	45
Tabela 4 – Níveis dos hormônios sexuais.	51
Tabela 5 – Resumo da análise ovariana.	53
Tabela 6 – Correlação entre níveis de Cd e características do SOP.	61
Tabela 7 – Correlação entre níveis de Cd e características da FOP.	62
Tabela 8 – Correlação entre concentração de Cd marcadores uterinos.	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

•OH	Radical hidroxila
AMH	Hormônio anti-Mülleriano
AR	Receptor de androgênio
As	Arsênio
AUC	Área sob a curva
Ca ²⁺	Cálcio
Cd	Cádmio
CdCl ₂	Cloreto de Cádmio
Cd-MT	Complexo Cd-metalotioneína
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CON	Controle
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
Cu	Cobre
DHE	Dihidroetídio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT1	Transportador de metal divalente
E2	Estradiol
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
FOP	Falência ovariana prematura
GnRH	Hormônio hipotalâmico de liberador de gonadotrofinas
GSH	Glutathiona reduzida
H&E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de baixa densidade
HPG	Hipotálamo-hipófise-gônada

IARC	International Agency of Research on Cancer
IBE/EE	Indicador biológico de exposição excessiva
Kiss1	Kisspeptina 1
Kiss1R	Receptor de Kiss1
LDL	Lipoproteína de alta densidade
LepR	Receptor de leptina
LH	Hormônio luteinizante (LH)
mg	Miligramas
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
Mt	Metalotioneína
mTOR	Proteína alvo mecanístico da rapamicina
NAG	n-Acetil- β -d-glicosaminidase
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
P ₄	Progesterona
Pb	Chumbo
PBS	Tampão salina-fosfato
PIB	Produto Interno Bruto
RI	Resistência à insulina
SOP	Síndrome do ovário policístico
T	Testosterona
TAB	Tecido adiposo branco
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Trato reprodutivo
TSI	Teste de sensibilidade à insulina
TTG	Teste tolerância à glicose
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

US EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ZIP	Transportadores de Zn
Zn	Zinco
µg	Microgramas
µL	Microlitros

1. INTRODUÇÃO

Em 1817 na Prússia, após suspeita de contaminação por Arsênio na produção de óxido de zinco (Zn), muito utilizado na indústria farmacêutica, o professor alemão Friedrich Strohmeier identificou um óxido amarelado composto de um novo metal. Alguns nomes foram sugeridos para o novo elemento como klaprothium e melinum, mas prevaleceu o nome proposto por Strohmeier, cádmio (Cd), do latim *cadmia*, um termo genérico referente a minerais a base de Zn (NORDBERG, 2009; TARAKINA; VERBERCK, 2017).

Segundo a classificação química o Cd é um metal de transição de número atômico 48. Assim como outros metais não é encontrado no ambiente em sua forma pura, mas sim formando diferentes complexos com outros metais como Zn, cobre (Cu), chumbo (Pb), além de carbonatos e até mesmo com poluentes emergentes como os microplásticos (MASSOS; TURNER, 2017; OLGUN; YILDIZ; ŞAHIN, 2020). É um metal branco prateado, consideravelmente macio e maleável, sendo encontrado em concentrações entre < 5 e 110 ng/L nos oceanos e em concentrações que variam entre $0,1\text{-}0,5 \text{ ppm}$ na crosta terrestre (OLGUN; YILDIZ; ŞAHIN, 2020; VALLERO, 2014).

As concentrações de Cd no solo e na água dependem de fatores que resultem na mobilidade dos compostos contendo esse metal, podendo ser de origem natural como os observados nas atividades vulcânicas, na dispersão de aerossóis de sais marinhos e no natural desgaste de rochas. Contudo, existem fatores de origem antropogênica, ou seja, aqueles derivados de atividades humanas, os quais contribuem com cerca de $80\text{-}90 \%$ de dispersão do Cd e de seus compostos (BARRAZA et al., 2017).

As fontes antropogênicas chegam a inserir de 3-10 vezes mais Cd na atmosfera do que as fontes naturais. As indústrias dependendo do seu tipo de atividade acabam por gerar resíduos com diferentes concentrações desse metal na forma de vapores e poeira. As principais atividades que liberam esses resíduos são a produção de reagentes corrosivos, estabilizantes de PVC, pigmentos para tintas, baterias recarregáveis de níquel-cádmio (Ni-Cd), formação de ligas, galvanoplastia, uso de fertilizantes fosfatados e queima de combustíveis fósseis (BULAT et al., 2009; GENCHI et al., 2020; TURNER, 2019; ZHAO, Y. et al., 2020).

Uma vez acumulado no solo o Cd é absorvido por diversos tipos de vegetais, seu acúmulo é observado principalmente em regiões onde se faz o uso de fertilizantes fosfatados e também em plantios localizados nas proximidades de regiões com atividade petrolífera. Altas taxas de absorção de Cd são notadas em plantas como o tabaco (utilizado na produção de cigarros e charutos), o cacau (principal ingrediente de chocolates), cereais (principalmente o arroz), e inúmeros vegetais folhosos como as verduras. (A.T.S.D.R., 2012; BARRAZA et al., 2017).

Em humanos a principal rota da exposição ao Cd é a ingestão, podendo ocorrer pelo consumo de alimentos/água contaminados para não fumantes e trabalhadores não ocupacionais. Entretanto, além da contaminação por ingestão, a fumaça do cigarro e a inalação do ar em áreas de indústrias de metais, são também fontes importantes de exposição, logo, os fumantes e trabalhadores de setores da indústria metalúrgica são os principais expostos e consequentemente os mais afetados (GENCHI et al., 2020; SATARUG et al., 2013).

A absorção do Cd pelo organismo humano varia de acordo com a via de exposição. A inalação principalmente por consumo de cigarro chega a cerca de 25 % (5-50 %). Consumir um único cigarro aumenta as concentrações séricas de Cd em cerca de 0,1-0,2 µg/L visto que cada cigarro pode conter de 0,5-2 µg desse metal dependendo da origem do tabaco e o grau de utilização de fertilizantes fosfatados (A.T.S.D.R., 2012; BERNHARD; ROSSMANN; WICK, 2005).

A absorção por via oral, seja por ingestão de alimentos ou água contaminada, tem absorção estimada em 5 % (1-10 %), contudo, a absorção por água contaminada é maior do que por alimentos contaminados. Alguns dos primeiros estudos de absorção de Cd em animais observaram que esse processo ocorre na porção superior do intestino delgado, sendo um processo mediado por carreadores (ANDERSEN et al., 1994; JACOBO-ESTRADA et al., 2017; SORENSEN; NIELSEN; ANDERSEN, 1993; US EPA IRIS, 1989).

A exposição ao Cd por ingestão leva a uma taxa de absorção de 1 a 6 % como demonstrado em modelos roedores e primatas. Em humanos, a taxa média

de absorção intestinal fica em torno de 4,6 a 6 %. Estudos apontam que os níveis de Cd no sangue total são maiores em mulheres não fumantes do que em homens não fumantes como mostra uma investigação realizada com 328 indivíduos de pares gêmeos, sendo 61 pares monozigóticos e 103 pares dizigóticos com idade média de 68 anos demonstrou que mulheres não fumantes apresentavam níveis mais elevados Cd no sangue do que homens não fumantes. Outro estudo com 7377 participantes, sendo 3700 mulheres e 3677 homens mostrou em várias faixas etárias que vão de 20 a ≥ 65 anos níveis mais elevados no sangue total de Cd nas mulheres do que nos homens (BJÖRKMAN; VAHTER; PEDERSEN, 2000; FRIBERG et al., 2019; JÄRUP et al., 1998; KIM et al., 2014).

Em investigações animais identificou-se que a deficiência nutricional com baixa ingestão de ferro (Fe), Zn, cálcio (Ca^{2+}) e proteínas pode aumentar consideravelmente a absorção de Cd. Em humanos principalmente em mulheres a absorção é elevada dependendo das reservas de ferro do organismo. Pessoas com baixas reservas de Fe, chegam a apresentar níveis de Cd quatro vezes superiores aos níveis de pessoas com reservas normais. A maior captação de Cd em mulheres com baixo estoque de Fe tem relação com a expressão do transportador de metal divalente (DMT1) nos enterócitos humanos, uma vez que o Cd compete pelo transportador com o Fe. Deste modo, uma vez que baixos níveis de ferro e normalmente com baixa ferritina são encontrados em mulheres em idade fértil, é razoável que se observe maiores taxas de absorção gastrointestinal de Cd em mulheres do que em homens (ANDERSEN; NIELSEN; NORDBERG, 2004; CHANEY et al., 2004; FLANAGAN et al., 1978; FRIBERG et al., 2019; NORDBERG et al., 2007; TALLKVIST; BOWLUS; LÖNNERDAL, 2001; ZALUPS; AHMAD, 2003).

Embora a ingestão alimentar esteja entre as principais vias de exposição ao Cd, poucos detalhes são conhecidos sobre seu mecanismo de absorção. Estudos em roedores demonstraram que o mecanismo de captação celular do Cd no intestino delgado consiste na ligação a sítios aniônicos na membrana celular seguido por uma internalização dependente da temperatura e limitante da taxa de captação, que provavelmente, está relacionada à fluidez da membrana. Por fim, o processo de absorção se dá por transporte através da membrana basolateral para o fluido intersticial. Esse processo corresponde a

apenas 1-2 % da taxa de captação do lúmen (KLAASSEN; LIU; DIWAN, 2009; PROZIALECK, 2013; THÉVENOD et al., 2019).

Sabe-se que o transporte de Cd do intestino delgado é também facilitado por outros mecanismos como o já mencionado DMT1, além de transportadores de outros metais como Zn, através do ZIP8 e ZIP14, canais de cálcio, transportadores de aminoácido (como conjugados de Cd-cisteína), por endocitose de complexos Cd-metalotioneína (Cd-MT) e por outras formas (Figura 1). As metalotioneínas (MTs) são um grupo de proteínas de baixo peso molecular produzido pelo epitélio intestinal, apresentam como função primária o armazenamento e regulação da concentração intracelular de Zn, além disso, atuam na neutralização de radicais livres gerados localmente. O Cd é capaz de estimular a produção de MTs, e como estas possuem capacidade de ligação a metais pesados, tendem sequestrar parte do Cd ingerido. Animais experimentais e trabalhadores expostos de forma ocupacional apresentam níveis de MTs até dez vezes maiores que indivíduos saudáveis. Após a absorção o Cd é distribuído pela circulação sistêmica para vários órgãos ligado à albuminas e outras biomoléculas reativas contendo grupos tiol no plasma, porém, em menor quantidade na forma de Cd-MT (KLAASSEN; LIU; DIWAN, 2009; PROZIALECK, 2013; THÉVENOD et al., 2019).

Uma vez absorvido pelas células teciduais por ação de transportadores similares aos que se encontram nos enterócitos, o Cd se acumula em vários órgãos por vários meses e em alguns casos por décadas. No sangue, em exposições agudas ou recentes, a meia vida do Cd pode ser de três a quatro meses, enquanto, um acúmulo tecidual de longo prazo pode levar a uma meia vida de cerca de 30 anos. Estima-se que a meia vida do Cd nos rins seja de 6 a 38 anos, no fígado 4 a 19 anos, e por fim, em outros tecidos seja de 9 a 47 anos. Isso acontece pois no citosol o Cd acaba sendo quelado por biomoléculas que tem sua produção estimulada pela presença do metal. Em humanos cerca de 50% da carga corporal de cádmio é encontrada nos rins, mas outros órgãos ou tecidos de bioacumulação importantes e que contribuem para a carga corporal são fígado (15%) e músculo (20%). A quantidade de cádmio no osso é pequena se comparada a outros órgãos. (A.T.S.D.R, 2002; ORGANIZATION OF THE

UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; RAFATI RAHIMZADEH et al., 2017; THÉVENOD et al., 2019).

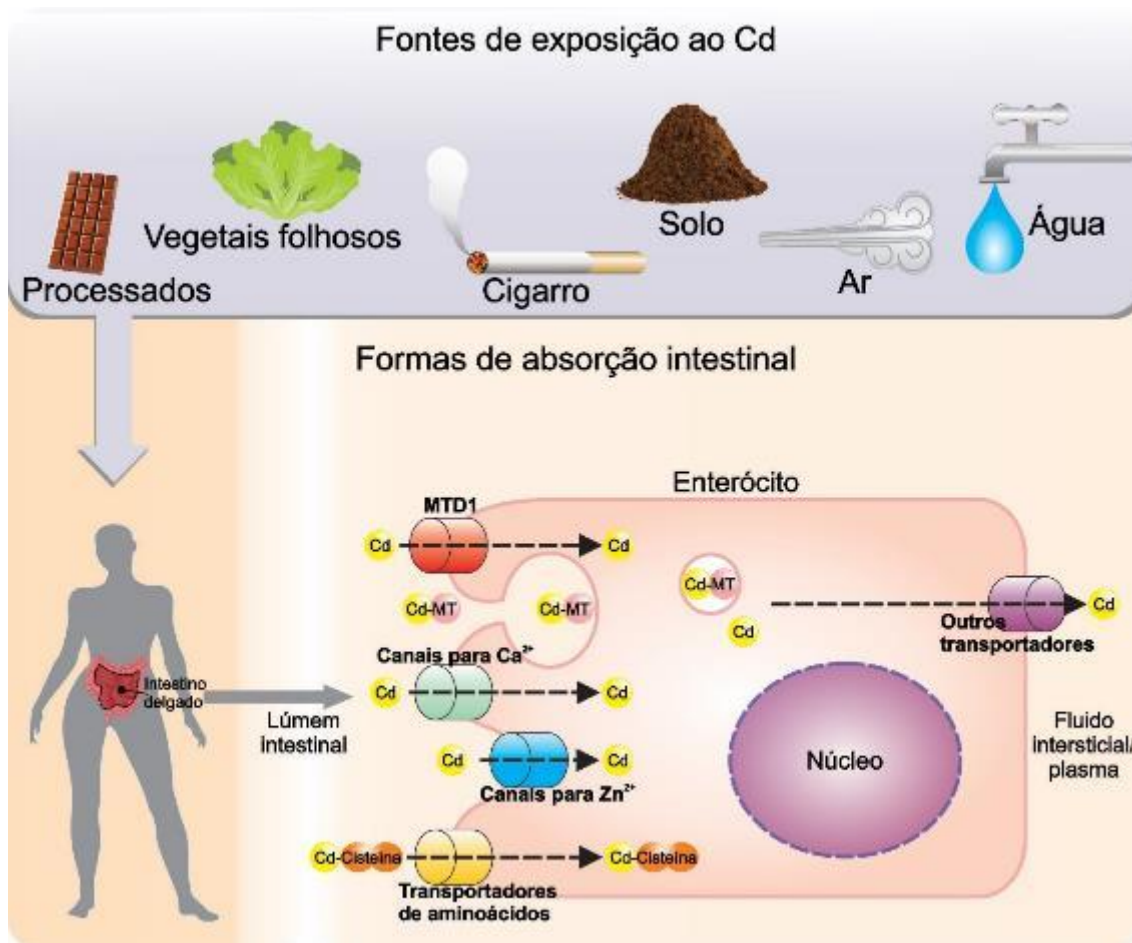


Figura 1: Fontes de exposição ao Cd e formas de absorção no intestinal. MTD1: transportador de metal divalente. MT: metalotioneína. Baseado em Klaassen; Liu; Diwan, 2009; Prozialeck, 2013; Thévenod et al., 2019 (KLAASSEN; LIU; DIWAN, 2009; PROZIALECK, 2013; THÉVENOD et al., 2019).

A contaminação ambiental com Cd é de particular preocupação, já que esse metal tem como características formar compostos não biodegradáveis e de alta toxicidade para muitos organismos. Além disso, algumas formas do Cd têm alta solubilidade em água, logo, é facilmente absorvido por produtores primários e pode entrar na dieta humana via cadeia trófica. A contaminação ambiental pelo Cd não traz apenas efeitos ambientais adversos, mas também riscos para a saúde humana (BARRAZA et al., 2017; BOLAN et al., 2014).

Estima-se que a exposição ambiental a produtos químicos leve a custos que excedam aproximadamente 10 % do produto interno bruto (PIB) global, valor

esse que considerando o PIB global de 2021, seria de 9,6 trilhões de dólares americanos, aproximadamente seis vezes mais que o PIB brasileiro do mesmo ano, que foi de 1,6 trilhões de dólares ou 8,9 bilhões de reais. Não há informações específicas com relação aos gastos em saúde pública com complicações atribuídas diretamente ao Cd para o Brasil ou de forma global na literatura. Casos de osteoporose atribuídas ao Cd foram investigados em três países europeus, Bélgica, França e Espanha, utilizando os níveis urinários do metal em investigações realizadas nesses países. Os custos absolutos com fraturas variaram entre 0,12 (menor estimativa na Bélgica) e 2,6 bilhões de euros (maior estimativa na França) em mulheres com mais de 55 anos, sendo que cerca de 23 % dos casos foram atribuídos à exposição ao Cd (OUGIER et al., 2021)

Os danos à saúde causados pelo Cd não são um assunto atual. O conjunto de casos de uma doença que viria a ser chamada de *itai-itai* (“doloroso” na tradução simples do japonês) que ocorreu na cidade de Toyama no Japão a partir de 1910, acendeu o alerta para os riscos da contaminação com Cd. A cidade possuía uma das principais minas de metais no mundo que abastecia o desenvolvimento tecnológico da época e chegou a fornecer material para a Segunda Guerra Mundial (BERNHOF, 2013; KAJI, 2012).

A intensa atividade da mina poluiu o rio Jinzu com resíduos contendo Cd entre os anos 1910 e 1950. Como o rio era usado na irrigação, o solo, o cultivo de arroz, vegetais e peixes foram contaminados pelo metal. A população de Toyama ingeria cerca de 1000 µg/dia de Cd, algo em torno de 200 vezes mais que populações não expostas diretamente. Ao longo de muitos anos foram relatados pacientes com dor severa nos ossos, anemia, disfunção renal, osteomalácia, dificuldade de locomoção, osteoporose e fraturas espontâneas, terminando em morte devido a uma considerável perda de peso, a maioria das vítimas eram mulheres de meia idade, na Figura 2 é possível observar algumas modificações físicas de pacientes acometidos pela doença *itai-itai* (HORIGUCHI, 2014).



Figura 2: Estrutura corporal relacionada à doença itai-itai. Enfraquecimento dos ossos e alteração da estrutura/postura corporal em decorrência da contaminação severa por cádmio (DÖKMECI; ONGEN, 2009).

O Comitê Conjunto de Especialistas FAO-OMS sobre Aditivos Alimentares (*JEFCA – Joint FAO/WHO Expert Committee in Food Additives*) alterou no ano de 2010 a ingestão tolerável de $7 \mu\text{g/Kg}$ de peso corporal/semana (estabelecido desde 1988) para uma ingestão mensal de $25 \mu\text{g/Kg}$ de peso corporal, somado a um limiar de excreção urinária de $5,24 \mu\text{g/g}$ de creatinina. (EFSA, 2009; SATARUG; VESEY; GOBE, 2017).

No Brasil, um estudo examinou 30 amostras de chocolates comercializados no país, os resultados indicaram que os chocolates do tipo amargo apresentavam concentrações de Cd e Pb mais altos que os chocolates do tipo ao leite e branco. Além disso, foi possível notar que amostras com várias concentrações de cacau (em uma faixa de 34 a 85 %) da mesma marca indicaram uma correlação linear entre a porcentagem de cacau e as concentrações de Cd e Pb (VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014).

Outro estudo desta vez realizado no Japão, apontou pelo menos oito marcas de chocolate de 180 comercializadas no país com concentrações de Cd acima dos níveis máximos recomendados pela União Europeia. Abt e colaboradores (2020) examinaram 126 amostras de produtos à base de cacau ou de chocolate de origens diversas como América Latina, África, e de origem não definida e observaram correlações positivas entre a concentração de cacau

e a presença de Cd e Pb. Além destes, outros autores reportaram altos níveis de Cd e Pb em chocolates do tipo amargo ou *dark* quando comparados aos chocolates ao leite, sendo isso atribuído portanto, à alta porcentagem de cacau sólido nesses produtos (ABT et al., 2018; ABT; ROBIN, 2020; KATAOKA et al., 2018; VILLA; PEIXOTO; CADORE, 2014).

A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)* estabeleceu em 2001 o índice de exposição biológica de 5 µg/L no sangue e 5 µg/g de creatinina na urina para trabalhadores expostos por dispersão no ar. Atualmente a *ACGIH* indica para segurança de exposição respiratória níveis inferiores a 0,1 µg/L de Cd no ar (ACGIH, 2019; BULAT et al., 2009).

Há no Brasil atualmente uma carência no que se diz respeito ao monitoramento da contaminação, exposição e dos efeitos desse metal sobre a saúde dos brasileiros. No contexto ambiental existem valores limite para controle da contaminação, contudo, no âmbito ocupacional, o Brasil se utiliza de valores discrepantes, alguns deles utilizados em outros países, o que não garante uma compatibilidade dos níveis biológicos seguros (ou menos nocivos) de contaminação e exposição ao Cd com a realidade brasileira (COSTA, L. C., 2015).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece valores limite de concentração de Cd em corpos de água e águas subterrâneas, sendo de 0,01 e 0,1 mg/L em águas doces de classe 1, 2 e 3 que são respectivamente águas para consumo humano após tratamento simplificado (natação, irrigação e proteção de áreas indígenas), tratamento convencional (natação, irrigação, aquicultura) e tratamento avançado (irrigação de arbóreas, pesca amadora, dessedentação animal); 0,005 e 0,04 mg/L em águas salinas de classe 1 e 2 que são respectivamente águas de recreação de contato primário (proteção de comunidades aquáticas, aquicultura e pesca) e contato secundário (pesca amadora); 0,005 e 0,04 mg/L em águas salobras classe 1 e 2 que são respectivamente águas de recreação de contato primário (natação) e contato secundário (pesca amadora). Já em águas subterrâneas a variação vai de 5-50 µg/L dependendo do uso desde o consumo humano até dessedentação animal (CONAMA, 2005, 2008).

Os desastres e crimes ambientais são importantes formas de contaminação do ambiente por Cd. O colapso da barragem de Fundão em Mariana, Minas Gerais é considerado o episódio trágico mais significativo da história do Brasil. Cerca de 50 milhões de m³ de lama contendo rejeitos de minério de ferro foram despejados no ambiente. Esse desastre impactou de forma trágica o ecossistema do Rio Doce elevando os níveis de metais como Arsênio (As) e Cd no seu sedimento, esse material percorreu cerca de 650 Km ao longo do rio e alcançou o Oceano Atlântico. O Cd em especial alcançou níveis consideravelmente mais elevados que os encontrados anteriormente ao rompimento da barragem, ultrapassando os níveis considerados seguros segundo o CONAMA. Quando analisada a concentração de Cd diretamente na lama do rejeito de minério, identificou-se quantidades ainda mais elevadas, indicando o quão importante é o monitoramento dessas barragens para controle da controle e prevenção de contaminações de corpos de água (DUARTE et al., 2021).

Anos depois, outra tragédia ambiental ocorreu também em Minas Gerais, dessa vez na cidade de Brumadinho. Apesar do volume de rejeito de minério de ferro quatro vezes menor que o liberado no rompimento da barragem de Fundão (12 milhões de m³), o número de mortes foi muito superior, cerca de 270 vítimas fatais contra 19 da tragédia anterior. Pelo menos 2,7 km² foram destruídos pelos rejeitos de mineração, incluindo vegetação de Mata Atlântica, áreas de proteção permanente ao longo de cursos d'água e muitos prédios corporativos e particulares. Uma avaliação da concentração de Cd na água e no sedimento do Rio Paraopeba realizada cinco dias após o rompimento da barragem indicavam níveis com maior probabilidade de efeitos prejudiciais, contudo, cerca de um ano após outro identificou deposição abaixo do limite de detecção no sedimento e em amostras de peixes (PARENTE et al., 2021; VERGILIO et al., 2020).

Não há na legislação brasileira normas regulamentadoras, resoluções atualizadas ou qualquer menção a níveis seguros de Cd no sangue de trabalhadores. Apenas a Norma Regulamentadora nº 07 (NR-07) - Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional estabelece um indicador biológico de exposição excessiva (IBE/EE) para Cd na urina de 5 µg/g de creatinina. Os laboratórios clínicos brasileiros adotam valores de referência discrepantes para

concentrações de Cd no sangue que vão desde “níveis indetectáveis” até 10 µg/L, um deles usa como referência os 5 µg/L recomendado pelo *ACGIH*, demonstrando a falta de uma base para a padronização da monitorização desse metal na população (BEHRING, 2021; FLEURY, 2021; HAOMA, 2021; HERMES PARDINI, 2021; MINISTÉRIO DA ECONOMIA, 2020).

