



## **COGUMELO SHIITAKE (*Lentinula edodes*) NÃO PROTEGE CONTRA A REDUÇÃO NA PRODUÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES INDUZIDA PELO CLORETO DE CÁDMIO**

*Franciely Aparecida Vaz Dantas*<sup>1</sup>; *Isabela Lopes*<sup>2</sup>; *Marília Cavariani*<sup>3</sup>; *Josiane de Lima Rosa*<sup>4</sup>; *Suzana de Fátima Paccola Mesquita*<sup>5</sup>

**RESUMO:** O cádmio é um metal pesado com propriedades tóxicas aos organismos que apresenta grande efeito cumulativo e meia vida biológica longa. Suas principais fontes de exposição são o despejo industrial, a poluição atmosférica e o tabaco. Sua toxicidade é, em parte, devida à ação oxidante no organismo, o que estimula a produção de radicais livres levando a danos celulares. Os testículos são particularmente vulneráveis aos efeitos tóxicos desse metal devido ao seu constante processo de divisão e diferenciação. O cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) tem sido descrito mundialmente como um alimento de alto valor nutracêutico. Extratos de *L. edodes* contêm antioxidantes, que diminuem a atividade sequestrante dos radicais livres. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar uma possível ação bioprotetora do cogumelo shiitake sobre os efeitos colaterais causados pelo Cádmio nos órgãos reprodutivos e na produção espermática de ratos Wistar. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com de 10mg/kg pc de extrato de Shiitake e/ou 2mg/Kg pc de Cloreto de Cádmio e distribuídos nos seguintes grupos: 1) Grupo Shiitake(GSH) - extrato de Shiitake durante 50 dias e H<sub>2</sub>O destilada no 51º dia; 2) Grupo Shiitake + Cádmio (GSC) - extrato de Shiitake durante 50 dias e Cloreto de Cádmio no 51º dia; 3) Grupo Controle do solvente (GCO) - dimetilsulfóxido (DMSO) por 50 dias e H<sub>2</sub>O destilada no 51º dia; 4) Grupo Cádmio(GCC) - DMSO por 50 dias e Cloreto de Cádmio no 51º dia. Houve redução significativa na produção de espermatozoides dos animais tratados com cloreto de cádmio, associado ou não ao shiitake e no peso da vesícula seminal com secreção. O cogumelo shiitake parece não apresentar ação bioprotetora sobre os efeitos causados pelo Cádmio nos órgãos reprodutivos e na produção de gametas de ratos Wistar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cloreto de Cádmio, Shiitake, produção espermática.

### **INTRODUÇÃO**

O uso de alimentos funcionais como cogumelos comestíveis e medicinais tem sido estudado por poucos grupos de pesquisadores brasileiros, porém é alvo de interesse de diversos grupos internacionais principalmente devido aos seus aspectos nutracêuticos como potenciais redutores de colesterol, câncer e melhora do sistema imunológico

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). [franciely\\_dantas@hotmail.com](mailto:franciely_dantas@hotmail.com)

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. [isasepol@hotmail.com](mailto:isasepol@hotmail.com)

<sup>3</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. [marycavariani@hotmail.com](mailto:marycavariani@hotmail.com)

<sup>4</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. [josylr@hotmail.com](mailto:josylr@hotmail.com)

<sup>5</sup> Orientadora, Professora Doutora do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. [mesquita@uel.br](mailto:mesquita@uel.br)

(Chang, 1996). Geralmente, são ricos em fibras alimentares, minerais, vitaminas e apresentam baixo teor de gordura. Além disso, os cogumelos contêm vários compostos polifenólicos reconhecidos como excelentes oxidantes. Uma espécie considerada notável neste contexto é o *Lentinula edodes*, conhecido como shiitake, segundo mais popular entre os cogumelos comestíveis, e o terceiro mais cultivado no mundo. O cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) tem sido descrito mundialmente como um alimento de alto valor gastronômico, nutricional e nutracêutico (Flegg *et al.*, 1985).

Juntamente com o chumbo e o mercúrio, o cádmio (Cd) é um dos três metais pesados mais venenosos encontrados como poluentes ambientais (Manahan, 1988). Atualmente, este elemento torna-se um importante poluente ambiental, amplamente utilizado na produção industrial de fertilizantes fosfatados, pigmentos, baterias, plásticos, estabilizadores, entre outros (Kumar *et al.*, 2000). O fumo também é uma importante fonte de cádmio. Uma característica importante na toxicologia do cádmio é sua tendência de acumular-se no organismo, apresentando uma meia-vida biológica longa, de 10 a 30 anos (Robardes; Worsfold, 1991), além de apresentar uma ação oxidante no organismo, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando a danos celulares.

