

**EFEITO DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES CARDIOVASCULARES
POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO EM RATOS WISTAR**

JAIR JOSÉ GOLGHETTO

**EFEITO DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES CARDIOVASCULARES
POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO EM RATOS WISTAR**

JAIR JOSÉ GOLGHETTO

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dra. Gisele Alborghetti
Nai

636.089 59 Golghetto, Jair José.
G625e Efeito do Ph da água na gênese de lesões
cardiovasculares por intoxicação por cádmio em
ratos wistar / Jair José Golghetto. – Presidente
Prudente, 2015.
28 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Cádmio. 2. pH. 3. Coração. I. Título.

JAIR JOSÉ GOLGHETTO

**EFEITO DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES CARDIOVASCULARES
POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 27 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Bruno Andraus Filardi
Escola Paulista De Medicina/ Unifesp
São Paulo -SP

Prof. Dra. Francis Lopes Paganelli
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

Este trabalho é dedicado à minha esposa Gisele, pela compreensão e apoio, aos meus filhos Felipe e Lucas, estímulos maiores, por entenderem minha ausência, e à memória da minha mãe Iolanda, pelos princípios que norteiam minha existência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus colegas mestrados, pelo companheirismo em nossa jornada; aos funcionários, pela presteza e auxílio inestimáveis; ao corpo docente do mestrado da Unoeste, pela paciência, dedicação e competência. Meu agradecimento maior à minha orientadora, colega de profissão, professora doutora Gisele Alborghetti Nai, que tornou este trabalho possível.

“O importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

EFEITO DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES CARDIOVASCULARES POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO EM RATOS WISTAR

O cádmio é um metal pesado e dos mais abundantes elementos não essenciais encontrados no ambiente, sendo muito utilizado na indústria. Existem evidências que apontam no sentido do cádmio poder provocar efeitos deletérios cardiovasculares.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do pH da água de beber na gênese de lesões cardiovasculares provocadas pela intoxicação por cádmio.

Material e métodos: Para este estudo, foram utilizados 90 ratos Wistar, machos. Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n=15): A – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água com pH básico (pH 8,0). D – água de beber com pH ácido (pH 5,0); E – água de beber com pH básico (pH 8,0); F – água com pH neutro (pH 7,0). Animais de todos os grupos foram sacrificados após 6 meses. Foi coletado o coração e a aorta de cada rato para análise microscópica. **Resultados:** Não foram observadas alterações microscópicas no coração. Na aorta, se observou estrias de gordura na maioria dos animais dos grupos A (50%) e B (46%) e na minoria dos animais dos grupos C (15,3%), D (0%), E (7,7%) e F (13,3%) ($p < 0,05$). **Conclusão:** O cádmio provocou o aparecimento de estrias de gordura na aorta dos animais expostos e a exposição deste metal em pH básico diminuiu a formação desta alteração.

Palavras-chave: cádmio, pH, coração.

ABSTRACT

EFFECT OF Ph OF WATER IN THE GENESIS OF CARDIOVASCULAR INJURY IN CADMIUM POISONING IN WISTAR RATS

Cadmium is a heavy metal and the most abundant non-essential elements found in the environment, being widely used in the industry. There is evidence that cadmium can cause cardiovascular injury. **Objective:** The purpose of our study was to investigate the effect of water pH in the genesis of cardiovascular injury caused by cadmium poisoning. **Methods:** For this study, 90 male Wistar rats were used. The animals were divided into 6 groups (n=15): A - cadmium chloride (CdCl₂ – 400 mg / L) in drinking water at a neutral pH of 7.0; B - CdCl₂ (400 mg / L) in drinking water at an acidic pH of 5.0; C - CdCl₂ (400 mg / L) in drinking water at a basic pH of 8.0; D - water at an acidic pH of 5.0; E - water at a basic pH of 8.0; F - water with a neutral pH (pH 7.0). Animals in all groups were sacrificed after 6 months. We collected the heart and aorta of each rat for microscopic analysis. **Results:** No microscopic changes were observed in the heart. In aortic, there were fatty streaks in most animals of group A (50%) and B (46%) and in a minority of animals of group C (15.3%), D (0%), and (7%) and C (13.3%) (p <0.05). **Conclusion:** Cadmium caused the development of fatty streaks in the aorta of animals exposed and exposure of this metal in basic pH decreased the formation of this lesion.

Keywords: cadmium, pH, heart.

SUMÁRIO

1	ARTIGO	10
	ANEXOS	22
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAUL (UNOESTE).....	23
	ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH.....	24

1 ARTIGO

EFEITO DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES CARDIOVASCULARES POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO EM RATOS WISTAR

EFFECT OF pH OF WATER IN THE GENESIS OF CARDIOVASCULAR INJURY IN CADMIUM POISONING IN WISTAR RATS

Jair José Golghetto¹, Gisele Alborghetti Nai², Mariani Paulino Soriano Estrella³, Juliana Apolônio Alves³, Leonardo Alves Garcia³.