Um estudo realizado no Brasil demonstra a diferença nos níveis no sangue total de Cd entre populações com diferentes proximidades de áreas industriais. Enquanto a população localizada nas proximidades de regiões com atividade industrial possui maiores concentrações de Cd em amostras de sangue total (cerca de 0,43 µg·L⁻¹), a população de uma área mais distante de qualquer atividade industrial ou de mineração apresentava menores níveis de Cd (0,27·L⁻¹ aproximadamente) (NAKA et al., 2020).

Em uma investigação realizada em trabalhadores, constatou-se que indivíduos expostos mesmo que indiretamente como os da fundição de metais apresentaram concentração urinária de Cd duas vezes maiores que trabalhadores de setores de menor exposição, como os do setor administrativo (0,90 ± 0,80 e 1,91 ± 1,90 µg·L⁻¹ respectivamente) (PEIXE et al., 2014).

Um recente estudo de coorte (Projeto Infância e Poluentes Ambientais – PIPA/UFRJ) com foco nos efeitos sobre a saúde infantil da exposição a substâncias químicas (metais, pesticidas e plastificantes) dispersas no ambiente ao qual crianças estão expostas desde a concepção apresenta mesmo que forma preliminar, dados alarmantes. Observou-se que todas as 134 gestantes avaliadas apresentaram níveis séricos acima do detectável de arsênico, chumbo, mercúrio e cádmio. Após o parto, o sangue do cordão umbilical de todos os recém-nascidos também apresentou a presença desses metais, e com concentração ligeiramente mais alta que a das mães. Até o presente momento, o projeto se encontra em andamento e realizará o acompanhamento multidisciplinar do desenvolvimento das crianças até o quarto ano de vida (FRÓES-ASMUS et al., 2021).

O Cd é considerado um dos metais mais tóxicos e com efeitos adversos em vários processos biológicos (Figura 3). Considerando seus efeitos carcinogênicos, somados aos efeitos nocivos relatados nos tecidos nervoso,

renal e ósseo, esse metal e seus derivados óxido, sulfato e cloreto foram classificados pela União Europeia na categoria 1B. Do mesmo modo, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*IARC - International Agency of Research on Cancer*) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*US EPA - United States Environmental Protection Agency*) também classificaram o elemento e seus derivados no grupo 1 e classe B respectivamente (BARRAZA et al., 2017; GENCHI et al., 2020).

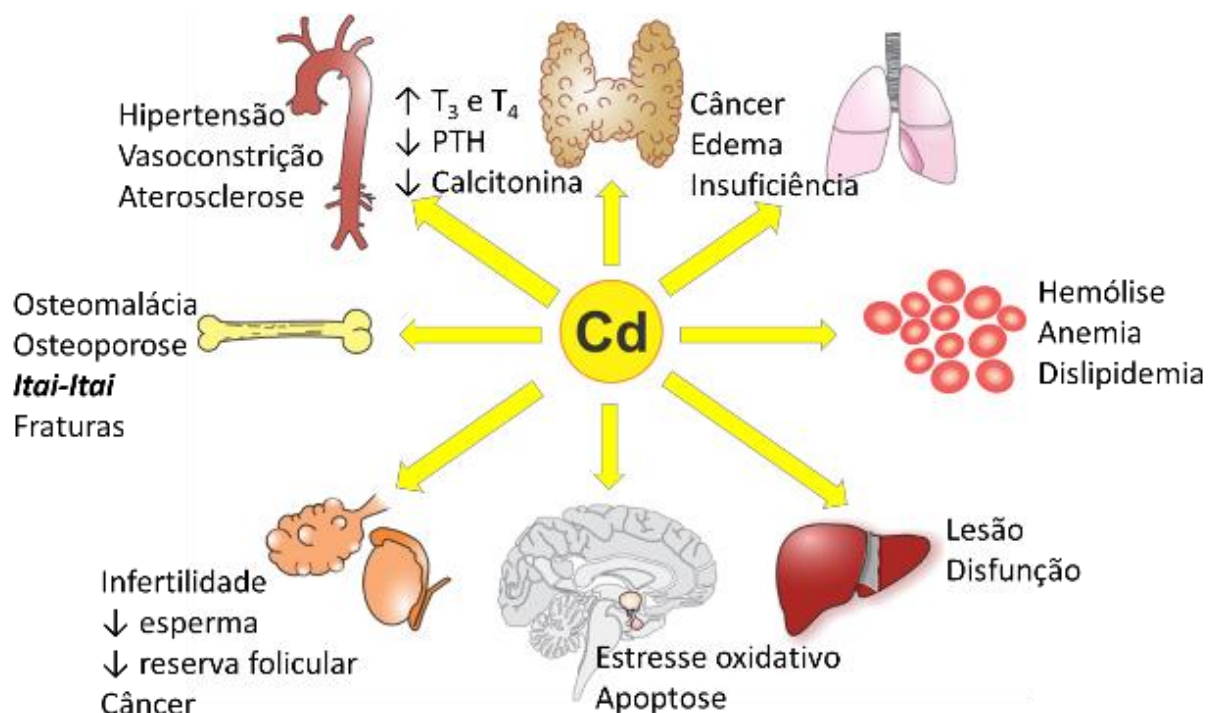


Figura 3: Órgãos e tecidos afetados pela exposição ao Cd. Baseado em Barraza et al., 2017; Genchi et al., 2020 (BARRAZA et al., 2017; GENCHI et al., 2020).

Sabe-se que vários órgãos podem ser alvos do Cd como o fígado, rins e o tecido adiposo branco (TAB). Este último, é um órgão dinâmico que possui a vital função de auxiliar na manutenção do estoque energético do corpo, papel essencial para a homeostase. Além dessa função, o TAB contribui com a liberação das adipocinas leptina e adiponectina, permitindo a comunicação metabólica entre os órgãos. A literatura apresenta evidências de que o Cd pode impactar de forma negativa as funções do TAB desregulando a adipogênese, lipogênese, lipólise e consequentemente a liberação das citocinas (ATTIA et al., 2022).

Investigações em humanos relacionam cádmio no sangue e síndrome metabólica. Utilizando parâmetros como pressão arterial, circunferência da cintura, níveis de glicose em jejum, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), 4084 participantes foram separados em portadores de síndrome metabólica e não portadores. O estudo apontou que pacientes com síndrome metabólica apresentavam valores mais altos de Cd do que o outro grupo e ainda foi possível identificar correlação positiva entre a síndrome e Cd sanguíneo em pessoas de até 60 anos, além de níveis mais altos em um subgrupo de mulheres (XING et al., 2022). Outra investigação com 140 indivíduos utilizou-se de informações sociodemográficas, escores de dislipidemia e diabetes e valores de Cd sérico. Foi identificada uma associação significativa entre a concentração de Cd no soro com alto risco de dislipidemia (AYOUB et al., 2021).

A leptina é uma importante adipocina que normalmente tem sua concentração sérica circulante proporcional à adiposidade corporal. Suas principais funções são regulação da ingestão alimentar, metabolismo lipídico, homeostase da glicose, controle da concentração de insulina, gasto energético, além de contribuir com eventos que envolvem a reprodução. A literatura relata alterações sobre o tecido adiposo sobre influência da exposição ao Cd, como redução do tamanho dos adipócitos, redução da expressão e consequente diminuição da concentração sérica de leptina, além disso, já foi relatado que a exposição crônica ao Cd reduz a expressão dos receptores de insulina em adipócitos, evento este que é um passo importante para o desenvolvimento de resistência à insulina, uma das características clássicas do diabetes melito do tipo 2 (ATTIA et al., 2022; KAWAKAMI et al., 2010, 2013; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2020; TSAI et al., 2012).

A toxicidade do Cd tem efeito deletério sob vários aspectos da biologia celular. Os íons Cd tem grande afinidade por macromoléculas contendo grupamentos -SH e dissulfeto. Deste modo, proteínas contendo esses grupos como as MTs e a glutathione (GSH) são grandes carreadores de Cd. No interior da célula o Cd age via produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre as quais radicais hidroxila, radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio, o acúmulo desses radicais livres nas células resulta no estresse oxidativo como ilustrado na Figura 4 (GENCHI et al., 2020).

O termo estresse oxidativo foi introduzido por Helmut Sies e destaca o desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidativas e as defesas antioxidantes, podendo levar a danos aos sistemas biológicos. Agentes endógenos e exógenos causam o estresse oxidativo, o termo espécies reativas de oxigênio abrange moléculas derivadas de O_2 , incluindo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$), ozônio e oxigênio singlete. A sinalização redox envolve a transdução de sinais em que agentes oxidantes funcionam como mensageiros secundários. Essa sinalização, assim como o estresse oxidativo, depende de estímulos endógenos e exógenos. Para que isso ocorra de forma fisiológica e não patológica é indispensável que ocorra uma regulação entre a quantidade de agentes oxidantes e agentes redutores como a glutatona e outros, garantindo assim, a homeostase redox. Doenças que envolvem o estresse oxidativo tendem a ter relação com a interrupção da homeostase redox, como na diabetes melito do tipo 2 (FORMAN; ZHANG, 2021).

O estresse oxidativo leva à oxidação e desregulação de importantes biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídeos. O Cd pode inibir a atividade e ou causar a depleção de enzimas importantes para o metabolismo celular como as ATPases, e também enzimas que contribuem para o controle do estresse oxidativo, ou seja, do sistema antioxidante como a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e lactato desidrogenase. Enzimas com o grupamento tiol inativado passam a ter sua função prejudicada, o que leva a uma desregulação intracelular. Deste modo, complicações como perda da integridade de membranas, baixo potencial mitocondrial, desregulação da síntese de ATP, ativação das vias da apoptose e outras podem ocorrer como ilustrado na Figura 4 (BIAGIOLI et al., 2008; BRANCA et al., 2020; CUYBERS et al., 2010; GENCHI et al., 2020; PRUELL; ENGELHARDT, 1980).

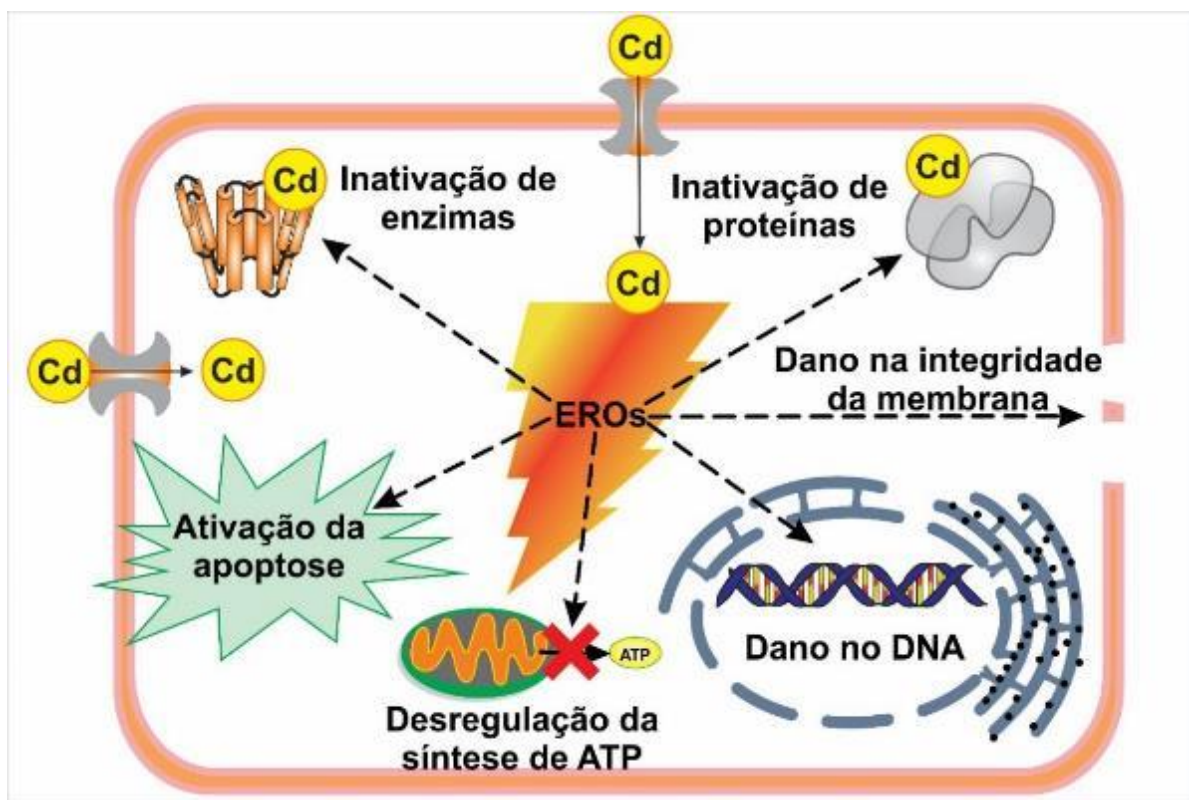


Figura 4: Ação direta e indireta do Cd na geração de EROs e dano intracelular. Baseado em Genchi et al., 2020.

O Cd pode causar desregulação não só das vias de modulação do estresse oxidativo, mas também da inflamação. A literatura vem relatando por meio de estudos *in vivo* e *in vitro* que a exposição ao Cd resulta na ativação de certos tipos celulares como as células de Kupfer no fígado, além de estimular a infiltração de neutrófilos e aumentar a secreção de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios via macrófagos. Os principais marcadores inflamatórios liberados sob exposição ao Cd são IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e diferentes quimiocinas em vários tecidos (LINDÉN et al., 2016; ODEWUMI et al., 2015; OLSZOWSKI et al., 2012; PAPA et al., 2014).

O sistema imune modula os processos inflamatórios e tem papel integral em ambos os eventos fisiológicos e patofisiológico da reprodução. Em ambos os indivíduos do sexo masculino e feminino, há uma relação próxima entre seus tratamentos reprodutivos com o sistema imune que é rigidamente regulado para garantir de forma eficiente as demandas para uma reprodução bem-sucedida. Em indivíduos do sexo feminino, eventos como ovulação, menstruação, implantação e o parto, estão associados a indução de mediadores inflamatórios.

A correta programação dos processos inflamatórios, sustentam a implantação e consequente sucesso da gestação. Portanto, a função do sistema imune se alterado durante, ou até mesmo antes da gestação, pode ter um impacto significativo não apenas na saúde reprodutiva, mais também na saúde a longo prazo da prole (YU; CHANG; SCHJENKEN, 2022).

Sabe-se que a reprodução feminina é modulada por alguns fatores endógenos como as alterações hormonais, inflamação e estresse oxidativo, mas também de fatores exógenos como a nutrição, temperatura/ambiente, e além desses, os contaminantes ambientais, que podem, dependendo do seu grau de exposição, alterar a fisiologia reprodutiva feminina (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; JABBOUR et al., 2009).

A exposição ao Cd aumenta o acúmulo desse metal ao longo do trato reprodutivo feminino (GALLAGHER; MOONGA; KOVACH, 2010; KUMAR; SHARMA, 2019; XUYING WAN et al., 2010). Esse acúmulo pode afetar o sistema reprodutivo feminino desregulando o ciclo reprodutivo, causando anovulação, infertilidade, e como demonstrado recentemente, o desenvolvimento de características observadas na síndrome do ovário policístico (SOP) e na falência ovariana prematura (FOP) (LEE et al., 2018; MONTEIRO et al., 2020; ZHANG, W. et al., 2017).

A SOP é uma desordem reprodutiva heterogênea caracterizada segundo os critérios de diagnóstico de Rotterdam por pelo menos duas características dentre três determinantes, a disfunção ovulatória parcial ou total, hiperandrogenismo clínico ou bioquímico e morfologia ovariana policística (GOODARZI et al., 2011; MCCARTNEY; CAMPBELL, 2020).

Contudo, a SOP é associada com muitas outras complicações, já que indivíduos com essa condição podem apresentar outras características reprodutivas, metabólicas, endócrinas e até mesmo psicológicas. Dentre essas, elevação dos níveis de hormônio luteinizante (LH) estimulados pelo hormônio hipotalâmico de liberador de gonadotrofinas (GnRH), além de estar associada a fatores de risco cardiometabólicos incluindo síndrome metabólica, esteatose hepática, resistência à insulina e dislipidemia (ÁLVAREZ-BLASCO et al., 2006; EHRMANN et al., 2005).

A FOP, também conhecida como insuficiência ovariana primária, é uma desordem associada com função folicular ovariana imprópria e depleção da reserva folicular (Nelson et al., 1982; Jiao et al., 2018). É uma condição caracterizada por ciclo reprodutivo irregular, redução da capacidade de produzir esteroides sexuais e níveis aumentados de gonadotrofinas como já reportado por exemplo no hipogonadismo hipergonadotrófico (BENETTI-PINTO et al., 2020).

SOP e FOP são condições que impactam aproximadamente 10 e 1 % das mulheres em idade reprodutiva respectivamente. Isso é preocupante porque o ovário desempenha um papel fundamental como modulador integrativo da saúde feminina reprodutiva e não reprodutiva (BHATTACHARYA; KEATING, 2012; DUMESIC et al., 2015). Ambas possuem subclassificações de acordo com o grau de severidade das manifestações clínicas ou com o estado clínico como ilustrado na Tabela 1 (NELSON, L. M., 2009; WALTERS et al., 2018).

Tabela 1 – Subclassificações da SOP e FOP de acordo com as características fisiopatológicas.

Síndrome do ovário policístico (SOP)			
	Características		
Severidade	Hiperandrogenismo	Oligovulação	Ovário policístico
Baixa	X	✓	✓
Média	✓	X	✓
Alta	✓	✓	X
Muito alta	✓	✓	✓
Falência ovariana prematura (FOP)			
	Características		
Estado clínico	Níveis de FSH	Reserva folicular	Ciclo reprodutivo
Normal	Normal	Normal	Regular
Oculta	Normal	Reduzido	Regular
Bioquímica	Elevado	Reduzido	Regular
Evidente	Elevado	Reduzido	Irregular/ausente

SOP: Síndrome do ovário policístico; FOP: Falência ovariana prematura. X: Característica não observada; ✓: Característica observada. Baseado em Nelson (2009) e Walters et al (2018).

Estudos relatam consequências prejudiciais da exposição de fêmeas ao Cd utilizando diferentes modelos de dose variando (0,09-8 mg/kg/dia), como

ciclo estral anormal, foliculogênese reduzida, níveis de hormônios sexuais anormais e inflamação do trato reprodutivo (TR) (A.T.S.D.R, 2002; WENG et al., 2014). Contudo, os estudos anteriores que examinaram tais efeitos, embora focados em aspectos específicos do eixo HPG, ainda carecem de uma descrição fisiológica que conecte os efeitos centrais e periféricos da função reprodutiva normal. Recentemente, alguns estudos mostraram que a exposição ao Cd contribuiu para o desenvolvimento de características da SOP e FOP em modelos de mamíferos (BELANI et al., 2016; KIRMIZI et al., 2020; LEE et al., 2018).

Entretanto, os mecanismos pelos quais a exposição ao Cd leva às características da SOP ou FOP pela desregulação do eixo HPG ainda precisam ser melhor esclarecidos. Além disso, não há relatos que mostram os efeitos do Cd sobre eixo HPG, bem como a modulação da função neuronal do GnRH com doses encontradas em trabalhadores ocupacionalmente expostos.

Desta maneira, a proposta deste estudo foi avaliar se a exposição em ratas de forma subaguda a um nível sérico de Cd semelhante ao reportado em populações ocupacionalmente expostas e abaixo de níveis considerados seguros internacionalmente tem potencial de alterar o eixo HPG e o metabolismo e prejudicando sua função e levando desta forma ao aparecimento de características semelhantes às aquelas presentes na SOP e FOP.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O Cd bem como os compostos derivados são utilizados há longos anos pela humanidade. Contudo, esse metal tem um grande potencial de toxicidade e se acumula com facilidade nos sistemas biológicos. De fato, os humanos podem se contaminar por inúmeras vias, respiratória, enteral e em menor quantidade por absorção cutânea. Sua exposição afeta inúmeros órgãos e sistemas no corpo humano, podendo, em alguns casos, causar alterações graves e irreversíveis e até mesmo levar à morte.

Como mencionado anteriormente, alguns fatores chamam a atenção para a seriedade da contaminação em indivíduos do sexo feminino, já que o Cd tende a se acumular mais nesses indivíduos podendo causar alterações no trato reprodutivo, levando a infertilidade, mas também estimulando o aparecimento de características de doenças com amplo grau de complicações como a FOP e SOP que estão associadas a problemas cardiovasculares e metabólicos, o que acaba por levar a um prejuízo na qualidade de vida.

Deste modo, este estudo foi elaborado para testar a hipótese de que a exposição ao Cd a um nível sérico semelhante ao observado em trabalhadores expostos ocupacionalmente, mimetizada de forma subaguda com CdCl_2 (100 ppm por 30 dias) possa causar irregularidades metabólicas e reprodutivas, como desregulação da função do eixo HPG, ciclo estral irregular, foliculogênese anormal, desregulação hormonal, alteração morfológica do trato reprodutivo e dos principais órgãos do metabolismo, com possível processo inflamatório e disfunção no controle do estresse oxidativo, e que essas complicações possam se correlacionar com as características de SOP e FOP.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição subaguda ao CdCl_2 sobre o eixo HPG de ratas e sua influência em características da SOP e FOP.

4. OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Quantificar o acúmulo de Cd ao longo do eixo HPG.
2. Avaliar a ação da exposição subaguda ao Cd sobre o eixo HPG.
3. Avaliar os efeitos do Cd sobre a função do trato reprodutivo.
4. Analisar a ação do Cd sobre o perfil metabólico.
5. Determinar ação do Cd sobre a morfometria no trato reprodutivo.
6. Determinar ação do Cd sobre a inflamação no trato reprodutivo.
7. Analisar o efeito do Cd sobre agentes pró-oxidantes no trato reprodutivo.
8. Investigar a ação do Cd sobre as características da SOP.
9. Investigar a ação do Cd sobre as características da FOP.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e exposição

Ratas Wistar adultas (12 semanas de idade, ± 200 g) foram mantidas em temperatura controlada, entre 23 e 25 °C, umidade controlada, entre 50-60 % e com ciclos claro/escuro de 12/12 horas. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (nº 33/2018). Todos os critérios de alojamento, manutenção, manipulação, anestesia e eutanásia seguiram as recomendações das Resoluções Normativas (RNs) do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). As principais RNs de consulta foram, RN nº 15, de 16/12/2013 que apresenta as recomendações de estrutura física e ambiente de roedores e lagomorfos, RN nº 33, de 18/11/2016, que trata de procedimentos em roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. E a RN nº 37, de 15/02/2018 que se refere aos procedimentos de eutanásia realizados em animais incluídos em atividades de ensino ou de pesquisa científica (BRASIL, 2013, 2016, 2018).

Para analisar alterações induzidas pela exposição subaguda de CdCl_2 no metabolismo, trato reprodutivo e o eixo HPG, ratas Wistar foram divididas em dois grupos: Grupo controle, identificado como CON ($n= 27$) receberam água filtrada potável, enquanto as ratas expostas a CdCl_2 identificadas como Cd ($n= 29$), receberam solução contendo CdCl_2 (100 mg. L^{-1} , Sigma, MO, EUA) continuamente por 30 dias.

O grupo exposto ao CdCl_2 foi referido no texto como Cd durante toda a investigação. A dose de CdCl_2 e a via oral de exposição foram selecionados medindo os níveis séricos de Cd e comparando as descobertas atuais com outras investigações anteriores que relataram toxicidade nos tecidos reprodutivos e metabólicos (ALMENARA; OLIVEIRA; PADILHA, 2020; OLIVEIRA et al., 2019; SAMARGHANDIAN et al., 2015).

As ratas receberam ração regular para ratos, foram pesadas, sua ingestão de alimentos (por caixa) foi medida a cada cinco dias e a ingestão de água (por caixa) foi avaliada a cada dois dias entre 9h e 10h da manhã durante um período de 30 dias (Figura 5).