Os testículos apresentam alta taxa de acumulação de cádmio, provavelmente por estar em constante processo de divisão e diferenciação, o que o torna mais suscetível à ação de substâncias tóxicas (Yano; Dolder, 2002). Portanto, os testículos constituem um importante modelo experimental para estudos referentes à toxicidade do cádmio e às possíveis alternativas terapêuticas aos efeitos adversos deste metal. A partir destas informações, o presente estudo teve como objetivo avaliar uma possível ação bioprotetora do cogumelo shiitake sobre as alterações causadas pelo cloreto de cádmio nos órgãos reprodutivos e produção espermática de ratos adultos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar, sexualmente maduros com 90 dias de idade. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: 1) Grupo Controle do solvente (GCO) – Animais tratados com injeção intraperitoneal de 0,05mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 50 dias e uma injeção intraperitoneal de 1mL de H<sub>2</sub>O destilada no 51° dia; 2) Grupo Cádmio (GCC) – Animais tratados com injeção intraperitoneal de 0,05mL de DMSO por 50 dias e uma injeção intraperitoneal de Cloreto de Cádmio no 51° dia; 3) Grupo Shiitake (GSH) – Animais tratados com injeção intraperitoneal de extrato de Shiitake durante 50 dias e uma injeção intraperitoneal de 1mL de H<sub>2</sub>O destilada no 51° dia; 4) Grupo Shiitake + Cádmio (GSC) – Animais tratados com injeção intraperitoneal de extrato de Shiitake durante 50 dias e uma injeção intraperitoneal de Cloreto de Cádmio no 51° dia. O Cloreto de Cádmio foi administrado na dose única de 2mg/kg pc (Kini *et al.*, 2009), diluída em de 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada e o extrato do cogumelo shiitake na dose de 10mg/Kg (Akamatsu, *et al.* 2004) diluído em DMSO (0,05mL), ambos via intraperitoneal.

Os animais foram pesados, submetidos à eutanásia 48h após o fim dos tratamentos, e os seguintes órgãos foram pesados: testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal cheia e vazia. O testículo e epidídimo direitos foram congelados e posteriormente processados para estimativa das reservas espermáticas. A túnica albugínea do testículo foi retirada e o parênquima, colocado em um tubo Falcon previamente pesado, foi congelado para posterior processamento. Após o descongelamento, foi adicionado ao tubo contendo o parênquima, 5mL de solução STM (0,9% NaCl, 0,05% Triton X100, 0,01% Thimerosol) e feita a homogeneização do órgão. Em seguida, o homogeneizado foi diluído 1:10 com STM, e as células (espermátides-19) contadas em câmara de Neubauer sob microscópio de contraste de fase.

O epidídimo foi dividido em duas partes antes de ser congelado: cabeça/corpo e cauda, para o cálculo do trânsito espermático. Cada parte, após pesagem, foi congelada em tubos Falcon para posterior processamento. Descongelado, adicionou-se 1 mL de STM para cada 200mg de tecido da região cabeça/corpo e 1 mL de STM para cada 100mL de tecido da região da cauda. Em seguida, o material foi picotado com tesoura pequena e homogeneizado e diluído em 1:20 com STM - 50µl da amostra + 950µl de STM, e as células (espermatozoides) contadas em câmaras de Neubauer sob microscópio de contraste de fase.

Os resultados experimentais obtidos em cada grupo foram comparados estatisticamente através do programa INSTAT 3.0 (GraphPad Software) utilizando-se análise de variância (ANOVA) complementada, a posteriori, com o teste de Tukey-Kramer sempre que encontrado  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A intoxicação por Cloreto de Cádmio levou à diminuição significativa no peso da vesícula seminal cheia mesmo em associação ao shiitake. Nos demais órgãos não foi observada alteração significativa (Tabela 1). Este resultado está de acordo com os de Predes et al. (2009) que trataram os animais durante sete dias com Cloreto de Cádmio na dose de 1,2 mg/Kg pc.

**Tabela 1** – Variáveis analisadas para avaliação do Cloreto de Cádmio sobre os pesos corpóreo e órgãos reprodutivos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>Cloreto de Cádmio</b>	<b>Cloreto de Cádmio e Shiitake</b>	<b>Shiitake</b>
Peso Corpóreo (g)	361,24 ± 7,48 <sup>a</sup>	356,59 ± 10,39 <sup>a</sup>	347,58 ± 8,15 <sup>a</sup>	373,85 ± 12,97 <sup>a</sup>
Testículo (g)	1,54 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,04 <sup>a</sup>
Epidídimo (g)	0,56 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>a</sup>
Próstata (g)	0,52 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,02 <sup>a</sup>
Vesícula com secreção (g)	0,93 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,05 <sup>ab</sup>
Vesícula sem secreção (g)	0,38 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>b</sup>
Índice Gonadossomático (g)	0,86 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,02 <sup>a</sup>

Valores expressos em Média ± E.P.M. Letras diferentes indicam diferença, letras iguais indicam semelhança entre as médias.