¹Discente de Mestrado, Médico, Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Doutora, professora do Departamento de Patologia e do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

³Discente de graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

Correspondência: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil.

RESUMO

O cádmio é um metal pesado e dos mais abundantes elementos não essenciais encontrados no ambiente, sendo muito utilizado na indústria. Existem evidências que apontam no sentido do cádmio poder provocar efeitos deletérios cardiovasculares. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do pH da água de beber na gênese de lesões cardiovasculares provocadas pela intoxicação por cádmio. **Material e métodos:** Para este estudo, foram utilizados 90 ratos Wistar, machos. Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n=15): A – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água com pH básico (pH 8,0). D – água de beber com pH ácido (pH 5,0); E – água de beber com pH básico (pH 8,0); F – água com pH neutro (pH 7,0). Animais de todos os grupos foram sacrificados após 6 meses. Foi coletado o coração e a aorta de cada rato para análise microscópica. **Resultados:** Não foram observadas alterações microscópicas no coração. Na aorta, se observou estrias de gordura na maioria dos animais dos grupos A (50%) e B (46%) e na minoria dos animais dos grupos C (15,3%), D (0%), E (7,7%) e F (13,3%) (p<0,05). **Conclusão:** O cádmio provocou o aparecimento de estrias de gordura na aorta dos animais expostos e a exposição deste metal em pH básico diminuiu a formação desta alteração.

Palavras-chave: cádmio, acidificação, coração, aorta, aterosclerose.

ABSTRACT

Cadmium is a heavy metal and the most abundant non-essential elements found in the environment, being widely used in the industry. There is evidence that cadmium can cause cardiovascular injury. **Objective:** The purpose of our study was to investigate the effect of water pH in the genesis of cardiovascular injury caused by cadmium poisoning. **Methods:** For this study, 90 male Wistar rats were used. The animals were divided into 6 groups (n=15): A - cadmium chloride (CdCl₂ – 400 mg / L) in drinking water at a neutral pH of 7.0; B - CdCl₂ (400 mg / L) in drinking water at an acidic pH of 5.0; C - CdCl₂ (400 mg / L) in drinking water at a basic pH of 8.0; D - water at an acidic pH of 5.0; E - water at a basic pH of 8.0; F - water with a neutral pH (pH 7.0). Animals in all groups were sacrificed after 6 months. We collected the heart and aorta of each rat for microscopic analysis. **Results:** No microscopic changes were observed in the heart. In aortic, there were fatty streaks in most animals of group A (50%) and B (46%) and in a minority of animals of group C (15.3%), D (0%), and (7%) and C (13.3%) (p <0.05). **Conclusion:** Cadmium caused the development of fatty streaks in the aorta of animals exposed and exposure of this metal in basic pH decreased the formation of this lesion.

Key words: cadmium, acidification, heart, aorta, atherosclerosis.

INTRODUÇÃO

Fumos, poeiras e restos das fundições de minério, incineração de produtos constituídos por cádmio, queima de combustíveis fósseis, fertilizantes e as respectivas lamas agrícolas, o tabaco, as águas de resíduos municipais e descargas de esgotos são fontes importantes de cádmio (Cd) [1,5], além de vegetais, peixes, moluscos e crustáceos [1,5] e produtos odontológicos como ligas de prata (utilizadas na ortodontia) e alginato [8], o que pode levar a contaminação humana, resultando em doenças associadas a intoxicação por este metal pesado.

O Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (painel CONTAM) notou que a ingestão média de cádmio nos países europeus está próxima ou discretamente ultrapassando o limite de 2,5 µg/kg de peso corporal [2]. Além disso, notou-se que subgrupos da população, como os vegetarianos, mulheres em fase reprodutiva da vida, fumantes e pessoas que vivem em áreas altamente contaminadas podem exceder a ingestão semanal tolerável em até duas vezes [15].

Embora a influência do cádmio no sistema cardiovascular ainda seja controversa [15], há fortes evidências que o cádmio mesmo em baixas concentrações de exposição, ainda é uma causa importante de morte em geral e por doenças cardiovasculares [17].

Alguns estudos mostram hipertensão arterial sistêmica em pacientes expostos ao cádmio [15]. Os efeitos cardíacos do cádmio podem ser sobre a estrutura e integridade do tecido e sobre a condução cardíaca [9]. Em um estudo com ratos utilizando 100ppm de cádmio na água, observou-se hipertrofia e fusão dos cardiomiócitos e focos de necrose de fibras cardíacas, além de dano microestrutural severo [4].

O status de fumante em seres humanos está correlacionado com a concentração de cádmio nas três camadas arteriais. Estudos mostram alta concentração de cádmio na camada média quando comparado com o soro, mostrando que a parede vascular também é um órgão alvo para o depósito de cádmio [9].

Um dos principais fatores que afeta a disponibilidade dos metais pesados às plantas é o pH do solo, o qual apresenta, em geral, relação inversa com a disponibilidade desses elementos [3]. O estudo de Nai et al. [13] mostrou que o pH ácido aumentou a formação de lesões pré-neoplásicas na próstata de animais expostos ao cádmio. Porém, não há estudos na literatura avaliando a influência do pH da água de beber na toxicidade cardiovascular do cádmio.