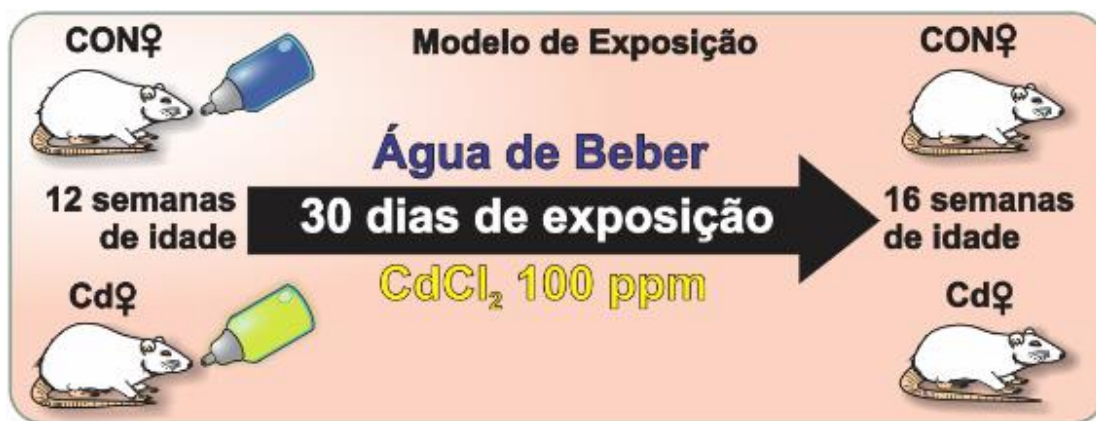


Figura 5: Modelo de exposição dos grupos CON e Cd ao longo de 30 dias.

5.2 Químicos

Cloreto de cádmio (CdCl_2) foi dissolvido em água destilada ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Sigma, MO, EUA).

5.3 Eutanásia

As ratas foram anestesiadas (cetamina $90 \text{ mg} / \text{kg}$ e xilazina $10 \text{ mg} / \text{kg}$, ip) no último dia de tratamento (dia 30) e eutanasiadas por exsanguinação. Amostras de sangue e a pesagem dos órgãos úmidos foram obtidos na manhã de fase de metaestro-diestro (M-D) e direcionados aos respectivos meios de conservação para histologia (PBS-formalina 10 %) ou dosagens químicas e bioquímicas (soro e tecidos congelados em freezer -80°C).

5.4 Ciclo estral

Realizou-se a coleta de lavado vaginal durante os 30 dias de tratamento com CdCl_2 a fim de acompanhar as fases do ciclo estral e determinar as alterações do no grupo Cd. Resumidamente, esfregaços vaginais foram coletados diariamente às 10:00 da manhã ao longo e examinados como preparações coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As fases do ciclo estral foram determinadas e classificadas como proestro, estro ou metaestro / diestro, com base na frequência identificada de células epiteliais cornificadas, nucleadas e leucócitos polimorfonucleares, conforme descrito em Nelson et al (1982).

5.5 Quantificação tecidual de Cádmio

Após a exposição ao CdCl_2 , sangue total e os órgãos, incluindo o hipotálamo, hipófise, ovários e úteros foram coletados para avaliação dos níveis de Cd ($n = 4$). Os níveis de Cd foram avaliados usando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, NexIon 300-D, PerkinElmer,

Alemanha) (SENA et al., 2017). O limite de detecção de Cd foi de 0,15 mg / mL para o soro, 0,008 mg / g para o hipotálamo e hipófise, 0,017 mg / g para ovários e 0,004 mg / g para útero.

5.6 Análise do perfil lipídico

Para avaliar o efeito do Cd sobre o metabolismo lipídico, os níveis de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos foram medidos pelo método enzimático colorimétrico (Kits Bioclin-Quibasa, K083, K071, K088 e K117, respectivamente). Os níveis de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) foram calculados conforme descrito em (ELEAZU; MADUABUCHI; ELEAZU, 2018).

5.7 Análise do perfil hormonal

Amostras de soro (n= 5-10) foram obtidas para determinar os níveis basais de LH e FSH por ensaios ELISA (ENZ-KIT 107 – LH e ENZ-KIT 108-0001 – FSH, Enzo life Sciences Inc. Farmingdale, NY, EUA). Os níveis de estradiol (E₂), progesterona (P₄) e testosterona (T) foram medidos usando os kits ELISA (EIA-2693, EIA-2693 e EIA-1559, respectivamente, DRG Instruments GmbH, Alemanha) (SENA et al., 2017). Os níveis de hormônio anti-Mülleriano (AMH) também foram avaliados pelo ensaio ELISA (CEA228Ra), os protocolos foram realizados de acordo com a bula dos fabricantes.

5.8 PCR RT-quantitativo (RT-PCR)

A fim de investigar alterações na expressão de mRNA a nível hipotalâmico, após a eutanásia, os cérebros das ratas foram dissecados e o hipotálamo isolado e armazenado a -80 °C até a avaliação seguindo o protocolo descrito por (QUENNEL et al., 2011) (n= 5). Todo o hipotálamo foi dissecado ao longo dos seguintes limites: lateralmente 2 mm de cada lado do terceiro ventrículo do quiasma óptico até a borda posterior dos corpos mamilares e o tálamo dorsalmente, conforme relatado em nossos estudos anteriores (MERLO et al., 2016; SENA et al., 2017). Para todos os ensaios, o RNA total foi isolado usando reagente TRI (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e convertido em cDNA por meio de transcrição reversa (Applied Biosystems). O PCR em tempo real foi realizado com o sistema SYBR Green (Thermo Scientific, MA, EUA) usando primers específicos relatados na Tabela 2. A expressão do mRNA alvo foi

normalizada para 18S e expressa como um valor relativo usando o método de ciclo (Ct) de limiar comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2 – Sequências de pares base de primers usados nos ensaios PCR em tempo real.

Gene	Primers	Eficiência %
GnRH	F:5'-CCTCTTAGGGATCTGCGAGG-3'	90.383
	R:5'-CTGGGCCAGTGCATTACATC-3'	
Kiss1	F:5'-CTGCTGCTTCTCCTCTGTGT-3'	109.873
	R:5'-TTAACGAGTTCCTGGGGTCC-3'	
Kiss1R	R:5'-TCACACCTACTGCAGTGAGG-3'	90.256
	F:5'-ATAGGGCCAGCAGGTTGTAG-3'	
AR	F:5'-TGGCGGTCCTTCACTAATGT-3'	93.801
	R:5'-GCACTGGCTGTACATTCGAG-3'	
LepR	F:5'-TCAACGGAGGAGAAAGGACC-3'	96.126
	R:5'-GTGGATGCTAATGTGCCCTG-3'	
mTOR	F:5'-CTTGCTGATCCTCAACGAGC-3'	93.661
	R:5'-TGCTGGGTGATTTCCTCCAT-3'	
TNF- α	F:5'-TACCTGGGAGGAGTCTTCCA-3'	92.748
	R:5'-ACTCCAAAGTAGACCTGCCC-3'	
AMHR2	F:5'-AAGCCTGTAGAGTGCAAGGT-3'	97.624
	R:5'-GTTCTCACTGCAGTCTCCT-3'	
18S	F:5'-CTGGATACCGCAGCTAGGAA-3'	100.783
	R:5'-GAATTCACCTCTAGCGGCG-3'	

F: Primer forward; R: Primer reverse; GnRH: Hormônio liberador de gonadotropina; Kiss1: Kisspeptina 1; Kiss1R: Receptor de Kiss1; AR: Receptor de andrógeno; LepR: Receptor de leptina; mTOR: Alvo mamífero da rapamicina; TNF- α : Fator de necrose tumoral- α ; AMHR2: Receptor hormonal anti-Mülleriano tipo 2; 18S: 18S RNA ribossômico.

5.9 Análise morfológica tecidual e histopatológica

A hipófise, ovários e útero foram fixados em tampão PBS-formalina 10 % neutra para as análises histológicas, morfométricas e histopatológicas para determinar alterações causadas pelo cádmio nos tecidos (n = 6). As seções de H&E foram realizadas e examinado para parâmetros morfológicos (MERLO et al., 2016; PODRATZ et al., 2015). Os folículos ovarianos e corpos lúteos (CL)

foram contados e expressos como unidades por área (mm^2). Os folículos ovarianos foram categorizados como primordial, primário, pré-antral e antral (MYERS et al., 2004). Os folículos atrésicos (At) e císticos (Cis) foram avaliados conforme descrito por Shi et al. (2009). Foram avaliados o número total de folículos ovarianos saudáveis, a soma dos folículos totais (saudáveis e não saudáveis) e a espessura da camada de células da granulosa ovariana (Figura 6) (CALDWELL et al., 2014). A morfometria uterina também foi avaliada com medição das camadas do miométrio, endométrio, e a contagem de glândulas uterinas (Figura 6). Além da morfometria, a análise histopatológica ovariana e uterina também foi realizada.

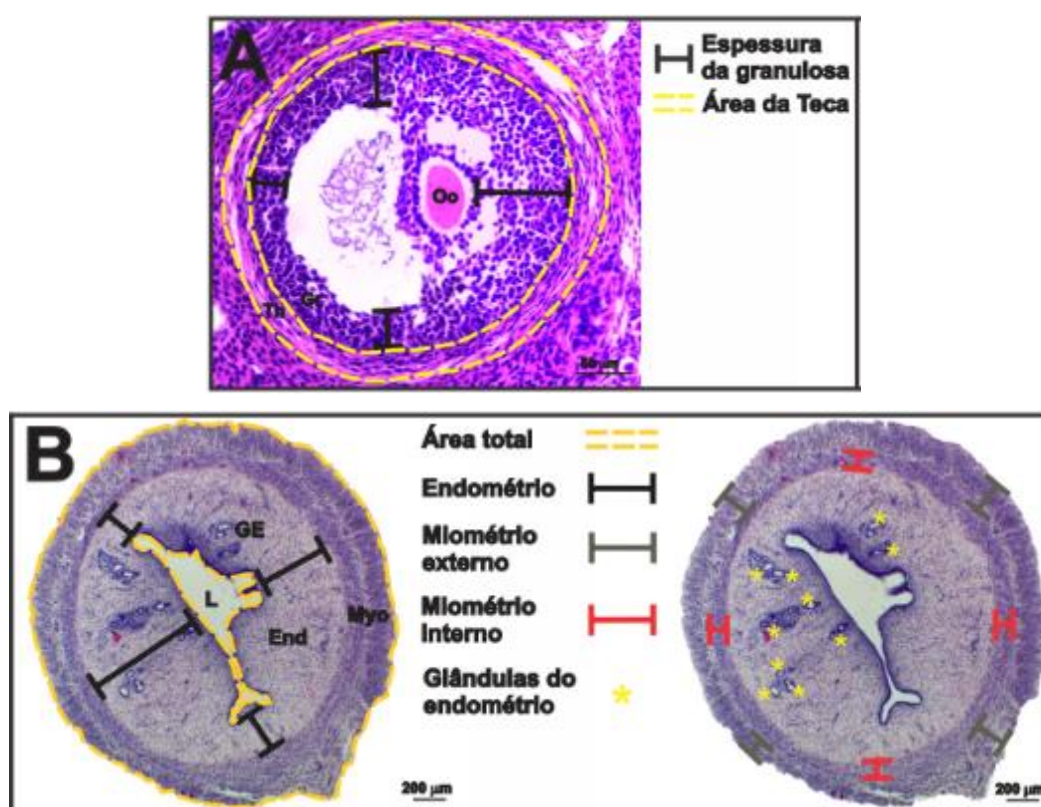


Figura 6: Avaliação de folículos antrais e morfometria uterina. (A) Avaliação da área da teca e espessura da granulosa. (B) Secção representativa do útero de rata mostrando os parâmetros avaliados.

5.10 Análise da inflamação tecidual

Para determinar se a exposição subaguda ao Cd alterou o perfil inflamatório nas ratas, quantificamos o número de mastócitos hipofisário,

ovariano e uterino (n= 5-6) utilizando a coloração de Alcian Blue (protocolo padrão da Sigma). Além disso, a atividade dos neutrófilos e macrófagos ovariana e uterina foi medida indiretamente pelos ensaios da mieloperoxidase (MPO) e da n-acetil-b-D-glucosaminidase (NAG).

5.10.1 Contagem de mastócitos

Cortes histológicos foram corados pelo método de *Alcian Blue*. Em microscópio óptico, foram contados mastócitos por corte tecidual, sendo três cortes em cada lâmina (n=5-6). Cada corte teve o valor da área quantificado pelo software ImageJ, o quantitativo total de mastócitos foi dividido pela respectiva área do corte. As contagens foram realizadas e imagens obtidas por meio da câmera Leica acoplada a microscópio (ICC50 HD Leica Microsystems).

5.10.2 Processamento tecidual para análise da atividade de NAG e MPO

Cerca de 100 mg de tecido ovariano ou uterino foram pesados e processados com homogeneizador em tampão 1 (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02M e Na₂EDTA 0,015 M), centrifugados a 9000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e fez-se a ressuspensão do pellet com soluções geladas de NaCl 0,2 % e NaCl 1,6 % + 5 % de glicose. Homogeneizou-se as amostras e foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 9000 G. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em tampão 2, contendo Na₃PO₄ e Brometo de Hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio 0,5 % p/v) (HETAB, importante detergente iônico que ajuda na solubilização e extração da MPO). As amostras foram homogeneizadas e divididas em duas partes iguais, sendo uma destinada à realização do ensaio de NAG e a outra para o ensaio do MPO (DA COSTA, C. S. et al., 2019).

5.10.3 MPO (Atividade de neutrófilos)

Após a divisão do homogenato, a amostra destinada à dosagem do MPO foi congelada e descongelada em freezer -80 por três vezes e centrifugadas por 15 minutos a 9000 G a 4°C. Após processamento da amostra, em uma placa de microtitulação de 96 poços pipetou-se em duplicata 25 µL do substrato TMB (tetrametilbenzidina) diluído em DMSO (dimetil sulfóxido), (Sigma-Aldrich, StLouis, USA), seguido de incubação por 5 minutos a 37°C. Por seguinte adicionou-se 100 µL de H₂O₂ a 0,002 % e incubou-se a 37 °C por 5 minutos. Após incubação, paralisou-se a reação com 100 µL de H₂SO₄. Após isso, foi feita a leitura da absorbância em 450 nm. A média das duplicatas foi usada para determinar da atividade enzimatica (DA COSTA, C. S. et al., 2019).

5.10.4 NAG (Atividade de macrófagos)

A avaliação da infiltração tecidual por macrófagos foi realizada com a outra parte do homogenato processado anteriormente. Inicialmente acresceu-se salina 0,9 % contendo Triton X-100 0,1 % vol/vol (Promega) e depois centrifugou-se por 10 minutos a 1400 G à temperatura de 4°C. Após processamento da amostra, 100 µL das amostras foram plaqueadas em duplicata para placa de microtitulação de 96 poços, foi adicionado 100 µL do substrato P-nitrofenil-Nacetil-β-D-glicosaminida (Sigma). Após uma incubação de 10 minutos, adicionou-se 100 µL de tampão glicina, a fim de para a reação. Para detecção da atividade de NAG, a leitura da absorbância foi realizada em 400 nm. A média das duplicatas foi usada para determinar a atividade enzimatica (DA COSTA, C. S. et al., 2019).

5.11 Deposição de colágeno tecidual

Para avaliar se a exposição ao Cd alterou o remodelamento tecidual nas ratas expostas em comparação ao grupo controle, cortes hipofisários, ovarianos e uterinos (n = 5-6) foram corados com *Picrosirius Red*. Vinte fotomicrografias foram obtidas sob a objetiva de 10x. As análises foram realizadas em programa FIJI versão 3.7.3 (*ImageJ* 2018). As imagens foram convertidas em imagens em preto e branco de alto contraste para visualizar as fibras de colágeno coradas. As imagens foram obtidas na câmera Leica acoplada a microscópio (ICC50 HD Leica Microsystems). Os resultados representam a porcentagem de colágeno depositado nos tecidos (DA COSTA, C. S. et al., 2019).

5.12 Análise do estresse oxidativo

O aumento no estresse oxidativo é uma característica comum em indivíduos expostos ao Cd, para confirmar se o mesmo ocorreu em nosso modelo, avaliamos o estresse oxidativo por análise de espécies reativas de oxigênio como os ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela fluorescência de dihidroetídeo (DHE). Além disso, os níveis do antioxidante intracelular glutatona reduzida (GSH) e dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinação da peroxidação lipídica foram avaliados nas amostras ovarianas e uterinas (n = 6).

5.12.1 Glutatona reduzida (GSH).

Pesou-se 150 mg de tecido em um microtubo (n=6), e em gelo homogeneizou-se junto de 100 μ L de PBS 1x e 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA 12,5 %) com homogeneizador de tecidos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 800 G a 4°C. Pipetou-se então em duplicata 40 μ L do sobrenadante para microplaca de 96 poços, juntamente com 200 μ L de TRIS-HCL 0,4 M e 20 μ L de DTNB (3,95 mg/mL). Pipetou-se também uma curva padrão de GSH nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 e 0,01 mg/mL. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 415 nm, e o cálculo de concentração foi realizado em utilizando-se a curva padrão de GSH (MERLO et al., 2016).

5.12.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foram pesados e processados 150 mg de tecido em gelo, as amostras foram homogeneizadas com 1 mL de tampão salina-fosfato (PBS 1x) em microtubos devidamente identificados. O volume de 200 μ L dos homogenatos foram transferidos e homogeneizados em vortex em criotubos, juntamente com 200 μ L de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 1 %) e 100 μ L de ácido fosfórico (7 %). Os criotubos então foram alocados em estante de arame e levadas à estufa a 100°C por 15 minutos. Passado esse tempo os tubos foram colocados em caixa térmica e cobertos com gelo, onde permaneceram por 10 minutos. Após isso, adicionou-se 500 μ L de butanol aos tubos e os mesmos foram levados à centrifugação por 5 minutos a 360 G. Pipetou-se 250 μ L da fase sobrenadante para microplaca de 96 poços, em duplicata, igualmente ao branco (HCl 1N, TBA 1 % e ácido fosfórico 7 %; proporção 1:1:1). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda 532.

5.12.3 Ensaio de ânion superóxido

Para detectar os níveis de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) nos ovários e no útero, partes destes órgãos foram fixados em solução de Krebs-HEPES (30 % de sacarose) e emblocados em OCT e seccionados em uma espessura de 8 μm . As criosecções de tecido embebidos em OCT foram descongeladas e lavadas em Krebs-HEPES a fim de retirar o excesso do meio de meio OCT. e incubados com o corante fluorescente sensível a $O_2^{\bullet-}$ dihidroetídio (DHE) a 37°C por 30 minutos no escuro (MERLO et al., 2019). Imagens foram obtidas usando um microscópio Leica com detector de fluorescência a 585 nm (DM 2500). A intensidade do sinal, indicando a produção de $O_2^{\bullet-}$, foi analisada na área de interesse em 20 secções do órgão. Processamento e análise microscópica foram realizados no Laboratório de Histologia Molecular e Imuno-histoquímica, UFES. Os níveis de $O_2^{\bullet-}$ indicam estresse oxidativo.

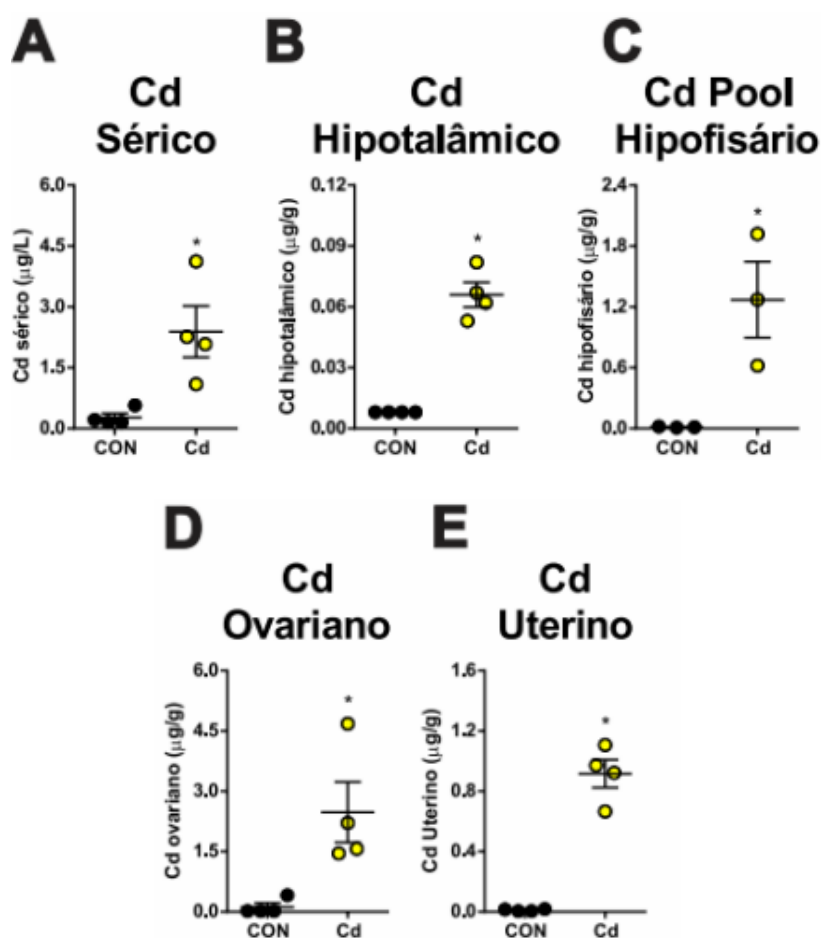
5.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para encontrar possíveis outliers nos resultados, o teste de Grubbs bilateral foi usado. Quando o teste identificou um outlier, usamos um método ROUT adaptado para detectar quaisquer outliers daquela coluna de resultados e os removemos de acordo com a configuração de Q em 1 % (alfa = 0,01). Os testes omnibus D'Agostino e Pearson foram usados para avaliar a normalidade dos dados. Comparações entre os grupos foram realizadas usando os testes t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. ANOVA de duas vias foi utilizada para gráficos de linhas para verificar a interação entre as variáveis independentes (tempo e deformação) e foi seguida pelo pós-teste de Turkey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para avaliar a relação entre os parâmetros avaliados, a correlação de Spearman ou de Pearson foi usada quando uma distribuição não gaussiana ou gaussiana fosse respectivamente detectada. Todas as correlações foram obtidas a partir de valores de animais emparelhados. Quando a significância estatística foi identificada, testamos se a regressão linear ou não linear foi melhor ajustada. As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism versão 6.00 (La Jolla, CA, EUA).

6. RESULTADOS

6.1 Os níveis de cádmio tecidual se encontraram elevados nas ratas expostas ao Cd

As ratas expostas ao Cd apresentaram níveis séricos de Cd significativamente mais elevados em comparação com as ratas CON (CON: $0,27 \pm 0,11 \mu\text{g/L}$; Cd: $2,39 \pm 0,63 \mu\text{g/L}$; $p < 0,05$, Figura 7A). Um aumento nos níveis de Cd foi verificado no hipotálamo (CON: $0,008 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$; Cd: $0,06 \pm 0,006 \mu\text{g/g}$; $p < 0,05$, Figura 7B) e hipófise das ratas Cd em comparação com o grupo CON (CON: $0,01 \pm 0,005 \mu\text{g/L}$; Cd: $1,27 \pm 0,64 \mu\text{g/g}$; $p < 0,05$, Figura 7C). Níveis aumentados do Cd ovariano (CON: $0,12 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$; Cd: $2,48 \pm 0,75 \mu\text{g/g}$; $p < 0,05$; Figura 7D) e uterino (CON: $0,01 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$; Cd: $0,91 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$; $p < 0,05$; Figura 7E) foram identificados nas ratas Cd em comparação com as ratas CON. Foram observadas correlações lineares positivas entre os níveis de Cd sérico e hipotalâmico, ovário e uterino ($p = 0,048$, $p = 0,012$ e $p = 0,010$, respectivamente, Figura 7F, G e H).