Alterações significativas foram observadas nas reservas espermáticas totais e por grama do testículo e epidídimo e na produção diária de espermatozoides dos animais tratados com Cloreto de Cádmio em associação ou não com cogumelo shiitake (Tabela 2). Kini et al. (2009), também observaram alterações significativas na contagem espermática de animais tratados com Cloreto de Cádmio na dose de 2,0 mg/Kg pc. A maioria das células germinativas pode ter sido destruída em função da degradação macromolecular membranosa causada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelo Cloreto de Cádmio com consequente diminuição da contagem espermática.

**Tabela 2** - Reservas espermáticas totais e por grama do testículo e epidídimo.

<b>Parâmetros</b>		<b>Controle</b>	<b>Cloreto de Cádmio</b>	<b>Cloreto de Cádmio e Shiitake</b>	<b>Shiitake</b>
Testículo (x10 <sup>6</sup> )	Sptz/g. Test.	118,56 ± 11,62 <sup>a</sup>	92,23 ± 7,52 <sup>ab</sup>	82,52 ± 5,04 <sup>b</sup>	137,61 ± 6,82 <sup>ac</sup>
	Sptz. no Test.	186,88 ± 12,25 <sup>a</sup>	120,52 ± 9,66 <sup>b</sup>	118,14 ± 7,76 <sup>b</sup>	191,25 ± 7,36 <sup>a</sup>
Cabeça/ corpo do epidídimo (x10 <sup>6</sup> )	Sptz/g. órgão	451,91 ± 32,80 <sup>a</sup>	215,81 ± 15,88 <sup>b</sup>	250,40 ± 19,74 <sup>b</sup>	394,52 ± 19,99 <sup>a</sup>
	Sptz. no órgão	126,35 ± 9,84 <sup>a</sup>	57,34 ± 5,53 <sup>b</sup>	65,62 ± 5,88 <sup>b</sup>	118,51 ± 8,81 <sup>a</sup>
Cauda do epidídimo (x10 <sup>6</sup> )	Sptz/g. órgão	763,41 ± 28,25 <sup>a</sup>	663,53 ± 28,40 <sup>ab</sup>	705,79 ± 46,40 <sup>abc</sup>	843,97 ± 43,01 <sup>ac</sup>
	Sptz. no órgão	214,58 ± 7,67 <sup>a</sup>	191,48 ± 9,49 <sup>a</sup>	182,56 ± 15,87 <sup>a</sup>	200,76 ± 6,56 <sup>a</sup>
PDE (x10 <sup>6</sup> )		30,63 ± 2,00 <sup>a</sup>	19,77 ± 1,58 <sup>b</sup>	19,36 ± 1,27 <sup>b</sup>	31,35 ± 1,20 <sup>a</sup>
Trânsito espermático cabeça/corpo (x10 <sup>6</sup> )		4,23 ± 0,34 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,57 ± 0,43 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,34 <sup>a</sup>
Trânsito espermático cauda (x10 <sup>6</sup> )		7,36 ± 0,65 <sup>a</sup>	10,81 ± 1,83 <sup>a</sup>	10,7 ± 1,34 <sup>a</sup>	6,41 ± 0,32 <sup>a</sup>

Valores expressos em Média ± E.P.M. Letras diferentes indicam diferença, letras iguais indicam semelhança entre as médias.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que, na dose utilizada, o cogumelo shiitake parece não demonstrar ação bioprotetora sobre os efeitos causados pelo Cádmio nos órgãos reprodutivos e na produção de gametas de ratos Wistar.

## REFERÊNCIAS

- AKAMATSU, S.; WATANABE, A.; TAMESADA, M.; NAKAMURA, R.; HAYASHI, S. KODAMA, D.; KAWASE, M.; YAGI, K. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on Dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.*, v.27, n.12, p.1957-1960, 2004.
- CHANG, R. Functional properties mushrooms. *Nutrition Reviews*, v. 54, n.11, p.591-593, 1996.
- FLEGG, P. B., WOOD, D. A.. Growth and Fruiting. In: Flegg, P. B.; Spencer, D. M. & Wood, D. A. The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom. Dorchester: Great Britain. p.141-178, 1985.
- KINI, R. D., NAYANATAR, A.K., RAMSWAMY, C. PAI, S.R. BHAT, R.M., MANTUR, V.S. Infertility in male Wistar rats induced by cadmium chloride: role of ascorbic acid. *Journal of Chinese Clinical Medicine*, v.11, p.616-621, 2009.

KUMAR, R., PANT, N., SRIVASTAVA, S.P. Chlorinated pesticides and heavy metals in human semen. *International Journal of Andrology*, v.23, n.3, p.145-149, 2000.

MANAHAN, S.E. Toxicological Chemistry: A Guide to toxic substances in chemistry. 1988.

PREDES, F. S.; DIAMANTE, M. A. S.; DOLDER, H. Testis response to low doses of cádmium in Wistar rats. *Int. J. Exp. Path.* v.91, p.125-131, 2010.

ROBARDES, K., WORSFOLD, P. Cadmium: Toxicology and Analyses. A Review. *The Analyst*, v.116, p.549-568, 1991.

YANO, C.L., DOLDER, H. Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment. *Contraception*, v.66, p.463-467, 2002.