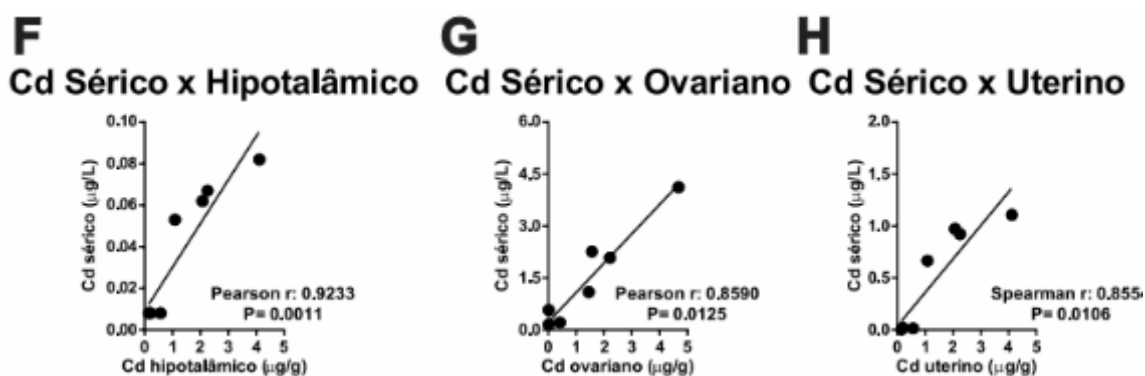


Figura 7: Quantificação tecidual de cádmio em ratos CON e Cd. (A) Cd sérico. (B) Cd hipotalâmico. (C) Cd hipofisário. (D) Cd Ovariano. (E) Cd uterino. (F, G e H) Correlações positivas entre a concentração sérica e tecidual. Valores expressos como média $\pm$ EPM. $n=3-4$ * $p < 0,05$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. Correlação de Spearman ou de Pearson foi usada quando uma distribuição não gaussiana ou gaussiana.

6.2 O Cd não alterou o consumo alimentar e hídrico, mas alterou a massa corporal

Não foram identificadas alterações significativas na ingestão alimentar e hídrica durante os 30 dias de exposição ($p > 0,05$, Figura 8A e B). As ratas Cd apresentaram diminuição da massa corporal, que já era perceptível no dia 10 e continuou até o dia 30 em comparação com as ratas CON ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, Figura 8C).

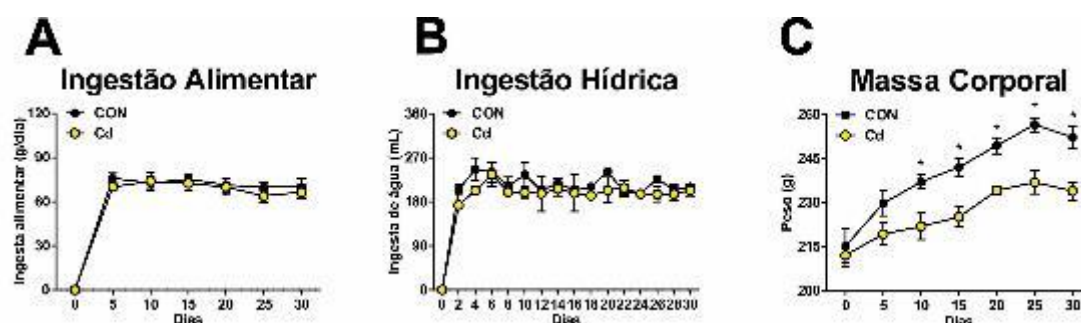


Figura 8: Consumo alimentar e hídrico e a massa corporal das ratas CON e Cd. (A) Ingestão alimentar (ração) em gramas. (B) Ingestão hídrica em mL. (C) Massa corporal. Valores expressos como média $\pm$ EPM. $n=11-13$ * $p < 0,05$. ANOVA de duas vias seguido de teste de pós-teste de Turkey.

6.3 Exposição ao Cd reduziu a massa das gorduras, adiposidade e dos ovários

Nenhuma mudança significativa no tecido adiposo branco parametrial foi verificada, embora a exposição ao Cd tenha diminuído esse depósito de gordura em aproximadamente 20,3 % com ratas CON ($p = 0,071$, Figura 9A). Além disso, a exposição ao Cd reduziu a massa do tecido adiposo perivesical, retroperitoneal e perirrenal em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 9B, C e D). Como esperado, a exposição ao Cd reduziu a adiposidade em comparação com CON ($p < 0,05$, Figura 9E).

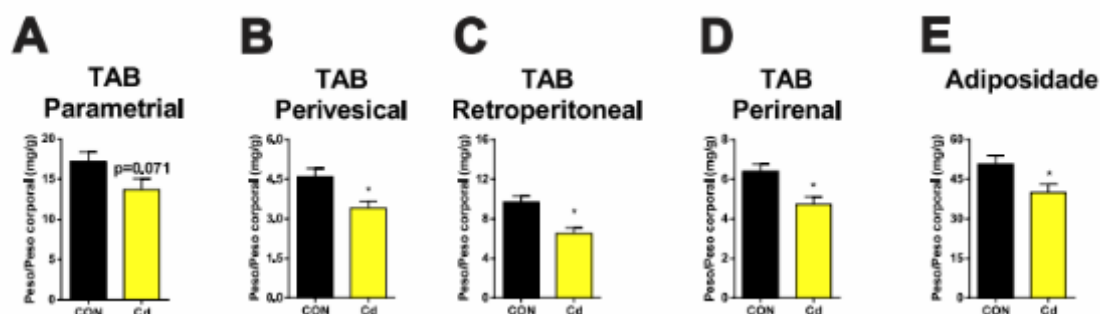


Figura 9: Massa dos depósitos de tecido adiposo branco e adiposidade das ratas CON e Cd. (A) TAB parametrial. (B) TAB perivesical. (C) TAB retroperitoneal. (D) TAB perirrenal. (E) Adiposidade. Valores expressos como média $\pm$ EPM. $n=11-13$ * $p < 0,05$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos.

A exposição ao Cd não alterou a massa do fígado, gordura mesentérica, pâncreas, glândula tireoide, rins, glândulas adrenais, baço, hipófise e útero em comparação ao grupo CON (Tabela 3, $p > 0,05$, $n = 11$ e 13). Uma redução na massa ovariana foi constatada nas ratas Cd em comparação com ratas CON (Tabela 3, $p < 0,05$).

Tabela 3 – Massa dos órgãos corrigida pela massa corporal.

Órgãos	CON (mg/g)	Cd (mg/g)	P
Fígado	38,34 ± 3,18	35,15 ± 1,16	0,05
TAB mesentérico	12,99 ± 0,97	11,00 ± 0,57	0,30
Pâncreas	2,49 ± 0,17	2,76 ± 0,15	0,25
Tireoide	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,31
Rins	6,95 ± 0,28	7,03 ± 0,17	0,81
Adrenais	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,32
Baço	2,32 ± 0,10	2,08 ± 0,10	0,16
Hipófise	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,41
Útero	1,96 ± 0,09	1,79 ± 0,10	0,61
Ovários	0,30 ± 0,02	0,24 ± 0,01*	0,03

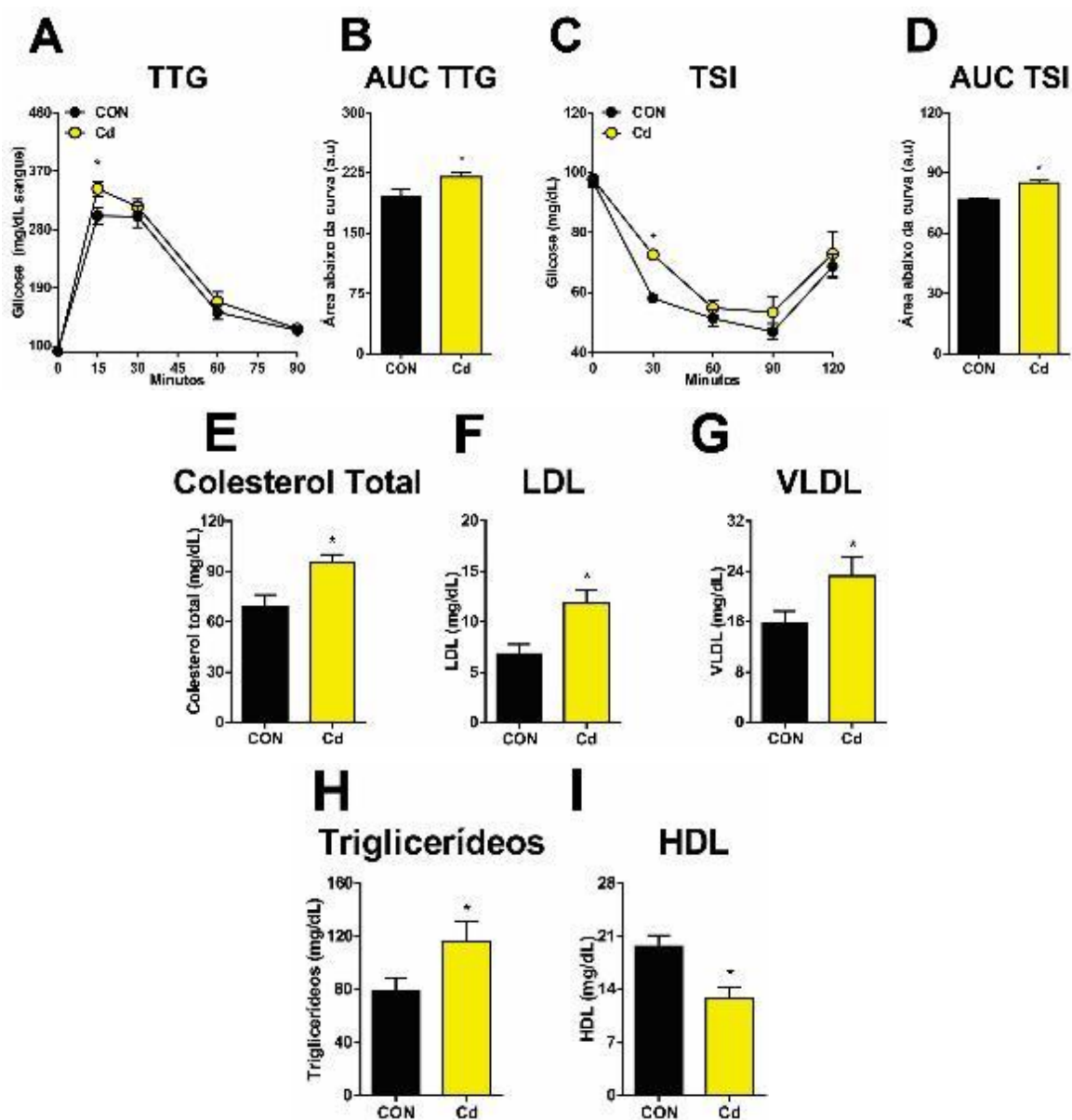
Valores expressos como média ± erro padrão da média. CON: Controle; Cd: Cádmio; (mg/g): miligrama de massa do órgão por grama de massa corporal; p: Valor de p; n=11-13. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos.

6.4 Ratas expostas ao Cd apresentaram alteração no perfil metabólico

Verificou-se aumento dos níveis de glicose no teste de tolerância à glicose (TTG) aos 15 minutos e área sob curva em ratas Cd em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 10A e B). Um aumento dos níveis de glicose no teste de sensibilidade à insulina (TSI) em 30 min e área sob curva foram identificados em ratas Cd em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 10C e D).

Perfil lipídico anormal foi constatado nas ratas expostas ao Cd em comparação com as ratas CON. Especificamente, foram identificados aumentos nos níveis de colesterol sérico total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e triglicerídeos em ratas expostas ao Cd em comparação com o grupo CON ($p < 0,05$, Figura 10E, F, G e H).

Observou-se redução nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) em ratas Cd em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 10I). Identificou-se a redução nos níveis séricos da insulina no jejum nas ratas Cd em comparação ao grupo CON ($p < 0,05$, Figura 10J) e uma elevação dos níveis séricos da leptina nos animais expostos ao Cd em comparação ao CON ($p < 0,05$, Figura 10K).



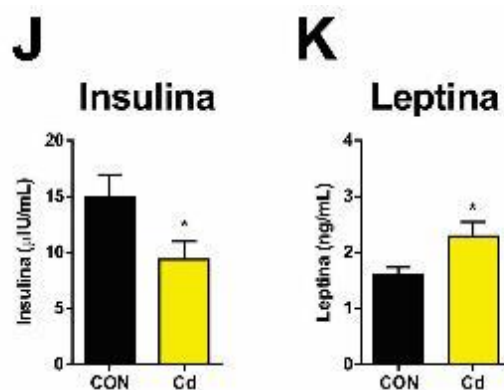


Figura 10: Perfil do metabolismo glicêmico e lipídico das ratas CON e Cd. (A) Teste de tolerância à glicose. (B) Área sob a curva do TTG (AUC - Area under curve). (C) Teste de sensibilidade à insulina. (D) Área sob a curva do TSI, (AUC - Area under curve). (E) Colesterol total. (F) Lipoproteína de baixa densidade (LDL – low-density lipoprotein). (G) Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL – very low-density lipoprotein). (H) Triglicerídeos. (I) Lipoproteína de alta densidade (HDL – high-density lipoprotein). (J) Insulina sérica no jejum. (K) Leptina sérica. Valores expressos como média $\pm$ EPM. $n = 6-8$ * $p < 0.05$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. ANOVA de duas vias seguido de teste de pós-teste de Turkey.

6.5 Alteração no ciclo estral foi observado nas ratas expostas ao Cd

O ciclo estral de ratas CON e Cd foi avaliado diariamente por esfregaço vaginal e avaliado de acordo com Nelson et al. (1982). Durante a fase do proestro, os esfregaços vaginais de ratas CON tinham poucas células epiteliais cornificadas (Co) misturadas com várias células epiteliais nucleadas (Nu), indicando proestro normal. Em ratas expostas com Cd, os esfregaços vaginais continham uma mistura de células nucleadas e cornificadas, e leucócitos polimorfonucleares (PM), indicando uma fase de proestro anormal.

Além disso, as ratas expostas ao Cd apresentaram ciclos irregulares e mais longos em comparação com ratas CON ($p < 0,01$, Figura 11A e B). As ratas expostas ao Cd passaram menos dias na fase estro ($p < 0,05$, Figura 11C) e mais dias na fase metaestro-diestro ($p < 0,01$, Figura 11C) em comparação com as ratas CON, respectivamente. Ratas expostas ao Cd não apresentaram alteração na duração da fase de proestro em comparação com ratas CON ($p = 0,051$, Figura 11C).

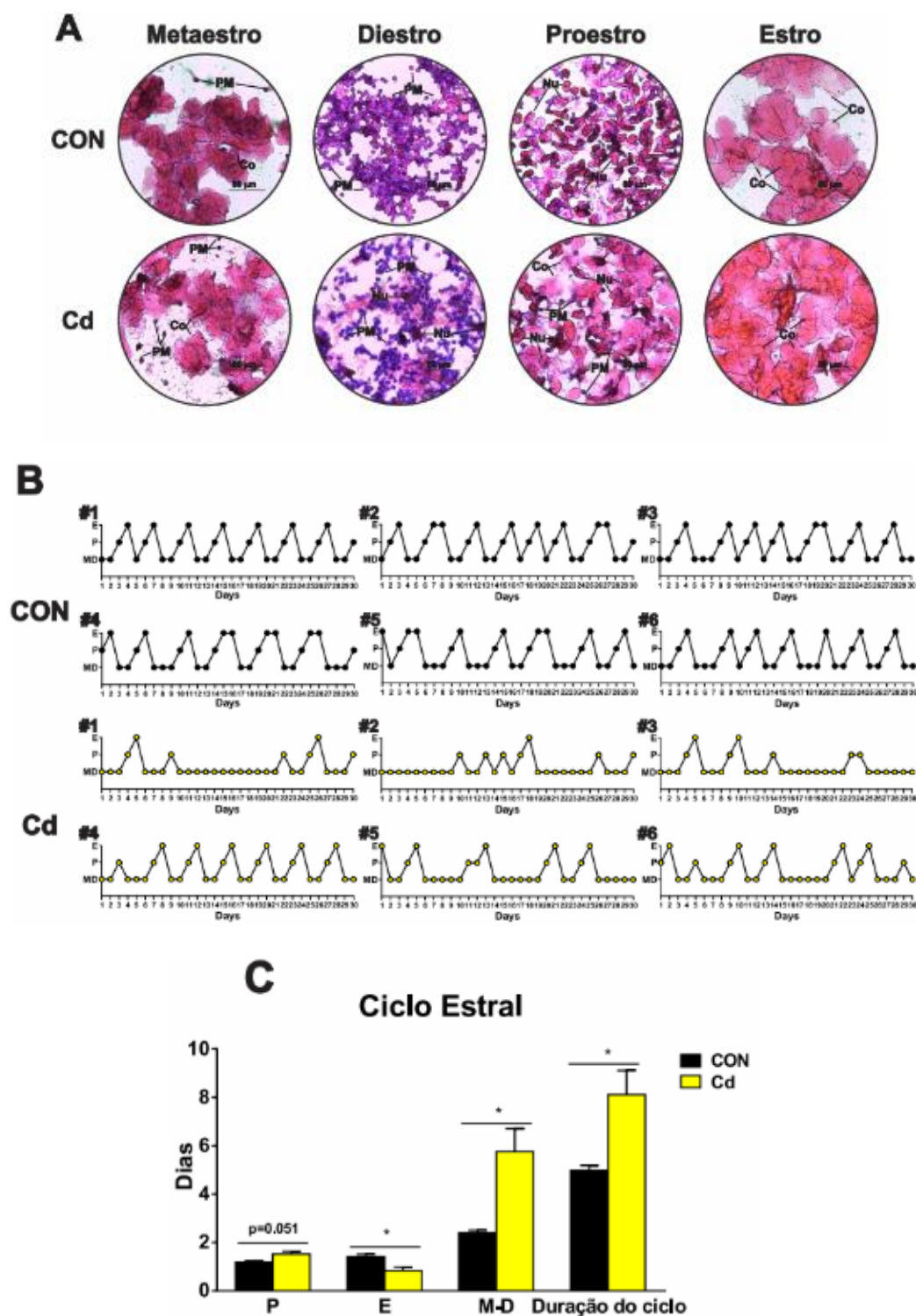


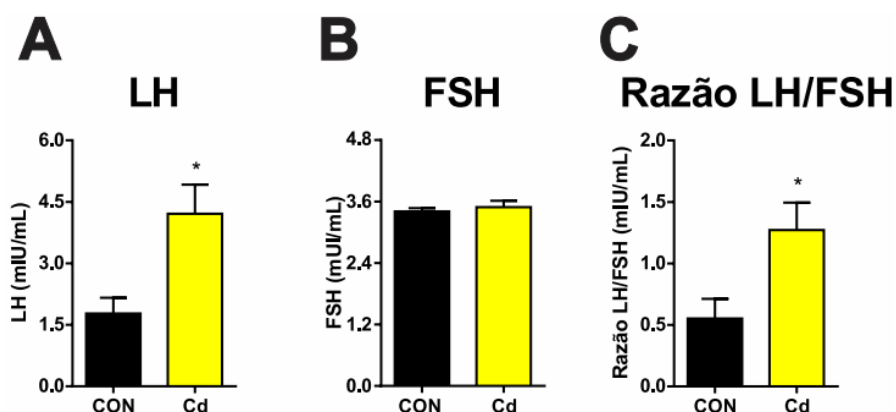
Figura 11: Avaliação do ciclo estral das ratas CON e Cd. (A) Imagens representativas dos esfregaços vaginais ao longo do ciclo estral de ratas COM e Cd. (B) Representação gráfica da ciclicidade das ratas ao longo de 30 dias. (C) Quantificação dos dias de permanência em cada fase do ciclo estral e a duração do ciclo. P: proestro. E: estro. M-D: metaestro-diestro. Valores expressos como média $\pm$ EPM. $n=5-7$ * $p < 0.05$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos.

6.6 Ratas expostas ao Cd apresentaram aumento de LH e alteração no perfil de controle gênico do hipotálamo

Os valores de LH do soro basal estavam aumentados nas ratas expostas ao Cd em comparação com as ratas CON ($p < 0,05$, Figura 12A). Não foram identificadas alterações significativas nos níveis de FSH do soro basal entre ratos expostos de CON e Cd ($p > 0,05$, Figura 12B). A razão LH/FSH foi realizada e notou-se um aumento na razão nas ratas Cd em comparação com as ratas CON ($p < 0,05$, Figura 12C).

As expressões hipotalâmicas do mRNA do GnRH e do AMHR2 não foram significativamente diferentes entre ratas expostos ao CON e ao CD ($p > 0,05$, Figura 12D e K). A exposição ao Cd aumentou a expressão do mRNA da Kiss1 e diminuiu a expressão do mRNA do Kiss1R em comparação com as ratas CON ($p < 0,05$ e $p < 0,05$, Figura 12E e F).

Verificou-se aumento na expressão mRNA do AR em ratas expostos em Cd em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 12G). Foi possível notar ainda a redução na expressão mRNA do LepR em ratas expostos em Cd em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 12H). Além disso, constatou-se aumento na expressão mRNA do mTOR em ratas expostas ao Cd em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 12I) e a redução da expressão mRNA do TNF- α em ratas expostas ao Cd em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 12J).



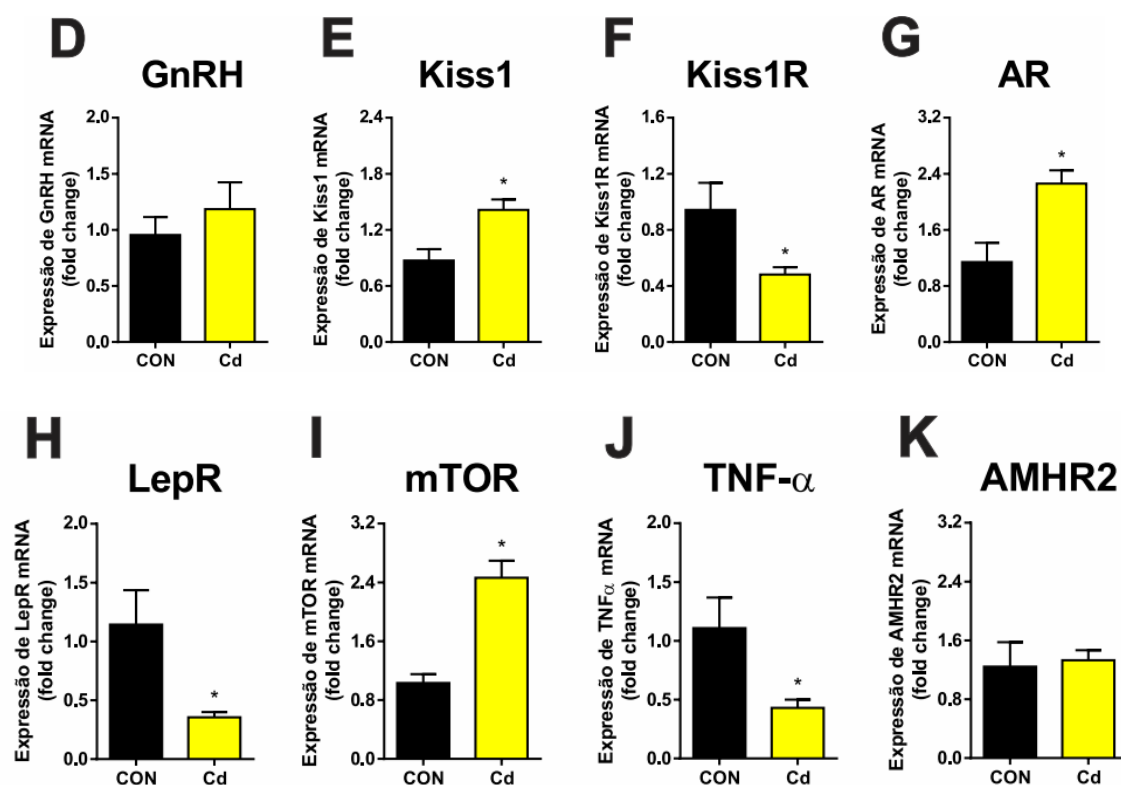


Figura 12: Níveis de gonadotrofinas e expressão gênica em ratos CON e Cd. (A) Níveis séricos do hormônio luteinizante (LH). (B) Níveis séricos do hormônio folículo-estimulante (FSH). (C) Razão LH/FSH. (D) Expressão do mRNA do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). (E) Expressão do mRNA da kisspeptina 1. (F) Expressão do mRNA do receptor da kisspeptina 1 (Kiss1R). (G) Expressão do mRNA do receptor de androgênio (AR). (H) Expressão do mRNA do receptor de leptina. (I). Expressão do mRNA do alvo mecânico da rapamicina (mTOR - mechanistic target of rapamycin). (J) Expressão do mRNA do fator de necrose tumoral α . (K) Expressão do mRNA do receptor do hormônio anti-Mülleriano. Fold change - valor de expressão de cada gene na amostra teste normalizado pelo valor da amostra controle. Valores expressos como média $\pm$ EPM. $n = 5$. * $p < 0.05$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos.

6.7 A exposição ao Cd levou à redução dos níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano

Não foram identificadas diferenças significativas nos níveis de soro P₄, T e E₂ entre as ratas CON e Cd expostas (Tabela 4, $p > 0,05$). Da mesma forma, nenhuma alteração significativa nas relações P₄/T, P₄/E₂ e E₂/T foi constatada (Tabela 4, $p > 0,05$). Observou-se redução dos níveis de AMH em ratos de Cd em comparação com ratos CON (Tabela 4, CON: $7,07 \pm 0,41$ ng/mL; Cd: $4,82 \pm 0,41$ ng/mL; $p < 0,01$).

Tabela 4 – Níveis dos hormônios sexuais.

	CON	Cd	p
Hormônios			
P ₄ (ng/mL)	27,50 ± 6,53	16,67 ± 4,60	0,22
T (ng/mL)	0,49 ± 0,05	0,60 ± 0,12	0,43
E ₂ (ng/mL)	33 ± 6,69	33 ± 1,59	0,97
AMH (ng/mL)	7,07 ± 0,41	4,82 ± 0,41*	0,01
Ratio			
P/T	67,07 ± 20,70	26,43 ± 4,94	0,09
P/E	1,17 ± 0,40	0,50 ± 0,13	0,15
T/E	0,01 ± 0,01	0,018 ± 0,01	0,63

CON: Controle; Cd: Cádmio; p: valor de p; P₄: Progesterona; E₂: Estradiol; T: Testosterona; AMH: Hormônio anti-Mülleriano; P/T: Razão progesterona e testosterona; P/E: Razão progesterona e estradiol; T/E: Razão testosterona e estradiol n=4. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos.

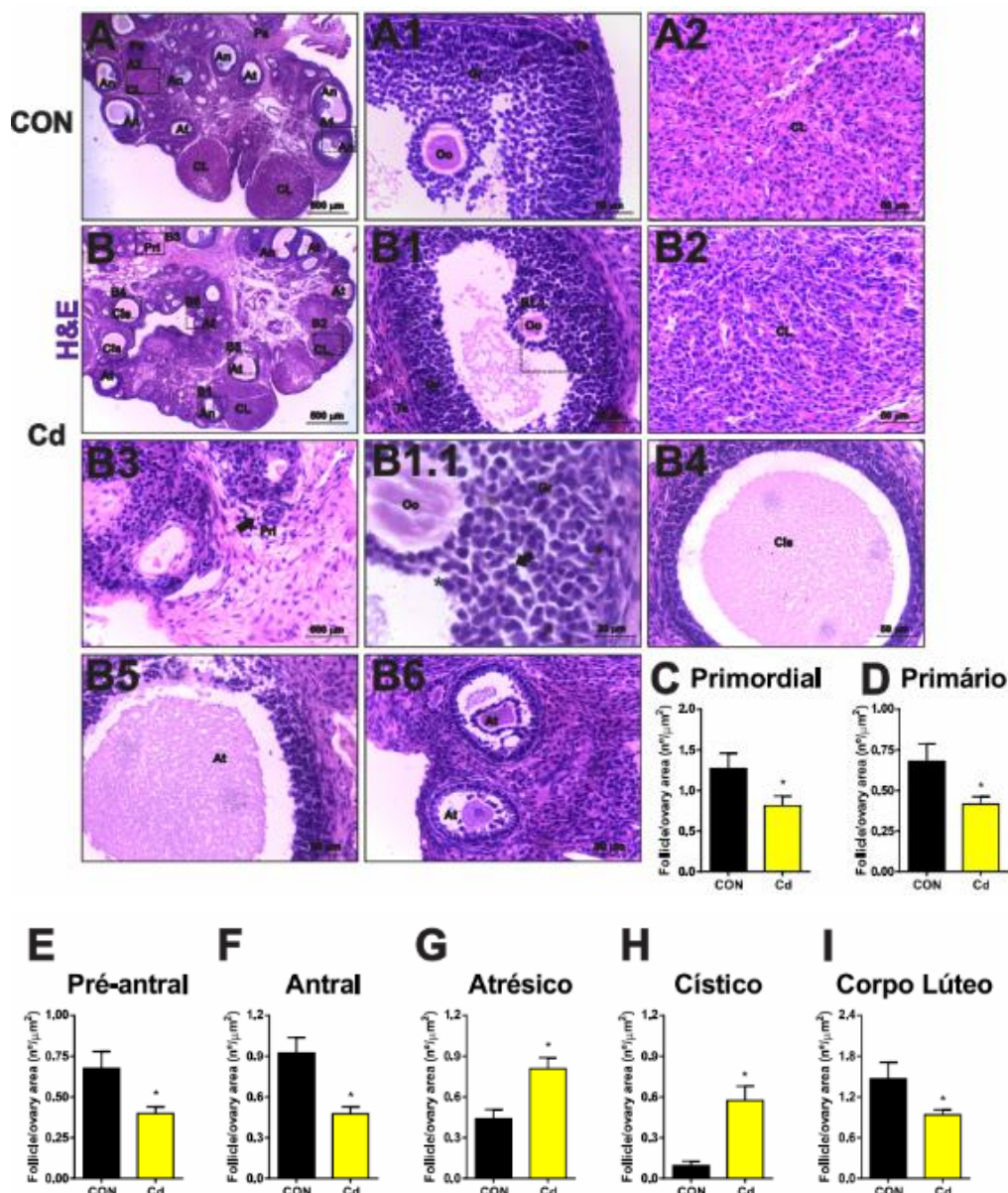
6.8 Exposição ao Cd reduziu a reserva folicular e alterou o desenvolvimento dos folículos ovarianos

As secções histológicas ovarianas do grupo CON apresentaram folículos ovarianos em todos os estágios normais de desenvolvimento, (Figura 13A, A1) e continham corpos lúteos (CL, Figura 13A2). Contudo, os ovários do grupo Cd apresentaram morfologia irregular, vacuolização inicial em folículos primários ovarianos (seta, Figura 13B3 e B6), e número reduzido de CL (Figura 13B e B2). Especificamente, um menor número de folículos primordiais e primários foram identificados em ratas de Cd em comparação com ratas CON ($p < 0,05$, Figura 13C e D), sugerindo uma redução da reserva ovariana em ratas de Cd.

A exposição ao Cd causou a presença de células inflamatórias (asterisco e flecha, Figura 13B1.1) e atresia em pequenos folículos antral, (Figura 13B6). As secções ovarianas das ratas Cd tiveram um número reduzido de folículos ovarianos pré-antral e antral em comparação com os ovários CON ($p < 0,01$, Figura 13E e F). Os ovários do grupo Cd tiveram um número aumentado de

folículos atrésicos (Figura 13B e B5) e císticos (Cys, Figura 13B, B4) comparados aos ovários ao CON ($p < 0,01$, Figura 13G e H).

Além disso, foi possível verificar a redução do número de CL nos ovários de Cd em comparação com os ovários CON ($p < 0,01$, Figura 13I). Foi ainda possível identificar a redução da espessura da granulosa nos ovários de Cd em comparação com os ovários CON ($p < 0,05$, Figura 13J). Não foram constatadas alterações significativas na área da teca entre ratas CON e Cd ($p > 0,05$, Figura 13G). Entretanto, a redução no número de folículos ovarianos saudáveis, folículos totais e o aumento de folículos não saudáveis foram verificados em ratas de Cd em comparação com CON (tabela 5).



*Figura 13: Exposição ao Cd e desenvolvimento folicular ovariano em ratas. Seções representativas do grupo CON (A-A2) e do grupo Cd (B-B6). Os ovários de Cd foram corados com H&E, o que permitiu identificar o corpo lúteo (CL), folículos pré-antrais (Pa), folículos antrais (An), folículos atrésicos (At) e císticos (Cis). Presença de vacuolização inicial em folículos primários (Pri, seta, B3) e células inflamatórias na camada da granulosa (asterisco-macrófago e seta-neutrófilo, (B1.1). Folículos primordiais (C), Folículos primários (D), Folículos pré-antrais (E) e folículos antrais (F). Folículos atrésicos (G) Folículos císticos (H). Corpo lúteo (I). *p < 0,05. n = 4-6. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. Imagens obtidas nas fases de metaestro-diestro.*

Tabela 5 – Resumo da análise ovariana.

	CON	Cd	p
Parâmetros ovarianos			
Folículos sadios (nº/ µm²)	5,44 ± 0,75	1,78 ± 0,17*	0,01
Folículos não sadios (nº/ µm²)	0,59 ± 0,09	1,46 ± 0,17*	0,01
Folículos totais (nº/ µm²)	6,04 ± 0,79	3,25 ± 0,22*	0,01
Área da teca (µm²)	28,58 ± 4,04	27,16 ± 3,01	0,78
Espessura da granulosa (µm)	50,22 ± 2,26	42,79 ± 2,32*	0,02

CON: Controle; Cd: Cloreto de cádmio; Folículos sadios: Soma dos folículos em desenvolvimento; Folículos não sadios: Soma de folículos atrésicos e císticos; p: Valor de p. Valores expressos como média ± SEM n=4-6. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos.

6.9 A análise histopatológica nos ovários expostos ao Cd indica infiltração inflamatória e edema

Foram identificados edema e áreas de hiperemia acentuada, bem como infiltração leve por células mononucleadas e notavelmente macrófagos e linfócitos na região medular e cortical ovariana nas ratas Cd (Figura 14A, B e C).

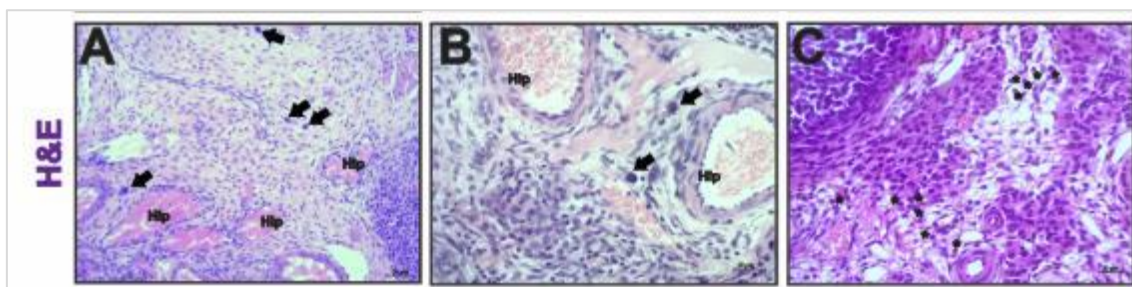
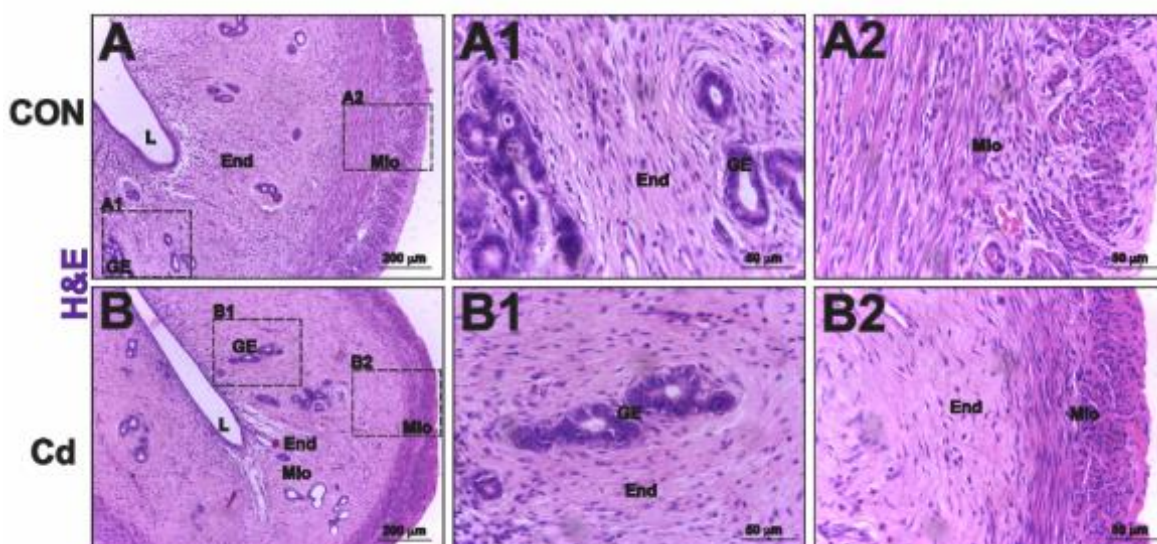


Figura 14: Análise histopatológica do tecido ovariano. Ovários Cd apresentaram considerável quantidade de mastócitos e hiperemia (A e B). Edema e infiltrado de células inflamatórias mononucleares indicadas por *. Imagens obtidas nas fases de metaestro-diestro.

6.10 Exposição ao Cd alterou a morfologia uterina

O grupo exposto ao Cd (Figura 15B, B1 e B2) apresentou úteros atróficos comparados com ao CON (Figura 15A, A1 e A2). A exposição ao Cd reduziu a área uterina total em relação à CON ($p < 0,05$, $n = 5$, Figura 15C). Não foram constatadas alterações significativas na espessura endometrial e no número da glândula uterina endometrial entre ratos expostos de CON e Cd ($p > 0,05$, Figura 15D e E). Além disso, foi possível notar reduções na espessura do miométrio interno e externo em ratos de Cd ($p < 0,01$, Figura 15F e G).



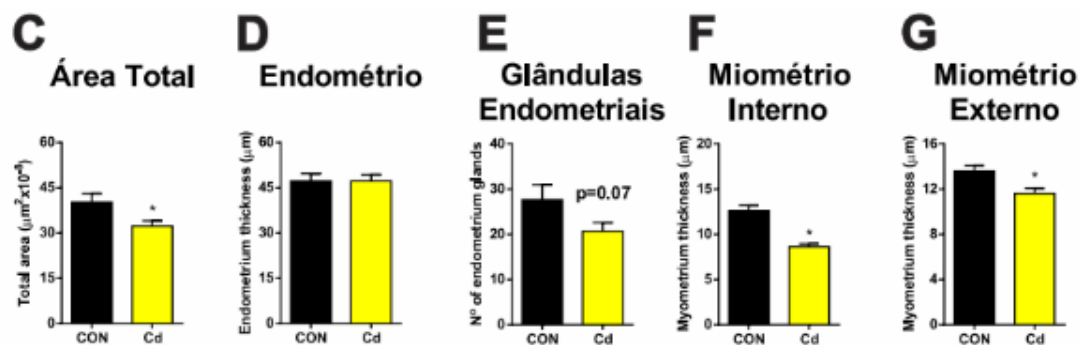


Figura 15: Exposição ao Cd e atrofia uterina em ratas. Seções representativas do grupo CON (A-A2) e do grupo Cd (B-B2). Área total do útero (C), Espessura do endométrio (D), Glândulas do endométrio (E). Espessura do miométrio interno (F). Espessura do miométrio externo (L: Lúmen. LE: epitélio luminal. GE: Glândulas endometriais. End: Endométrio. Mio: Miométrio). * $p < 0,05$. $n = 4-6$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. Imagens obtidas nas fases de metaestro-diestro.

6.11 A análise histopatológica nos úteros do grupo Cd indica hiperplasia glândular e perfil fibrótico

A histopatologia do útero revelou hiperplasia glandular, alterações císticas e reação estromal juntamente com fibrose periglandular em ratos de Cd (Figura 16B, C, D e E) em comparação com o aspecto normal em ratos CON (Figura 16A).

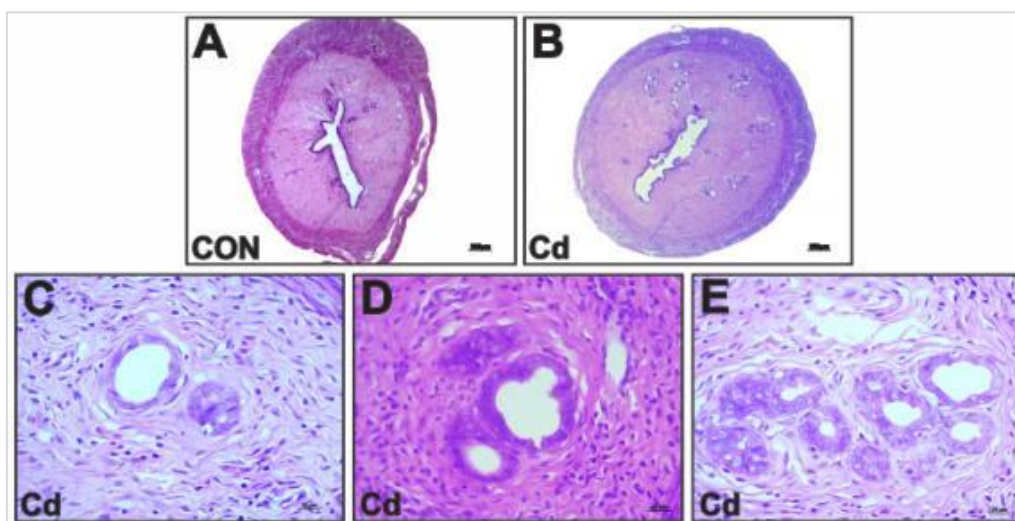


Figura 16: Análise histopatológica do tecido uterino. (A) Grupo controle apresentando aspecto norma das glândulas e epitélio uterino. (B) Útero do grupo Cd. (C) Glândulas apresentando ectasia e ninho glandular. (D) Glândulas tortuosas hiperplásicas e dilatadas. (E) Fibrose periglandular. Imagens obtidas nas fases de metaestro-diestro.

6.12 Exposição ao Cd levou a um processo inflamatório no trato reprodutivo

Mastócitos foram marcados com Alcian blue em cortes de ovários de ratas CON e Cd, mas sua distribuição não se apresentava de forma uniforme (Figura 17A, A1, C e C1). Por essa razão, não fomos capazes de avaliar o número mastócitos no ovário. No entanto, a exposição ao Cd aumentou as atividades de MPO ovariano (presença de neutrófilos) e NAG (presença de macrófagos) em comparação com as atividades no grupo CON ($p < 0,05$, Figura 17E e F). Além disso, verificou-se aumento do número de mastócitos nos úteros (Figura 17B, B1, D e D1) do grupo Cd em comparação com o CON ($p < 0,05$, Figura 17G). Não foram identificadas alterações significativas nas atividades de MPO uterino e NAG entre ratas CON e Cd ($p > 0,05$, Figura 17H e I).

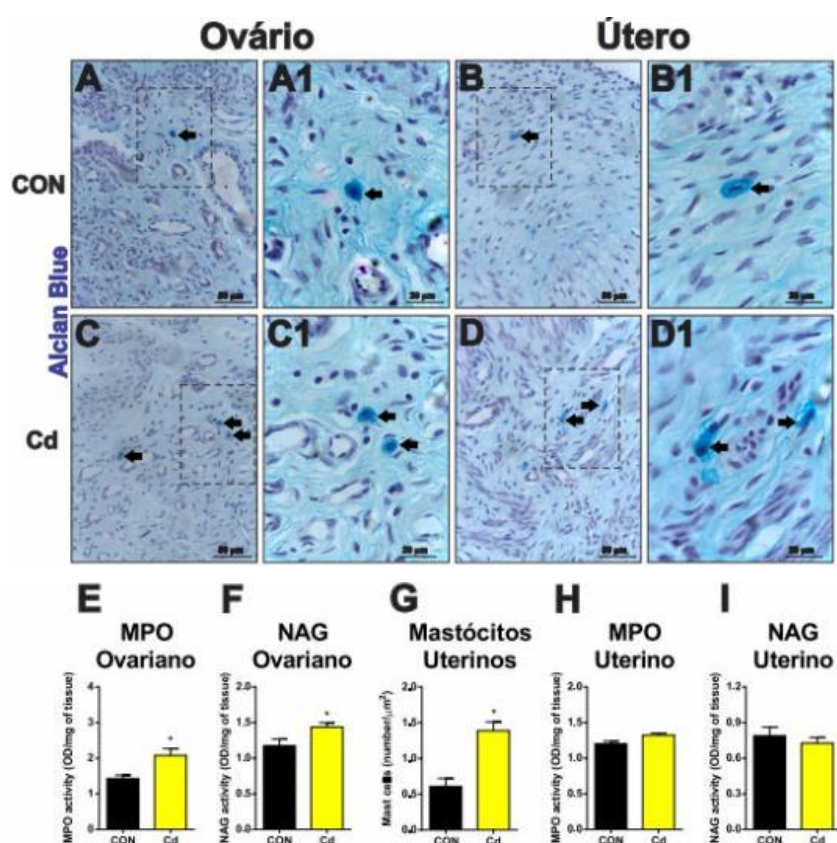
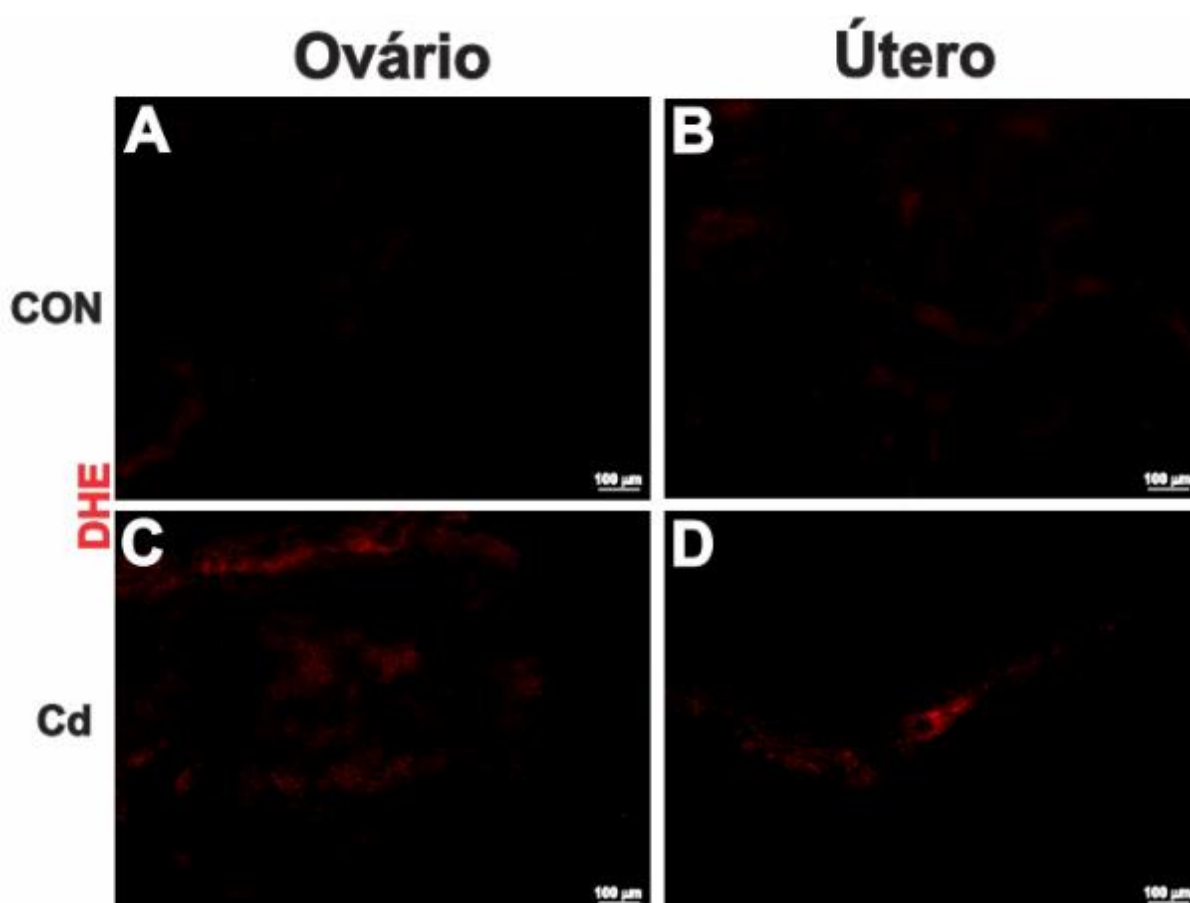


Figura 17: Exposição ao Cd e inflamação do trato reprodutivo. Cortes representativos com mastócitos marcados com coloração Alcian blue nos ovários CON (A e A1) e Cd (C e C1). Mesma marcação realizada em cortes do tecido uterino do grupo CON (B e B1) e Cd (D e D1). Quantificação de MPO (E) e NAG (F) nos ovários. Quantificação de MPO (H) e NAG no útero. (MPO – Mieloperoxidase). (NAG – N-Acetil- β -D-glicosaminidase). $N = 4-6$. * $p < 0,05$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. Imagens obtidas nas fases de metaestro-diestro.

6.13 Exposição ao Cd alterou marcadores de estresse oxidativo no trato reprodutivo

Criosecções de ovários (Figura 18A e C) e útero (Figura 18B e D) do grupo Cd e CON foram incubadas com o marcador fluorescente dihidroetídeo que marca espécies reativas de oxigênio como $O_2^{\bullet-}$. Aumento na fluorescência de dihidroetídeo foi constatado em ratas expostas ao Cd em comparação com ratos CON (*p = 0,05 xE e F).

Não foram identificadas alterações significativas nos níveis de TBARS ovariano (*p = 0,07, Figura 18G). Contudo, uma pequena redução nos níveis de GSH ovariano em ratos expostos em Cd em comparação com ratos COM foi verificada (*p < 0,05, Figura 18H). Não foi possível notar alteração significativa nos níveis uterinos de TBARS e GSH (*p > 0,05, Figura 18I e J).



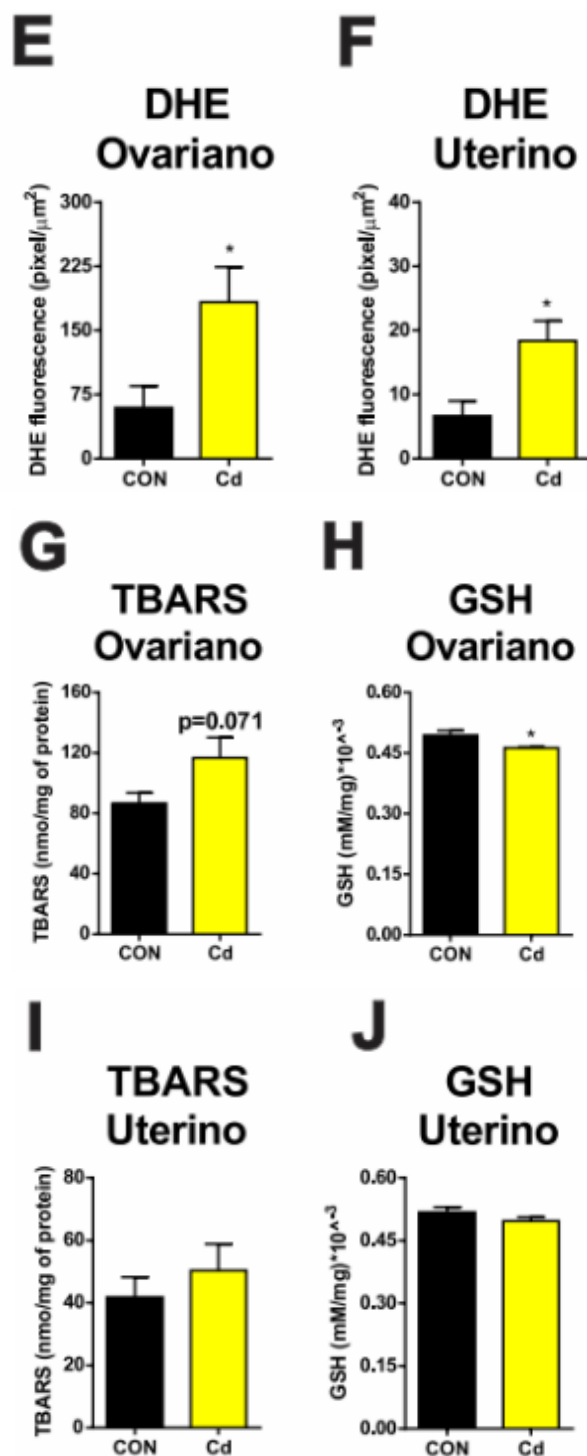


Figura 18: Exposição ao Cd e estresse oxidativo no trato reprodutivo de ratas. Imagens representativas de cortes dos ovários (A e C) e útero (B e D) do grupo CON e Cd corados com dihidroetídeo (DHE). Quantificação da fluorescência de DHE nos ovários (E) e útero (F). Quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos ovários (G) e útero (I). Quantificação dos níveis da glutathiona reduzida (GSH) nos ovários (H) e útero (J). * $p < 0,05$. $n = (4-6)$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. Imagens obtidas nas fases de metaestro-diestro.

6.14 Ratas expostas ao Cd apresentam aumento na deposição de colágeno no trato reprodutivo

Um aumento na deposição de colágeno nos ovários (Figura 19A, C e E) e na camada do endométrio do útero (Figura 19B, D e F) foi observado em ratas Cd em comparação com as ratas CON. * $p < 0,05$.

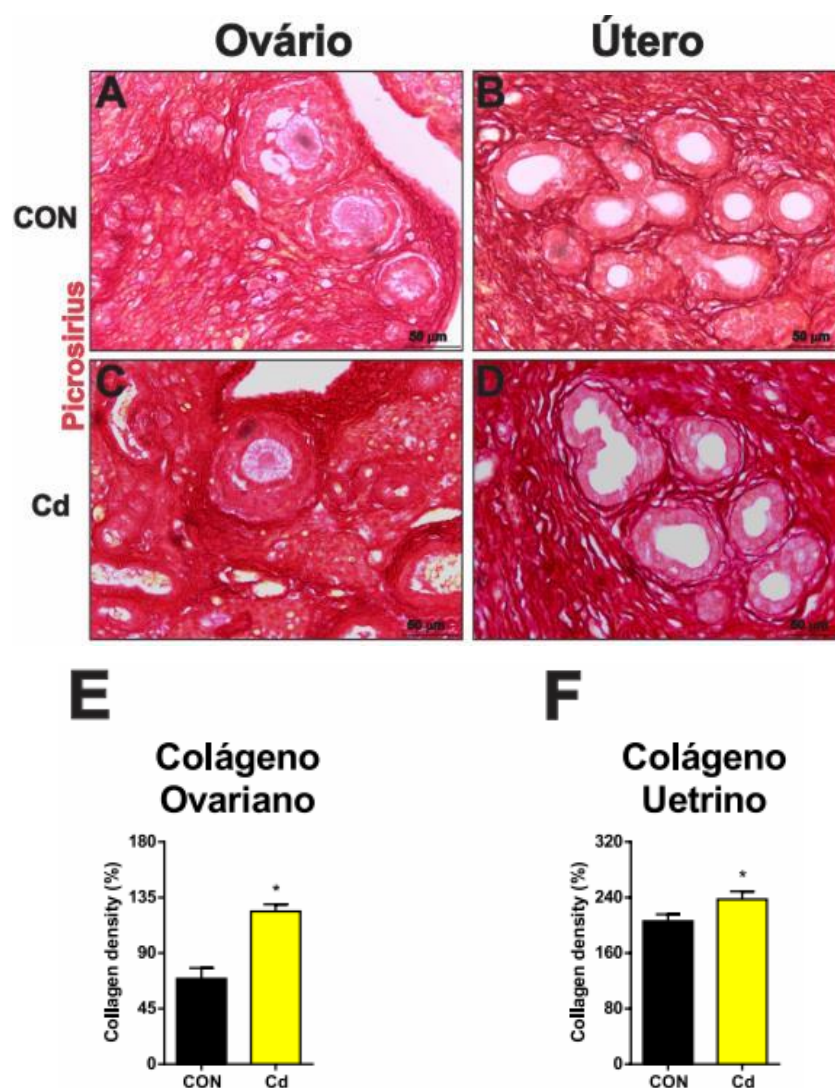


Figura 19: Exposição ao Cd e deposição de colágeno no trato reprodutivo. *Imagens representativas de cortes dos ovários (A e C) e do endométrio uterino (B e D) do grupo CON e Cd corados com Picrosirius red. Quantificação da deposição de colágeno nos ovários (E) e útero (F). * $p < 0,05$. $n = (5-6)$. Teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados gaussianos e não gaussianos. Imagens obtidas nas fases de metaestro-diestro.*

6.15 Correlação entre níveis de Cd e parâmetros metabólicos e características de SOP e FOP

Para avaliar a relação entre os níveis de Cd no soro, ovários e marcadores metabólicos (IST e LDL, etc), características semelhantes à SOP (comprimento do ciclo estral, folículos císticos e níveis de LH) (Tabela 6), características semelhantes à FOP (folículos antral, atresícos, não sadios, atividade NAG ovariana (presença de macrófago) e outras anormalidades ovarianas (estresse oxidativo ovariano e excesso de deposição de colágeno), foram realizadas análises de correlação em pares e um ajuste linear (Tabela 7).

Constatou-se correlação linear positiva entre os níveis de Cd no soro e ovários com a duração do ciclo estral ($p = 0,01$ e $p = 0,01$). Verificou-se correlação linear positiva entre os níveis de Cd sérico e o número de folículos císticos ($p = 0,02$) comparado ao grupo controle. Foi possível notar uma correlação positiva entre os níveis de Cd sérico e ovariano e níveis de LH ($p = 0,02$ e $p = 0,01$) em comparação ao grupo controle. O TSI correlaciona-se positivamente com a duração do ciclo estral e os níveis de LH ($p = 0,01$ e $p = 0,01$) como pode ser identificado na Tabela 6.

Uma correlação linear negativa entre os níveis de Cd sérico e ovariano e o número de folículos antrais ($p = 0,02$ e $p = 0,01$) comparado ao grupo controle foi verificada. Além disso, notou-se correlação linear positiva entre os níveis de Cd ovariano e os números de folículos atresícos ($p = 0,01$) comparado ao grupo controle. Da mesma forma, foi constatado correlação positiva entre os níveis de Cd e ovário e o número de folículos não sadios ($p = 0,03$ e $p = 0,04$, respectivamente) em comparação ao grupo controle. Observou-se correlação linear negativa entre os níveis de Cd sérico e ovariano e níveis de AMH ($p = 0,01$ e $p = 0,01$) quando comparado ao grupo controle, como pode ser notado na Tabela 7.

Também foi verificada correlação positiva entre os níveis de Cd sérico e ovariano e a atividade de macrófagos ovarianos ($p = 0,01$ e $p = 0,02$) em comparação ao grupo controle. Foi possível verificar uma correlação positiva entre os níveis de Cd sérico e o estresse oxidativo ovariano ($p = 0,01$) em comparação ao grupo controle. Os níveis de Cd ovariano não se correlacionaram

com a deposição de colágeno ovariana ($p = 0,06$) quando comparado ao grupo controle. Além disso, os níveis de Cd uterino foram positivamente correlacionados com a espessura externa do miométrio e o número de mastócitos ($p = 0,01$ e $p = 0,04$) em comparação ao grupo controle. Observou-se correlação positiva entre os níveis de Cd sérico, uterino e o estresse oxidativo uterino ($p = 0,01$ e $p = 0,02$) quando comparado ao grupo controle. Por fim, notou-se correlação positiva entre os níveis de Cd sérico e deposição de colágeno uterina ($p = 0,01$). Não foram constatadas outras correlações significativas como apresentado na Tabela 8.

Tabela 6 – Correlação entre níveis de Cd e características do SOP.

	Características da SOP					
	Duração do ciclo		Folículo cístico		LH	
	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P
[Cd] e marcadores metabólicos						
Cd sérico	0,87	0,01	0,81	0,02	0,79	0,02
Cd ovariano	0,85	0,01	0,68	0,07	0,82	0,01
TSI	0,88	0,01	0,56	0,14	0,84	0,01
LDL-colesterol	0,71	0,06	0,67	0,07	0,67	0,07

Cd: Cádmio; [Cd]: Níveis de Cd; TSI: Teste de sensibilidade à insulina; LDL: Nível de lipoproteína de baixa densidade; SOP: Síndrome do ovário policístico; LH: Hormônio luteinizante. Significância estatística ($p < 0,05$), correlações testadas usando o teste de Spearman ou Pearson quando observada distribuição de dados não gaussiana ou gaussiana respectivamente. P: valor de p; n= 4.

Tabela 7 – Correlação entre níveis de Cd e características da FOP.

	Características da FOP													
	Antral		Atrésico		Não sadio		AMH		Inflamação		EROs		Colágeno	
	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P
[Cd] e marcadores metabólicos														
Cd sérico	-0,79	0,02	0,58	0,12	0,74	0,03	-0,72	0,04	0,78	0,01	0,93	0,01	0,45	0,25
Cd ovariano	-0,82	0,01	0,92	0,01	0,75	0,04	-0,73	0,04	0,81	0,02	0,73	0,51	0,71	0,06
TSI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDL-colesterol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cd: Cádmio; [Cd]: Níveis de Cd; TSI: Teste de sensibilidade à insulina; LDL: Nível de lipoproteína de baixa densidade; FOP: Falência ovariana prematura; Não sadio: Soma de folículos atrésicos e císticos; AMH: Hormônio anti-Mülleriano; Inflamação: Atividade indireta de macrófago; EROS: Espécies reativas de oxigênio. (DHE ovariano: Dihidroetídio); Colágeno: Deposição de colágeno ovariano. Significância estatística ($p < 0,05$), correlações testadas usando o teste de Spearman ou Pearson quando observada distribuição de dados não gaussiana ou gaussiana respectivamente. P: valor de p; n= 4.

Tabela 8 – Correlação entre concentração de Cd marcadores uterinos.

	Marcadores uterinos													
	Área total		Miométrio interno		Miométrio externo		Nº de Glândulas		Inflamação		Estresse oxidativo		Colágeno	
	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P
[Cd]														
Cd sérico	-0,35	0,36	0,14	0,73	-0,71	0,05	-0,22	0,56	0,63	0,11	0,85	0,01	0,62	0,01
Cd uterino	-0,56	0,14	-0,37	0,36	-0,83	0,01	-0,46	0,24	0,72	0,04	0,77	0,02	0,56	0,14

Cd: Cádmio; [Cd]: Concentração de Cd; Inflamação: Número de mastócitos no útero; Estresse oxidativo: (DHE uterino: Dihidroetídio). Significância estatística ($p < 0,05$), correlações testadas usando o teste de Spearman ou Pearson quando observada distribuição de dados não gaussiana ou gaussiana respectivamente. P: valor de p; n= 4.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo traz evidências de que a exposição subaguda a níveis de Cd semelhantes aos encontrados em trabalhadores é responsável por prejuízos metabólicos incluindo redução da adiposidade, dislipidemia, tolerância à glicose e resistência à insulina anormais, além de redução da insulina e elevação da leptina circulantes. Além disso, este estudo mostra que a exposição ao Cd induz a anormalidades no ciclo estral, na expressão gênica hipotalâmica, nos níveis hormonais, compromete o desenvolvimento folicular ovariano e consequentemente na formação de corpos lúteos com aumento da atresia folicular e elevação de folículos císticos. A exposição ao Cd ainda apresentou correlação positiva entre a resistência à insulina e as alterações no comprimento do ciclo estral e os níveis de LH, além de correlação negativa entre os níveis séricos e teciduais de Cd e a quantidade de folículos antrais e os níveis do AMH.

No presente estudo, identificamos níveis séricos de Cd ($2,39 \pm 0,63 \mu\text{g/L}$) dentro da faixa média relatada em trabalhadores expostos de forma ocupacional ($2\text{-}50 \mu\text{g/L}$) como relatado na literatura (JURDZIAK et al., 2018; WHO, 1992). Os níveis séricos de Cd por nós observados, se correlacionam positivamente com os níveis de Cd no hipotálamo, ovário e útero das ratas utilizadas neste estudo. Sabe-se que a exposição ao Cd é associada ao acúmulo deste metal nos órgãos reprodutivos em roedores e mulheres (GALLAGHER; MOONGA; KOVACH, 2010; XUYING WAN et al., 2010). Lafuente et al. (2001) reportou um aumento nos níveis de Cd no hipotálamo e hipófise de ratos adultos expostos a 50 ppm de Cd por 30 dias. O aumento nos níveis séricos e uterino de Cd foi verificado após ratas adultas serem expostas a 0,09-4,5 mg de Cd/Kg por 28 ou 30 dias (NASIADEK et al., 2014, 2018). O mesmo foi notado em ovários de ratas adultas expostas a 5 mg/Kg de CdCl por 14 dias (NNA et al., 2017). Portanto, os níveis de Cd encontrados em nosso modelo apresentam relevância para investigação de cunho ambiental e os resultados aqui reportados corroboram os achados da literatura.

Neste trabalho, identificamos que o grupo de ratas expostas ao CdCl₂ por 30 dias apresentaram redução da massa corporal e da massa da maioria dos depósitos de gordura da cavidade abdominal (com exceção da gordura parametrial), além da diminuição da adiposidade. Outros estudos também

relatam redução da massa e do ganho de massa de roedores expostos ao Cd em doses e tempos de exposição variados (ATTIA et al., 2022; SAEDI et al., 2020). A redução da adiposidade e da massa do tecido adiposo branco também já foram reportados em outras investigações, nas mais variadas formas de exposição ao Cd. Estes trabalhos associam a redução do tecido adiposo ao prejuízo na adipogênese induzida pelo Cd, com redução da expressão do receptor ativado por peroxissoma gama (PPAR- γ) e do fator de transcrição C/EBP. Neste trabalho não realizamos a quantificação desses fatores, o que vem a ser uma das limitações do estudo (KAWAKAMI et al., 2010, 2013; SARMIENTO-ORTEGA et al., 2021).

Além na redução da massa corporal e da adiposidade, as ratas do grupo Cd apresentaram alterações metabólicas no metabolismo da glicose, com redução da sensibilidade à insulina e da tolerância à glicose, perfil dislipidêmico com elevação do colesterol total, LDL, VLDL, triglicerídeos e redução do HDL, além da redução da insulina e aumento da leptina séricas. Os efeitos tóxicos do Cd podem afetar negativamente a saúde, sendo ligados a desregulação endócrina, doenças relacionadas ao diabetes e a desordens metabólicas (ATTIA et al., 2022). A dislipidemia, condição caracterizada por aumento dos níveis de colesterol total, LDL e a redução dos níveis de HDL, foi identificada em outros trabalhos em roedores expostos ao Cd (SAEDI et al., 2020; SAMARGHANDIAN et al., 2015; TREVIÑO et al., 2015). Nie et al., (2016) relatou que níveis séricos de Cd $\geq 2,95 \mu\text{g/L}$ se correlacionam com a prevalência de pré-diabetes em indivíduos adultos.

As alterações reportadas em nosso estudo como a redução da adiposidade e da sensibilidade à insulina, elevação da leptina sérica e a redução da expressão do mRNA do LepR no hipotálamo, podem ter relação com o conjunto de alterações encontradas no desenvolvimento da resistência à insulina. Essas anormalidades são geralmente relatadas em doenças metabólicas como o diabetes melito do tipo 2, doença que tem relação com alterações endócrino-metabólicas que envolvem desde resistência periférica à insulina e/ou problemas na sua secreção até alterações centrais como desregulação na sinalização da leptina no hipotálamo, seja por deficiência de leptina ou também por resistência a esse hormônio, situação que se dá na

hiperleptinemia (MEEK; MORTON, 2012; ZHAO, S. et al., 2020). Por exposição crônica ao Cd já foi reportada a redução de receptores de insulina no tecido adiposo branco de ratos, fator que pode contribuir para a resistência periférica à insulina (ATTIA et al., 2022; FICKOVÁ et al., 2003).

A dislipidemia e a resistência à insulina são anormalidades metabólicas muito comuns em mulheres com SOP, e estão associadas com a disfunção reprodutiva, sendo deste modo, importantes parâmetros de avaliação (ROSENFELD; EHRMANN, 2016). Em investigações reprodutivas em roedores, o ciclo estral é um excelente e importante parâmetro de análise (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Na presente investigação, identificou-se que a exposição ao Cd reduziu o tempo de permanência na fase de estro, aumentou a duração das fases de metaestro e diestro, levando assim, a um comprimento do ciclo estral mais longo. Além disso, foram identificadas anormalidades no esfregaço vaginal na fase de proestro, que apresentava uma mistura de células nucleadas, cornificadas e leucócitos. Os achados sobre os efeitos da exposição ao Cd sobre o ciclo estral são contraditórios na literatura, dependendo em parte, da dose, tempo de exposição, frequência e idade dos indivíduos expostos (NASIADEK et al., 2019; WANG et al., 2014). Estudos já reportaram que a exposição entre 0,009 a 4,5 mg/Kg de CdCl₂ de 30 a 90 dias induz a anormalidades no ciclo estral, com as ratas expostas passando mais tempo nas fases de metaestro e diestro e um aumento no comprimento do ciclo. Ratas expostas a 50 ou 200 ppm também apresentaram um ciclo estral prolongado em comparação ao controle (ROOPHA; LATHA, 2013). Cd Além disso, a redução na fase de proestro e o aumento na fase de estro foi observada em ratas expostas a 4,5-1,8 mg/Kg de CdCl₂ por 90 dias (NASIADEK et al., 2018, 2019). Em contrapartida, Wang et al., (2014) não identificou anormalidades significativas no ciclo estral de ratas expostas a 1-20 mg/Kg de CdCl₂ por 28 dias. Assim sendo, parte destas investigações corroboram nossos achados e parte destoam dessas análises.

Os critérios para o diagnóstico da SOP requerem a presença de pelo menos dois dos três principais sintomas: oligo ou anovulação, hiperandrogenismo e a morfologia do ovário policístico (FAUSER, 2004). Em nosso estudo, as ratas expostas ao Cd apresentaram dois critérios, a redução

na ovulação e a presença aumentada de folículos císticos, o que em humanos seria caracterizado como SOP com baixa severidade (WALTERS et al., 2018). Além disso, uma correlação positiva entre os níveis séricos/ovarianos de Cd, resistência à insulina, LDL e o comprimento do ciclo estral e o número de folículos císticos sugerindo o aumento desses parâmetros frente a essas alterações. Modelos de SOP, como a exposição prolongada à dihidrotestosterona também apresentam um aumento de folículos antrais não saudáveis, redução na espessura da camada de células da granulosa e hipercolesterolemia em camundongos fêmeas (CALDWELL et al., 2014).

Além das anormalidades mencionadas anteriormente, nosso estudo também apontou elevação dos níveis de LH. Contrapondo esse dado, outros trabalhos relatam a redução do LH após a exposição ao Cd, contudo com doses e tempos de exposição diferentes desta investigação (OGUNBIYI; OBI, 2022; SAEDI et al., 2022). Contudo, estudos *in vitro* reportam que a exposição ao Cd reduz a ligação do LH a células da granulosa isoladas de ratas no proestro, tanto por exposição direta às células quanto em células extraídas de ratas expostas previamente, o que por sua vez poderia aumentar os níveis séricos do LH circulante (ECKSTRUM; RAETZMAN, 2018; NAMPOOTHIRI; GUPTA, 2006; PRIYA; PILLAI; GUPTA, 2004). Modelos de SOP induzida por letrozol também apresenta altos níveis de LH, sugerindo que este hormônio pode ser um fator essencial nas anormalidades da SOP (ESPARZA et al., 2020; MCCARTNEY et al., 2009).

Nossos dados relatam o aumento da relação LH/FSH nas ratas Cd em comparação ao grupo CON. Além das alterações clássicas da SOP, outro importante parâmetro que é utilizado na clínica é a razão LH:FSH, uma vez que os níveis de LH podem estar elevados em relação ao FSH em indivíduos com essa complicação. Essa relação se correlaciona com morbidades presentes em pacientes com SOP como dislipidemia e resistência à insulina e em decorrência dessa razão elevada, a ovulação pode não ocorrer. Não há na literatura dados de exposição ao Cd e sua relação com esse parâmetro de SOP para comparação, este dado corrobora observações clínicas que não envolvem a exposição ao Cd (BEYDOUN et al., 2012; SAADIA, 2020).

A SOP também se relaciona com alterações hipotalâmicas, visto que a elevação do LH pode estar associado a um aumento na secreção de GnRH (CHANG, 2007; GOODARZI et al., 2011; MCCARTNEY; CAMPBELL, 2020). Se esse evento é primário ou secundário devido a outras alterações da SOP, não é algo totalmente esclarecido, contudo, vários fatores são associados com a regulação dos neurônios GnRH (HILL; ELIAS, 2018). Em nosso estudo, a expressão do GnRH não apresentou alteração entre os dois grupos investigados, mas a expressão da Kiss1 se encontrava elevada, enquanto a expressão do mRNA do Kiss1R estava reduzida nas ratas do grupo Cd, fato que pode ser explicado por influência da kisspeptina sobre seu receptor (LI et al., 2012). Sabe-se que a kisspeptina 1 é o principal secretagogo do GnRH identificado em mamíferos, atuando sobre os neurônios GnRH e controlando sua atividade e secreção (NAVARRO et al., 2004; ROMERO-RUIZ et al., 2019; SEMINARA et al., 2003). A redução do Kiss1r já foi relatada em procedimentos de infusão prolongada de Kiss1 em ovelhas, indicando que a kisspetina pode regular a expressão do seu receptor (LI et al., 2012). A elevação da expressão do mRNA da Kiss1 já foi reportada em modelos de SOP induzida por letrozol, contudo, não reportou-se alterações na expressão do mRNA do GnRH (ESPARZA et al., 2020; KAUFFMAN et al., 2015).

Nossos resultados apontam que as ratas expostas ao Cd apresentaram aumento na expressão hipotalâmica do mRNA do receptor de androgênios. Já foi relatado em um estudo *in vitro* que o Cd tem potencial de mimetizar os efeitos de androgênios por mecanismo de competição pelo receptor de androgênios (MARTIN et al., 2002). Em modelos de SOP, sabe-se que a função do receptor de androgênios apresenta fundamental papel no controle dos neurônios GABAérgicos presentes no núcleo arqueado, que modulam a atividade dos neurônios GnRH, aumentando diretamente a liberação do GnRH e indiretamente o LH (MOORE; CAMPBELL, 2016; ROLAND; MOENTER, 2014). Um modelo de SOP utilizando 6 mg/100 g de desidropiandrosterona, dos 27 aos 46 dias de vida, induziu um aumento da expressão do mRNA do receptor de androgênios no hipotálamo de ratas, corroborando desta forma nossos achados (ZHANG, H. et al., 2016).

Fatores metabólicos também podem modular a função do GnRH, como a sinalização de leptina e mTOR. O mTOR tem sido proposto como um transdutor da leptina e um sensor central para o balanço energético do organismo (COTA et al., 2006). Em nossos dados, reportamos a redução da expressão de mRNA do receptor de leptina e o aumento da expressão de mTOR nas ratas Cd. Roa et al., (2009) reportou que a ativação central de mTOR estimula a secreção de LH, possivelmente por seu controle sobre os neurônios kisspeptina/neuroquinina/dinorfina. A cascata de sinalização do mTOR tem importante influência nas características da SOP, sendo além disso, um dos alvos para tratamento, uma vez que sua inibição melhora direta ou indiretamente os sintomas dessa complicação (LIU et al., 2016).

A exposição ao Cd levou a uma diminuição na expressão hipotalâmica do mRNA de TNF- α nas ratas desta investigação. A inflamação crônica de baixo grau hipotalâmica tem sido associada a complicações endócrino-metabólicas que por sua vez, aumentam a inflamação em outros órgãos e contribuem para a gênese de complicações como a SOP. A inflamação no hipotálamo aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , alterações que podem prejudicar a sinalização da leptina e da insulina (BARLAMPA et al., 2021). Um estudo utilizando um modelo de SOP induzido por exposição ao letrozol (1 mg/Kg/21 dias), reportou inflamação hipotalâmica com aumento de TNF- α e IL-6. Deste modo, nossos dados não corroboram a literatura, além do mais, apenas a expressão do mRNA TNF- α foi avaliada, o que passa a ser uma limitação deste estudo, uma vez que outras citocinas não foram avaliadas (LIAN; ZHAO; WANG, 2016).

Em nossa investigação, foi possível notar que a exposição Cd levou a características da FOP, reduzindo os folículos ovarianos em todas as fases de seu desenvolvimento, bem como a quantidade de corpos lúteos, além do aumento na contagem folículos císticos e da atresia folicular, embora os níveis de FSH não tenham sido alterados. Isso significa que em humanos a condição de FOP seria classificada entre bioquímica e evidente (WALTERS et al., 2018). De forma geral, os achados deste estudo, são consistentes com relatos feitos em outros estudos que mostram que a exposição Cd induz a anormalidades na morfologia e fisiologia do trato reprodutivo, com redução no número total de

folículos ovarianos e a degeneração de corpos lúteos (NASIADEK et al., 2018, 2019). A depleção de folículos primordiais e primários, levando a uma redução no total de folículos, bem como o acelerado declínio desses folículos, é hipoteticamente o principal mecanismo para a transição de mulheres para a menopausa ou desenvolvimento de outras anormalidades tais como a FOP (GOUGEON; ECOCHARD; THALABARD, 1994; TATONE et al., 2008).

Neste estudo, reportamos a redução dos níveis de AMH e uma correlação negativa com os níveis de Cd ovarianos e séricos nas ratas expostas ao Cd. Além disso, os níveis séricos/ovarianos de Cd se correlacionaram positivamente com atividade de macrófagos. Embora a exposição ao Cd seja associada a complicações no trato reprodutivo, poucos estudos tem associado essas complicações com aumento da inflamação no sistema reprodutivo (SAPMAZ-METIN et al., 2017). Saksena e Salmonsén, (1983) identificaram uma inflamação ovariana aguda, caracterizada por presença de neutrófilos em determinados pontos nos ovários, isso, após uma simples injeção de 5 ou 10 mg/Kg de CdCl₂ em hamsters. Um estudo em mulheres que apresentavam níveis séricos de Cd similares aos observados neste estudo (0,17 e 2,989 µg/L) foram associados com alteração nos níveis do AMH (LEE et al., 2018). A FOP também pode resultar de processo inflamatório ovariano, levando a atresia folicular. Deste modo as alterações reportadas neste estudo corroboram os achados de outras investigações (ALTUNTAS; JOHNSON; TUOHY, 2006; SEDMAK; HART; TUBBS, 1988).

Na presente investigação, foi possível identificar a atrofia uterina, sendo essa associada a redução na área total transversal uterina e da espessura do miométrio nas ratas Cd. Uma correlação positiva foi verificada entre níveis séricos/ovarianos de Cd e a espessura do miométrio. Além disso, foi possível notar a formação de edema, hiperemia com infiltrado de células mononucleares macrófagos e linfócitos), aumento na atividade de MPO e NAG (atividade de neutrófilos e macrófagos respectivamente), além do aumento de mastócitos no útero de ratas Cd. Uma correlação positiva foi notada entre níveis séricos/ovarianos de Cd e a atividade de NAG. Outrossim, identificamos uma correlação positiva entre níveis de Cd uterino e o número de mastócitos. Por fim, a redução de glândulas uterinas, hiperplasia e acúmulo de colágeno foram

identificados. Sapmaz-Metin et al., (2017) identificaram o aumento de mastócitos uterinos, redução da espessura do endométrio, aumento do índice de apoptose e a redução da proliferação no útero de camundongos fêmeas expostas a 200 ppm de CdCl_2 por 30 dias (SAPMAZ-METIN et al., 2017). Durante a menstruação, as células inflamatórias mais prevalentes no tecido endometrial humano são neutrófilos, macrófagos e mastócitos (A. SALAMONSEN; WOOLLEY, 1999). Essas células auxiliam no remodelamento uterino durante as alterações estimuladas pelas oscilações hormonais do ciclo reprodutivo (A. SALAMONSEN; WOOLLEY, 1999; SIVRIDIS et al., 2001). Alterações ovulatórias já foram associadas na literatura com efeitos adversos do ciclo reprodutivo (prejuízo na sinalização de estradiol, progesterona e na formação de corpos lúteos, SOP) sobre o útero, dentre elas, o aumento de citocinas inflamatórias, infiltrado de neutrófilos e macrófagos e da inflamação, o que induz a lesão endometrial, vascularização anormal, estresse oxidativo e o remodelamento tecidual. Nossos dados corroboram parcialmente a literatura, uma vez que apesar do infiltrado de células inflamatórias, a atividade de MPO, NAG e a espessura do endométrio não apresentaram alterações entre os grupos investigados. Algumas limitações deste estudo são a não avaliação de citocinas pró-inflamatórias, marcadores de vascularização e apoptose (WATTERS; MARTÍNEZ-AGUILAR; MAYBIN, 2022).

. Nossos resultados apontam o aumento dos níveis de EROs e redução dos níveis de GSH ovariano, contudo, no tecido uterino apenas o aumento de EROs foi identificado nas ratas do grupo Cd. A deposição aumentada de colágeno foi constatada no trato reprodutivo das ratas expostas ao Cd, sugerindo deste modo, desregulação do sistema antioxidante nos ovários, aumento de EROs no útero e remodelamento tecidual em ambos os tecidos. O aumento de apoptose, da inflamação, do estresse oxidativo e outras anormalidades reportadas em outros modelos de exposição ao Cd (NNA et al., 2017; SAPMAZ-METIN et al., 2017) e em nosso modelo, pode ser responsável por dano celular que pode ser substituído por tecido fibroso. Uma correlação positiva foi identificada entre níveis séricos de Cd e deposição aumentada de colágeno uterino comparado ao grupo controle. As consequências do aumento do estresse oxidativo são importantes fatores nas complicações induzidas pela exposição ao Cd (NASIADEK et al., 2014, 2019). Nna et al., (2017) relatou o aumento dos

níveis de malondialdeído, peróxido de hidrogênio, e a redução de glutathiona peroxidase no trato reprodutivo de rats expostas a 5 mg/Kg por 14 dias. Altos níveis de estresse oxidativo induzem a disfunção mitocondrial, que apresentam um papel importante no surgimento de características da POF, segundo estudos em humanos e roedores. Este estudo apresenta como limitações a não investigação de outros parâmetros do estresse oxidativo e do sistema antioxidante como H_2O_2 , superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase (BIAGIOLI et al., 2008; BRANCA et al., 2020; FAN et al., 2008; ZHEN et al., 2015).

Este estudo demonstra que a exposição subaguda a uma concentração sérica de Cd observada em indivíduos expostos ocupacionalmente e abaixo do nível considerado seguro internacionalmente, altera os parâmetros do eixo HPG, causa anormalidades no trato reprodutivo com características de SOP e FOP. Além disso, induz a alterações metabólicas, aumento da inflamação, estresse oxidativo e remodelamento tecidual no trato reprodutivo. Portanto, este estudo aumenta nosso entendimento sobre os efeitos tóxicos do Cd sobre o eixo HPG e o trato reprodutivo.

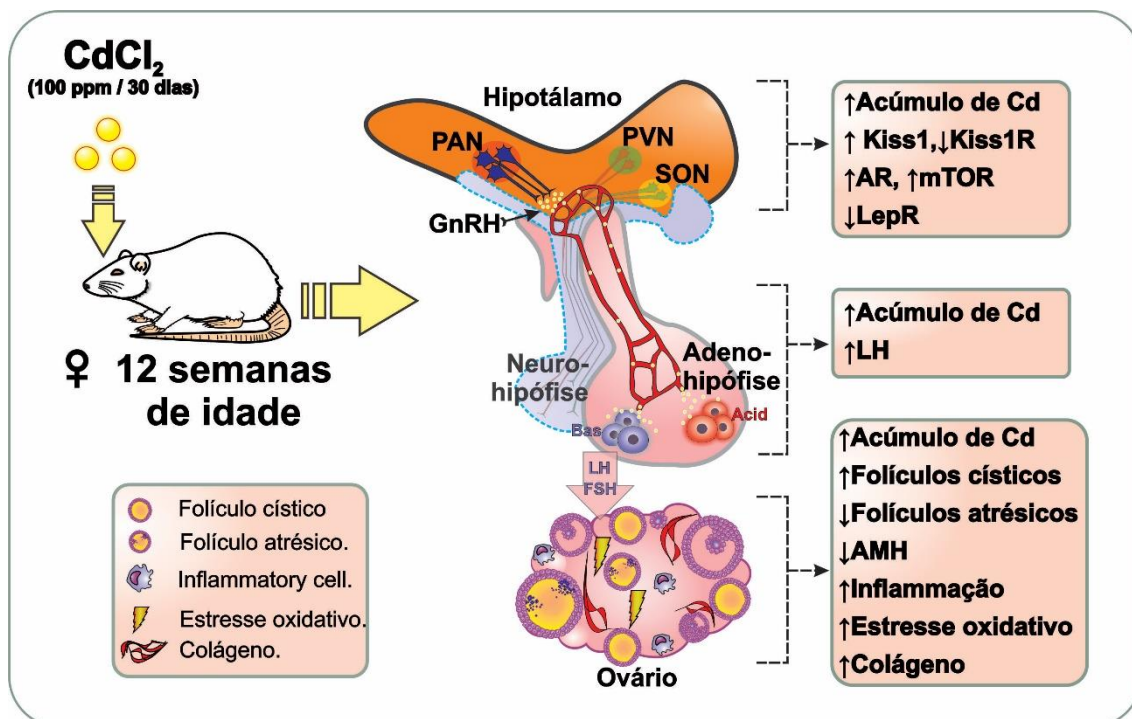


Figura 20: Representação esquemática da exposição ao Cd e suas alterações sobre o eixo HPG. A exposição subaguda ao CdCl₂ induziu o acúmulo do metal e alterações no eixo

hipotálamo-hipófise-gônada. Expressão gênica anormal no hipotálamo, aumento do LH sérico liberado pela hipófise e prejuízo ovariano com redução da reserva folicular, aumento da atresia e de folículos císticos, aumento da inflamação, estresse oxidativo e deposição de colágeno, além da redução do hormônio Anti-Mülleriano. PVN: Núcleo hipotalâmico paraventricular; PAN: Núcleo hipotalâmico anteroventral periventricular; SON: Núcleo hipotalâmico supraóptico.

8. REFERÊNCIAS

- A. SALAMONSEN, L.; WOOLLEY, D. E. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 44, n. 1–2, p. 1–27, set. 1999. Disponível em: <[https://sci-hub.ru/10.1016/s0165-0378\(99\)00002-9](https://sci-hub.ru/10.1016/s0165-0378(99)00002-9)>. Acesso em: 24 fev. 2023.
- A.T.S.D.R. **Toxicological Profile for Cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. Atlanta: [s.n.], 2012. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>>. Acesso em: 10 jun. 2021.
- A.T.S.D.R. Toxicological Profile for Cadmium 2002. **ATSDR's Toxicological Profiles**. 1. ed. Atlanta: CRC Press, 2002. p. 487. Disponível em: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9781420061888_ch48>.
- ABT, E. et al. Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1420700>, v. 11, n. 2, p. 92–102, 3 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2017.1420700>>. Acesso em: 24 jan. 2023.
- ABT, E.; ROBIN, L. P. **Perspective on Cadmium and Lead in Cocoa and Chocolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://sci-hub.se/10.1021/acs.jafc.9b08295>>. Acesso em: 24 jan. 2023. , 18 nov. 2020
- ACGIH. **Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents Biological Exposure Indices**. 7. ed. Cincinnati: [s.n.], 2019. Disponível em: <[www.acgih.org/tlv-bei-guidelines/ documentation-publications-and-data/under-study-list](http://www.acgih.org/tlv-bei-guidelines/documentation-publications-and-data/under-study-list)>.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1–21, 2005.
- ALMENARA, C. C. P.; OLIVEIRA, T. F.; PADILHA, A. S. The Role of Antioxidants on the Prevention of Cadmium-Induced Endothelial Dysfunction. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, 15 abr. 2020.
- ALTUNTAS, C. Z.; JOHNSON, J. M.; TUOHY, V. K. Autoimmune Targeted

Disruption of the Pituitary-Ovarian Axis Causes Premature Ovarian Failure. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1988–1996, 1 ago. 2006.

ÁLVAREZ-BLASCO, F. et al. Prevalence and characteristics of the polycystic ovary syndrome in overweight and obese women. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 19, p. 2081–2086, 2006.

ANDERSEN, O. et al. Experimental localization of intestinal uptake sites for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. suppl 3, p. 199–206, set. 1994. Disponível em: <<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.94102s3199>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

ANDERSEN, O.; NIELSEN, J. B.; NORDBERG, G. F. Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake - Possibilities for risk reduction. out. 2004, [S.l.]: Springer, out. 2004. p. 543–547. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/B:BIOM.0000045736.43184.9c>>. Acesso em: 5 jan. 2023.

ATTIA, S. M. et al. Cadmium: An Emerging Role in Adipose Tissue Dysfunction. **Exposure and Health**, v. 14, n. 1, p. 171–183, 10 mar. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12403-021-00427-3>>.

AYOUB, N. et al. Serum Cadmium Levels and Risk of Metabolic Syndrome: A Cross-Sectional Study. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 10, p. 3625–3633, 6 out. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12011-020-02502-3>>.

BARLAMPA, D. et al. **Hypothalamic inflammation as a potential pathophysiologic basis for the heterogeneity of clinical, hormonal, and metabolic presentation in pcos.** **Nutrients**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu13020520>>. , 2021

BARRAZA, F. et al. Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 950–963, 2017.

BEHRING. **Cádmio no sangue**. Disponível em: <<https://www.laboratoriobehring.com.br/pdfs/?id=295>>. Acesso em: 12 ago.

2021.

BELANI, M. et al. Dual effect of insulin resistance and cadmium on human granulosa cells - In vitro study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 313, p. 119–130, dez. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2016.10.019>>.

BENETTI-PINTO, C. L. et al. Premature ovarian insufficiency: A hormonal treatment approach. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 42, n. 08, p. 511–518, 8 ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1055/s-0040-1716929>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BERNHARD, D.; ROSSMANN, A.; WICK, G. **Metals in cigarette smoke. IUBMB Life**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1080/15216540500459667>>. Acesso em: 10 jun. 2021. , 1 dez. 2005

BERNHOF, R. A. Cadmium Toxicity and Treatment. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/123456>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

BEYDOUN, H. A. et al. Relationship of obesity-related disturbances with LH/FSH ratio among post-menopausal women in the United States. **Maturitas**, v. 71, n. 1, p. 55–61, jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22088801/>>. Acesso em: 24 fev. 2023.

BHATTACHARYA, P.; KEATING, A. F. Impact of environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 261, n. 3, p. 227–235, jun. 2012.

BIAGIOLI, M. et al. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. **Cell Calcium**, v. 43, n. 2, p. 184–195, fev. 2008. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0143416007001030?token=93B4C06929421AB290E9AACE693C147386CE3096367E32E4E2D7FF2E9DA7E7AF3691FF94C4B0AA105C0156CD7E5928FD&originRegion=us-east-1&originCreation=20210805182737>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

BJÖRKMAN, L.; VAHTER, M.; PEDERSEN, N. L. Both the environmental and

genes are important for concentrations of cadmium and lead in blood.

Environmental Health Perspectives, v. 108, n. 8, p. 719–722, 23 jun. 2000.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1638287>>.

BOLAN, N. et al. **Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils - To mobilize or to immobilize?** *Journal of Hazardous Materials*. [S.l.]: Elsevier. , 15 fev. 2014

BRANCA, J. J. V. et al. Cadmium-Induced Oxidative Stress: Focus on the Central Nervous System. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 492, 5 jun. 2020.

Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/9/6/492>>.

BRASIL. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 33, DE 18 DE NOVEMBRO DE 2016.

, 2016, p. 5. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22073702/do1-2016-11-21-resolucao-normativa-n-33-de-18-de-novembro-de-2016-22073453)

[/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22073702/do1-2016-11-21-](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22073702/do1-2016-11-21-resolucao-normativa-n-33-de-18-de-novembro-de-2016-22073453)

[resolucao-normativa-n-33-de-18-de-novembro-de-2016-22073453](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22073702/do1-2016-11-21-resolucao-normativa-n-33-de-18-de-novembro-de-2016-22073453)>. Acesso em: 22 fev. 2023.

BRASIL. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 37, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2018.**

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Disponível em:

<[https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-](https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf/view)

[mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-37-de-15-de-](https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf/view)

[fevereiro-de-2018.pdf/view](https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf/view)>. Acesso em: 22 fev. 2023.

BRASIL. **RN nº15/2013 - Estrutura Física e Ambiente de Roedores e**

Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para

Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. Conselho Nacional De

Controle De Experimentação Animal. Brasil: Ministério da Ciência,

Tecnologia e Inovação. Disponível em:

<[https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/ar](https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-15-de-16.12.2013-D.O.U.-de-18.12.2013-Secao-I-Pag.-9.pdf)

[quivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-15-](https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-15-de-16.12.2013-D.O.U.-de-18.12.2013-Secao-I-Pag.-9.pdf)

[de-16.12.2013-D.O.U.-de-18.12.2013-Secao-I-Pag.-9.pdf](https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-15-de-16.12.2013-D.O.U.-de-18.12.2013-Secao-I-Pag.-9.pdf)>. , 2013

BULAT, Z. P. et al. Blood and urine cadmium and bioelements profile in nickel-cadmium battery workers in Serbia. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25,

n. 2, p. 129–135, 20 mar. 2009. Disponível em: <<http://tih.sagepub.com>>.

Acesso em: 2 ago. 2021.

CALDWELL, A. S. L. et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3146–3159, ago. 2014.

Disponível em:

<http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo_EN581/JEFCA_Cd y Pb 11.pdf#page=528%5Cnhttp://www.who.int/foodsafety/publications/chem/summary73.pdf>.

CHANEY, R. L. et al. An improved understanding of soil Cd risk to humans and low cost methods to phytoextract Cd from contaminated soils to prevent soil Cd risks. 2004, [S.l: s.n.], 2004. p. 549–553.

CHANG, R. J. The reproductive phenotype in polycystic ovary syndrome.

Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism, v. 3, n. 10, p. 688–695, out. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17893687/>>.

Acesso em: 17 ago. 2020.

CONAMA. **Resolução CONAMA no 396, de 3 de abril de 2008**. . Brasil: [s.n.].

Disponível em:

<<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. , 2008

CONAMA. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. . Brasil:

[s.n.]. Disponível em:

<http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf>.

Acesso em: 27 jun. 2021. , 2005

COSTA, L. C. **Avaliação da exposição ao chumbo e cádmio de jovens adultos residentes na região metropolitana do Rio de Janeiro TT - lead exposure assessment and cadmium residents young adults in the metropolitan region of Rio de Janeiro**. 2015. 110 f. 2015. Disponível em:

<<http://bvssp.iciet.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=4501>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

COTA, D. et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 927–930, 12 maio 2006. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16690869/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

CUYPERS, A. et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. **BioMetals**, v. 23,

n. 5, p. 927–940, 2 out. 2010. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s10534-010-9329-x>>.

DA COSTA, C. S. et al. The tributyltin leads to obesogenic mammary gland abnormalities in adult female rats. **Toxicology Letters**, v. 307, p. 59–71, jun. 2019. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427419300530>>.

DÖKMECI, A. H.; ONGEN, A. Environmental Toxicity of Cadmium and Health Effect. **Journal of Environmental Protection and Ecology**, v. 10, n. 1, p. 84–93, 2009. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/273123192_Environmental_Toxicity_of_Cadmium_and_Health_Effect>.

DUARTE, E. B. et al. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil.

Chemosphere, v. 262, 1 jan. 2021.

DUMESIC, D. A. et al. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 487–525, 2015.

ECKSTRUM, K. S.; RAETZMAN, L. T. Gonadotropin Receptors. **Encyclopedia of Reproduction**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 137–141. Disponível em: <<https://sci-hub.ru/10.1016/B978-0-12-801238-3.64634-2>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

EFSA. Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **EFSA Journal**, v. 7, n. 3, 1 mar. 2009. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2009.980>>. Acesso em: 29 maio 2020.

EHRMANN, D. A. et al. Effects of race and family history of type 2 diabetes on metabolic status of women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 1, p. 66–71, 2005.

ELEAZU, K.; MADUABUCHI, P.; ELEAZU, C. Effect of ethanol extract of boiled breadfruit (*Treculia Africana*) seed on the oral glucose tolerance, lipid profile, and body weight of normoglycemic albino rats. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 4, p. 904–911, 1 jun. 2018. Disponível em:

<[pmc/articles/PMC6021728/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3021728/)>. Acesso em: 27 jul. 2020.

ESPARZA, L. A. et al. Hyperactive LH Pulses and Elevated Kisspeptin and NKB Gene Expression in the Arcuate Nucleus of a PCOS Mouse Model.

Endocrinology (United States), v. 161, n. 4, p. 1–15, 2020.

FAN, W. et al. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 958–962, 15 fev. 2008.

FAUSER, B. C. J. M. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 1, p. 19–25, 2004.

FICKOVÁ, M. et al. Long lasting cadmium intake is associated with reduction of insulin receptors in rat adipocytes. **BioMetals**, v. 16, n. 4, p. 561–566, 2003.

FLANAGAN, P. R. et al. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. **Gastroenterology**, v. 74, n. 5 PART 1, p. 841–846, 1 maio 1978.

FLEURY. **Manual de Exames/Fleury Medicina e Saúde**. Disponível em: <<https://www.fleury.com.br/medico/exames/cadmio-plasma>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 30 set. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41573-021-00233-1>>. Acesso em: 30 dez. 2022.

FRIBERG, L. et al. **Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal**. [S.l.]: CRC Press, 2019. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9780429522734>>.

FRÓES-ASMUS, C. I. R. et al. Multiple Environmental Exposure in Pregnant Women and Their Children in the City of Rio de Janeiro, Brazil, Rio Birth Cohort Study: PIPA Project. **Exposure and Health**, v. 13, n. 3, p. 431–445, 26 set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12403-021-00394-9>>.

GALLAGHER, C. M.; MOONGA, B. S.; KOVACH, J. S. Cadmium, follicle-

stimulating hormone, and effects on bone in women age 42–60 years, NHANES III. **Environmental Research**, v. 110, n. 1, p. 105–111, jan. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2009.09.012>>.

GENCHI, G. et al. The Effects of Cadmium Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, p. 3782, 26 maio 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7312803/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC7312803/?report=abstract)>. Acesso em: 14 out. 2020.

GOODARZI, M. O. et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 4, p. 219–231, 25 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrendo.2010.217>>.

GOUGEON, A.; ECOCHARD, R.; THALABARD, J. C. Age-Related Changes of the Population of Human Ovarian Follicles: Increase in the Disappearance Rate of Non-Growing and Early-Growing Follicles in Aging Women. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 3, p. 653–663, mar. 1994.

HAOMA. **Cádmio Sanguíneo - Haoma by DNA Clinic**. Disponível em: <<https://dnaclinic.com.br/exames-laboratoriais/cadmio-sanguineo-cadms>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

HERMES PARDINI. **Laboratório Hermes Pardini - Help de Exames**. Disponível em: <<http://www.labhpardini.com.br/scripts/mgwms32.dll?MGWLPN=HPHOSTBS&App=HELPE&EXAME=S%7C%7CMINERA>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

HILL, J. W.; ELIAS, C. F. **Neuroanatomical framework of the metabolic control of reproduction**. **Physiological Reviews**. [S.l.]: American Physiological Society. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30109817/>>. Acesso em: 17 ago. 2020. , 1 out. 2018

HORIGUCHI, H. Itai Itai Disease. **Encyclopedia of Toxicology**. Third Edit ed. [S.l.]: Elsevier, 2014. v. 2. p. 1–2. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00033-6>>.

JABBOUR, H. N. et al. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. **REPRODUCTION**, v. 138, n. 6, p. 903–919, 1 dez. 2009.

Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/138/6/903.xml>>.

Acesso em: 8 ago. 2021.

JACOBO-ESTRADA, T. et al. Cadmium Handling, Toxicity and Molecular Targets Involved during Pregnancy: Lessons from Experimental Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1590, 22 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/7/1590>>.

JÄRUP, L. et al. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. **Scandinavian journal of work, environment & health**, v. 24 Suppl 1, n. 1, p. 1–51, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9569444>>.

JIAO, X. et al. Molecular Genetics of Premature Ovarian Insufficiency. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 795–807, 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276018301309>>. Acesso em: 29 maio 2020.

JURDZIAK, M. et al. Concentration of Thyrotropic Hormone in Persons Occupationally Exposed to Lead, Cadmium and Arsenic. **Biological Trace Element Research**, v. 182, n. 2, p. 196–203, 1 abr. 2018.

KAJI, M. Role of experts and public participation in pollution control: the case of Itai-itai disease in Japan. **Ethics in Science and Environmental Politics**, v. 12, n. 2, p. 99–111, 6 jul. 2012. Disponível em: <www.int-res.com>.

KATAOKA, Y. et al. Surveillance of cadmium concentration in chocolate and cocoa powder products distributed in Japan. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 59, n. 6, p. 269–274, 2018.

KAUFFMAN, A. S. et al. A novel letrozole model recapitulates both the reproductive and metabolic phenotypes of polycystic ovary syndrome in female mice. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 3, 1 set. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26203175/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

KAWAKAMI, T. et al. Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 625–636, 1 nov. 2013. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23921151/>>. Acesso em: 22 fev. 2023.

KAWAKAMI, T. et al. Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue. **Toxicology**, v. 267, n. 1–3, p. 20–26, 12 jan. 2010. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X0900417X>>. Acesso em: 22 fev. 2023.

KIM, S. H. et al. Gender difference in blood cadmium concentration in the general population: Can it be explained by iron deficiency? **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 3, p. 322–327, 2014.

KIRMIZI, D. A. et al. Are Heavy Metal Exposure and Trace Element Levels Related to Metabolic and Endocrine Problems in Polycystic Ovary Syndrome? **Biological Trace Element Research**, v. 198, n. 1, p. 77–86, 5 nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12011-020-02220-w>>. Acesso em: 15 out. 2020.

KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; DIWAN, B. A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 215–220, 1 ago. 2009.

KUMAR, S.; SHARMA, A. **Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. Reviews on Environmental Health**. [S.l.]: De Gruyter. , 2019

LAFUENTE, A. et al. Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 6, p. 605–611, 29 jun. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11395933/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

LEE, Y. min et al. Association between cadmium and anti-Mullerian hormone in premenopausal women at particular ages. **Annals of Occupational and Environmental Medicine**, v. 30, n. 1, p. 44, 9 dez. 2018. Disponível em: <<https://aoemj.org/DOIx.php?id=10.1186/s40557-018-0255-7>>.

LI, Q. et al. Seasonal Variation in the Gonadotropin-Releasing Hormone Response to Kisspeptin in Sheep: Possible Kisspeptin Regulation of the Kisspeptin Receptor. **Neuroendocrinology**, v. 96, n. 3, p. 212–221, 2012.

Disponível em: <www.karger.com>. Acesso em: 23 fev. 2023.

LIAN, Y.; ZHAO, F.; WANG, W. Central leptin resistance and hypothalamic inflammation are involved in letrozole-induced polycystic ovary syndrome rats.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 476, n. 4, p. 306–312, 5 ago. 2016. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27233601/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

LINDÉN, A. et al. Extracellular cadmium in the bronchoalveolar space of long-term tobacco smokers with and without COPD and its association with

inflammation. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary**

Disease, p. 1005, maio 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.2147/COPD.S105234>>.

LIU, A. L. et al. New insights into mTOR signal pathways in ovarian-related diseases: Polycystic ovary syndrome and ovarian cancer. **Asian Pacific**

Journal of Cancer Prevention, v. 17, n. 12, p. 5087–5094, 2016. Disponível

em: <pmc/articles/PMC5454641/>. Acesso em: 23 fev. 2023.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001. Disponível em:

<<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1046202301912629?token=8B40A326DFEF97F191D83D437FBD96161BF7FCDC66AD36E81647C362A0C9985E7D753636CA954597743F89EAD1B126BB>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. .; TANNO, A. . Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. **Brazilian Journal**

Biology, v. 62, n. 4, p. 609–614, 2002.

MARTIN, M. B. et al. Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. **Endocrinology**, v. 143, n. 1, p. 263–275, 1 jan. 2002. Disponível

em: <<https://academic.oup.com/endo/article/143/1/263/2989374>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, N. There and Back Again: Leptin Actions in White

Adipose Tissue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p.

6039, 21 ago. 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/ijms>.

MASSOS, A.; TURNER, A. Cadmium, lead and bromine in beached microplastics. **Environmental Pollution**, v. 227, p. 139–145, ago. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.034>>.

MCCARTNEY, C. R. et al. Maturation of luteinizing hormone (Gonadotropin-releasing hormone) secretion across puberty: Evidence for altered regulation in obese peripubertal girls. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 56–66, 2009.

MCCARTNEY, C. R.; CAMPBELL, R. E. Abnormal GnRH pulsatility in polycystic ovary syndrome: Recent insights. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 12, p. 78–84, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.coemr.2020.04.005>>. Acesso em: 30 out. 2020.

MEEK, T.; MORTON, G. Leptin, diabetes, and the brain. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 9, p. 534, 2012. Disponível em: <www.ijem.in>.

MERLO, E. et al. Mercury leads to features of polycystic ovary syndrome in rats. **Toxicology Letters**, v. 312, n. May, p. 45–54, set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.05.006>>.

MERLO, E. et al. The Environmental Pollutant Tributyltin Chloride Disrupts the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis at Different Levels in Female Rats. **Endocrinology**, v. 157, n. 8, p. 2978–2995, ago. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2015-1896>>.

MINISTÉRIO DA ECONOMIA. **RESOLUÇÃO Nº 2, DE 9 DE ABRIL DE 2020 - RESOLUÇÃO Nº 2, DE 9 DE ABRIL DE 2020 - DOU - Imprensa Nacional**. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-6.734-de-9-de-marco-de-2020-247886194?fbclid=IwAR1qSa7BfsHz80fHzVrHxjEr5g9fr5qAta-h0rLrMBwg1liBAoc3kHQH87M>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

MONTEIRO, C. de S. et al. A critical analysis of the impact of endocrine disruptors as a possible etiology of primary ovarian insufficiency. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 00, n. 0, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://www.jbra.com.br/trab/pub/download_trabalho.php?fileSource=/var/www/vhosts/jbra.com.br/media/trab/arq_1928&fileName=1514-A>.

Critical.pdf&id_trabalho=794>.

MOORE, A. M.; CAMPBELL, R. E. The neuroendocrine genesis of polycystic ovary syndrome: A role for arcuate nucleus GABA neurons. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 160, p. 106–117, 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26455490/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

MYERS, M. et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 569–580, maio 2004.

NAKA, K. S. et al. A comparative study of cadmium levels in blood from exposed populations in an industrial area of the Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 698, p. 134309, 1 jan. 2020.

NAMPOOTHIRI, L. P.; GUPTA, S. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: A cellular model for ovarian toxicity. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 179–185, fev. 2006.

NASIADEK, M. et al. Involvement of oxidative stress in the mechanism of cadmium-induced toxicity on rat uterus. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 364–373, 2014.

Nasiadek, M. et al. Subchronic Exposure to Cadmium Causes Persistent Changes in the Reproductive System in Female Wistar Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–17, 18 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/6490820/>>. Acesso em: 27 maio 2020.

NASIADEK, M. et al. The effect of repeated cadmium oral exposure on the level of sex hormones, estrous cyclicity, and endometrium morphometry in female rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 28, p. 28025–28038, 1 out. 2018.

NAVARRO, V. M. et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. **Journal of Physiology**, v. 561, n. 2, p. 379–386, 1 dez. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15486019/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

NELSON, J. F. et al. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 2, p. 327–39, 1982.

NELSON, L. M. Primary Ovarian Insufficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 6, p. 606–614, fev. 2009.

NIE, X. et al. Blood cadmium in Chinese adults and its relationships with diabetes and obesity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18714–18723, 17 set. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-7078-2>>. Acesso em: 27 maio 2020.

NNA, V. U. et al. Quercetin exerts preventive, ameliorative and prophylactic effects on cadmium chloride - induced oxidative stress in the uterus and ovaries of female Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 102, p. 143–155, 1 abr. 2017.

NORDBERG, G. F. et al. Cadmium. **Handbook on the Toxicology of Metals**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2007. p. 445–486.

NORDBERG, G. F. Contemporary Issues in Toxicology Historical perspectives on cadmium toxicology. 2009.

ODEWUMI, C. et al. Effect of cadmium on the expression levels of interleukin-1 α and interleukin-10 cytokines in human lung cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 5, p. 6422–6426, nov. 2015. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2015.4316>>.

OGUNBIYI, O. J.; OBI, F. O. Evaluation of Gonadotoxic Effects of Cadmium and Iron Administered Via Tainted Diet Singly and Combined in Female Rats. **Journal of Toxicology and Risk Assessment**, v. 8, n. 1, p. 47, 31 dez. 2022. Disponível em: <<https://clinmedjournals.org/articles/ijtra/international-journal-of-toxicology-and-risk-assessment-ijtra-8-047.php?jid=ijtra>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

OLGUN, O.; YILDIZ, A. O.; ŞAHİN, A. Evaluation of dietary presence or use of cadmium in poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 76, n. 1, p. 64–73, 2 jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1729669>>.

OLIVEIRA, T. F. et al. Chronic Cadmium Exposure Accelerates the Development of Atherosclerosis and Induces Vascular Dysfunction in the Aorta of ApoE $-/-$ Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 187, n. 1, p. 163–171, 1 jan. 2019.

OLSZOWSKI, T. et al. Pro-inflammatory properties of cadmium. **Acta biochimica Polonica**, v. 59, n. 4, p. 475–82, jul. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874110004058>>.

ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION. **EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS Seventy-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Food and Agriculture**. . [S.l: s.n.], 2011.

OUGIER, E. et al. Burden of osteoporosis and costs associated with human biomonitored cadmium exposure in three European countries: France, Spain and Belgium. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 234, p. 113747, 1 maio 2021.

PAPA, V. et al. The environmental pollutant cadmium induces homeostasis alteration in muscle cells in vitro. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 11, p. 1073–1080, 23 nov. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40618-014-0145-y>>.

PARENTE, C. E. T. et al. First year after the Brumadinho tailings' dam collapse: Spatial and seasonal variation of trace elements in sediments, fishes and macrophytes from the Paraopeba River, Brazil. **Environmental Research**, v. 193, p. 110526, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935120314237>>. Acesso em: 22 fev. 2023.

PEIXE, T. S. et al. Occupational exposure profile of Pb, Mn, and Cd in nonferrous Brazilian sanitary alloy foundries. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 8, p. 701–713, 26 set. 2014. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233712462464>>. Acesso em: 29 jun. 2021.

PODRATZ, P. L. et al. Accumulation of organotins in seafood leads to

reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 29–42, 2015.

PRIYA, P. N. L.; PILLAI, A.; GUPTA, S. Effect of simultaneous exposure to lead and cadmium on gonadotropin binding and steroidogenesis on granulosa cells: An in vitro study. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 2, p. 143–148, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15282945/>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

PROZIALECK, W. C. Biomarkers for Cadmium. **Encyclopedia of Metalloproteins**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 272–277. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-1533-6_33>.

PRUELL, R. J.; ENGELHARDT, F. R. Liver cadmium uptake, catalase inhibition and cadmium thionein production in the killifish (*Fundulus Heteroclitus*) induced by experimental cadmium exposure. **Marine Environmental Research**, v. 3, n. 2, p. 101–111, 1980.

QUENNEL, J. H. et al. Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1541–1550, abr. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21325051/>>. Acesso em: 31 out. 2020.

RAFATI RAHIMZADEH, M. et al. Cadmium toxicity and treatment: An update. **Caspian J Intern Med**, v. 8, n. 3, p. 135–145, 2017.

ROA, J. et al. The Mammalian Target of Rapamycin as Novel Central Regulator of Puberty Onset via Modulation of Hypothalamic Kiss1 System. **Endocrinology**, v. 150, n. 11, p. 5016–5026, 1 nov. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/150/11/5016/2455466>>.

ROLAND, A. V.; MOENTER, S. M. Reproductive neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome: Insight from animal models. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 494–511, 1 out. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24747343/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

ROMERO-RUIZ, A. et al. Kisspeptin treatment induces gonadotropic responses and rescues ovulation in a subset of preclinical models and women with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, v. 34, n. 12, p. 2495–2512,

2019.

ROOPHA, D.; LATHA, P. Cadmium exposure-induced oxidative stress; delay in sexual maturation and impaired hormones in developing rat ovary. **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**, v. 2, n. 3, p. 181, 2013.

ROSENFELD, R. L.; EHRMANN, D. A. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. **Endocrine Reviews**, v. 37, n. 5, p. 467–520, 1 out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27459230/>>. Acesso em: 31 out. 2020.

SAADIA, Z. Follicle Stimulating Hormone (LH: FSH) Ratio in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) - Obese vs. Non- Obese Women. **Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)**, v. 74, n. 4, p. 289–293, 2020. Disponível em: <www.orcid.org/0000-0001-5545-3902>.

SAEDI, S. et al. Effect of Prepubertal Exposure to CdCl₂ on the Liver, Hematological, and Biochemical Parameters in Female Rats; an Experimental Study. **Biological Trace Element Research**, v. 194, n. 2, p. 472–481, 9 abr. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12011-019-01800-9>>. Acesso em: 27 maio 2020.

SAEDI, S. et al. Exposure to Cadmium Alters the Population of Glial Cell Types and Disrupts the Regulatory Mechanisms of the HPG Axis in Prepubertal Female Rats. **Neurotoxicity Research**, v. 40, n. 4, p. 1029–1042, 2022.

SAKSENA, S. K.; SALMONSEN, R. Effects of cadmium chloride on ovulation and on induction of sterility in the female golden hamster. **Biology of reproduction**, v. 29, n. 1, p. 249–256, 1 ago. 1983. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/2766369/Effects>>. Acesso em: 27 maio 2020.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Effect of chronic exposure to cadmium on serum lipid, lipoprotein and oxidative stress indices in male rats. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 151–154, 1 set. 2015.

SAPMAZ-METIN, M. et al. A morphological study of uterine alterations in mice due to exposure to cadmium. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 92, n. 4, p.

264–273, 19 maio 2017.

SARMIENTO-ORTEGA, V. E. et al. Oral Subacute Exposure to Cadmium LOAEL Dose Induces Insulin Resistance and Impairment of the Hormonal and Metabolic Liver-Adipose Axis in Wistar Rats. **Biological Trace Element Research**, n. 0123456789, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12011-021-03027-z>>.

SATARUG, S. et al. Modeling Cadmium Exposures in Low- and High-Exposure Areas in Thailand. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 5, p. 531–536, maio 2013. Disponível em: <<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.1104769>>. Acesso em: 29 maio 2020.

SATARUG, S.; VESEY, D. A.; GOBE, G. C. **Health risk assessment of dietary cadmium intake: Do current guidelines indicate how much is safe? Environmental Health Perspectives**. [S.l.]: Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. , 2017

SEDMAK, D. D.; HART, W. R.; TUBBS, R. R. Autoimmune oophoritis: A histopathologic study of involved ovaries with immunologic characterization of the mononuclear cell infiltrate. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 43, n. 5, p. 309–310, maio 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3570633/?from_single_result=Autoimmune+oophoritis%3A+a+histopathologic+study+of+involved+ovaries+with+immunologic+characterization+of+the+mononuclear+cell+infiltrate&expanded_search_query=Autoimmune+oophoritis%3A+a+histopat>. Acesso em: 31 maio 2020.

SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614–1627, 23 out. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14573733/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

SENA, G. C. et al. Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 319, p. 22–38, mar. 2017. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X17300492>>.

SHI, D. et al. A unique rodent model of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4425–4436, 2009.

SIVRIDIS, E. et al. Mast cell distribution and density in the normal uterus — metachromatic staining using lectins. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 98, n. 1, p. 109–113, set. 2001. Disponível em: <[https://sci-hub.ru/10.1016/S0301-2115\(00\)00564-9](https://sci-hub.ru/10.1016/S0301-2115(00)00564-9)>. Acesso em: 24 fev. 2023.

SORENSEN, J. A.; NIELSEN, J. B.; ANDERSEN, O. Identification of the Gastrointestinal Absorption Site for Cadmium Chloride in Vivo. **Pharmacology & Toxicology**, v. 73, n. 3, p. 169–173, set. 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8265522/>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

TALLKVIST, J.; BOWLUS, C. L.; LÖNNERDAL, B. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. **Toxicology Letters**, v. 122, n. 2, p. 171–177, jun. 2001. Disponível em: <<https://www.xenbase.org/entry/literature/article.do?method=display&articleId=8777>>. Acesso em: 5 jan. 2023.

TARAKINA, N. V.; VERBERCK, B. A portrait of cadmium. **Nature Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 96–96, 20 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nchem.2699>>.

TATONE, C. et al. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 131–142, abr. 2008.

THÉVENOD, F. et al. Channels, transporters and receptors for cadmium and cadmium complexes in eukaryotic cells: myths and facts. **BioMetals**, v. 32, n. 3, p. 469–489, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10534-019-00176-6>>.

TREVIÑO, S. et al. Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 27–35, 11 ago. 2015.

TSAI, M. et al. Stimulation of leptin secretion by insulin. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 9, p. 543, 2012. Disponível em: <https://journals.lww.com/indjem/Fulltext/2012/16003/Stimulation_of_leptin_secretion_by_insulin.5.aspx>. Acesso em: 22 fev. 2023.

TURNER, A. **Cadmium pigments in consumer products and their health risks. Science of the Total Environment**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718349404>>. , mar. 2019

US EPA IRIS. **Cadmium (CASRN 7440-43-9) | IRIS | US EPA**. . [S.l: s.n.], 1989.

VALLERO, D. Metal and Metalloid Cycles. **Fundamentals of Air Pollution**. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 531–545. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124017337000232>>.

VERGILIO, C. dos S. et al. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5936, 3 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-62700-w>>. Acesso em: 22 fev. 2023.

VILLA, J. E. L.; PEIXOTO, R. R. A.; CADORE, S. Cadmium and lead in chocolates commercialized in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 34, p. 8759–8763, 27 ago. 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf5026604>>. Acesso em: 24 jan. 2023.

WALTERS, K. A. et al. New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 12, p. 841–852, dez. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.08.005>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WANG, H. J. et al. Endocrine disruption of cadmium in rats using the OECD enhanced TG 407 test system. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 27, n. 12, p. 950–959, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3967/bes2014.135>>.

WATTERS, M.; MARTÍNEZ-AGUILAR, R.; MAYBIN, J. A. The Menstrual Endometrium: From Physiology to Future Treatments. **Frontiers in**

Reproductive Health, v. 3, n. 3, p. 393–408, 31 jan. 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frph.2021.794352/full>.

WENG, S. et al. Continuous cadmium exposure from weaning to maturity induces downregulation of ovarian follicle development-related SCF/c-kit gene expression and the corresponding changes of DNA methylation/microRNA pattern. **Toxicology Letters**, v. 225, n. 3, p. 367–377, 21 mar. 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037842741400023X>. Acesso em: 27 maio 2020.

WHO, W. H. O. **Cadmium - Environmental Health Criteria 135**. Geneva: World Health Organization, 1992.

XING, W. et al. Association of blood cadmium and metabolic syndrome: a cross-sectional analysis of National Health and Nutrition Examination Survey 2017–2020. **Environmental Science and Pollution Research**, 2022.

XUYING WAN et al. Rat ovarian follicle bioassay reveals adverse effects of cadmium chloride (CdCl₂) exposure on follicle development and oocyte maturation. **Toxicology and Industrial Health**, v. 26, n. 9, p. 609–618, 14 out. 2010. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233710375949>. Acesso em: 31 maio 2020.

YU, Y.; CHANG, H.-M.; SCHJENKEN, J. E. Editorial: Reproduction and the Inflammatory Response. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 31 jan. 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.835854/full>.

ZALUPS, R. K.; AHMAD, S. **Molecular handling of cadmium in transporting epithelia**. **Toxicology and Applied Pharmacology**. [S.l.]: Academic Press Inc. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12620369/>. Acesso em: 5 jan. 2023. , 1 fev. 2003

ZHANG, H. et al. High-fat diets exaggerate endocrine and metabolic phenotypes in a rat model of DHEA-induced PCOS. **Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 431–441, 1 abr. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26814210/>. Acesso em: 17 ago. 2020.

ZHANG, W. et al. Cadmium exposure in newborn rats ovary induces developmental disorders of primordial follicles and the differential expression of SCF/c-kit gene. **Toxicology Letters**, v. 280, p. 20–28, 5 out. 2017.

ZHAO, S. et al. Leptin: Less is more. **Diabetes**, v. 69, n. 5, p. 823–829, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/dbi19-0018>>. Acesso em: 23 fev. 2023.

ZHAO, Y. et al. Cadmium source identification in soils and high-risk regions predicted by geographical detector method. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114338, 1 ago. 2020.

ZHEN, X. et al. Increased Incidence of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase 1 Gene Mutations in Patients with Primary Ovarian Insufficiency. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132610, 30 jul. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132610>>.