Além da exposição ocupacional, o cádmio é um metal que contamina diversos alimentos, e desta forma pode contaminar também os seres humanos [5]. O risco de intoxicação em pacientes contaminados por este metal é alto [5]. Portanto, a necessidade de maneiras alternativas e simples de se evitar as consequências da intoxicação provocada por este elemento é importante.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do pH da água de beber na gênese de lesões cardiovasculares provocadas pela intoxicação por cádmio.

MATERIAL E METODOS

Protocolo animal

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA – UNOESTE) (Protocolo nº 2010).

Para este estudo, foram utilizados 90 ratos Wistar (*Ratus Norvegicus albinus*), adultos, machos, com peso entre 200 a 250g. Os ratos foram separados e agrupados em número de três em caixas grandes retangulares, medindo 49x34x16cm, preconizadas para alojamento de cinco ratos adultos. Os ratos foram mantidos em biotério climatizado em umidade (50±15%) e temperatura (25±2°C) e com fotoperíodo normal (12 horas de claro e escuro) controlados.

A exposição ao cádmio foi feita com cloreto de cádmio (CdCl₂ - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), com as seguintes especificações: hidrato mínimo de 98%, conteúdo de água de aproximadamente 2,5 mole/mole. A solução de cloreto cádmio foi dada aos animais na água de beber, todos os dias durante 6 meses, dissolvido na concentração de 400mg/L (alterado [12]). A água foi acidificada com ácido clorídrico e alcalinizada com hidróxido de sódio. A troca da água do bebedouro foi realizada três vezes por semana, para evitar alteração do pH. As soluções residuais de água com cádmio foram encaminhadas para central de resíduos da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e neutralizadas para posterior descarte. A água residual nos bebedouros foi medida a cada troca de solução, para se saber a ingestão média de cada animal.

Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n=15): A – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH neutro (pH 7,0); B – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água de beber com pH ácido (pH 5,0); C – solução de cloreto de cádmio (400mg/L) na água com pH básico (pH 8,0). D – água de beber com pH ácido (pH 5,0); E – água de beber com pH básico (pH 8,0); F – água com pH neutro (pH 7,0). Animais de todos os grupos receberam água e ração *ad libitum*.

Os ratos de todos os grupos foram sacrificados 6 meses após o início do experimento. A eutanásia foi realizada com Pentobarbital sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg administrado na cavidade peritoneal [16]. A necropsia foi realizada e foram retirados o coração e a aorta de cada rato para análise microscópica.

Análise anatomopatológica

O coração e a aorta foram fixados em formol a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil) de metade do coração após corte longitudinal e de cinco fragmentos da aorta após corte transversal. Cortes de 5 μ foram obtidos e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil). Os cortes histológicos da aorta também foram corados com Verhoeff-van Gienson (VVG) para melhor identificação da lâmina elástica (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A análise histopatológica foi cega e realizada por um único observador experiente (GAN), utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão) e avaliaram-se os seguintes parâmetros, com seus respectivos escores: 1. Coração: infiltrado inflamatório intersticial (0=ausente, 1=leve, 2= moderado, 3=intenso) e tipo de célula inflamatória presente (polimorfonucleares e/ou mononucleares); congestão tecidual: (0=ausente, 1=leve, 2=moderado, 3= intenso); alterações nas fibras musculares (atrofia, necrose, hipertrofia, esclerose - 0=ausente, 1=presente); alterações vasculares (arterioesclerose e aterosclerose - 0=ausente, 1=focal, 2=difusa) e lesões neoplásicas benignas e lesões neoplásicas malignas (0=ausente, 1=presente); 2. Aorta: aterosclerose (graduada em: 0=ausente, 1=estrias de gordura, 2=leve, 3=moderada, e 4=grave).

Análise estatística

Foi realizado o teste Likelihood Ratio (LR) e para se fazer as comparações 2 x 2, utilizou-se a correção de Holm-Sidak para controlar a taxa de erro grupal (α = 5%). Adotou-se o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Cinco animais morreram ao longo do estudo (um do grupo A, um do grupo C, um do grupo D e dois do grupo E). A causa de morte dos animais do grupo A e C foi edema agudo pulmonar, complicação esta associada à exposição ao cádmio [5]. Nos animais do grupo D e E, não foi possível se estabelecer a causa *mortis* após a necrópsia.

A ingestão média de água por animal por dia no Grupo A foi de 55ml, no Grupo B de 57ml, no Grupo C de 52ml, no Grupo D de 60ml, no grupo E de 70ml e no Grupo F de 73ml, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Coração

Não foram observados infiltrado inflamatório intersticial, congestão tecidual, alterações nas fibras musculares (atrofia, necrose, hipertrofia, esclerose), alterações vasculares (arterioesclerose e aterosclerose) nem presença lesões neoplásicas benignas e malignas no coração em nenhum dos grupos avaliados (Figura 1).

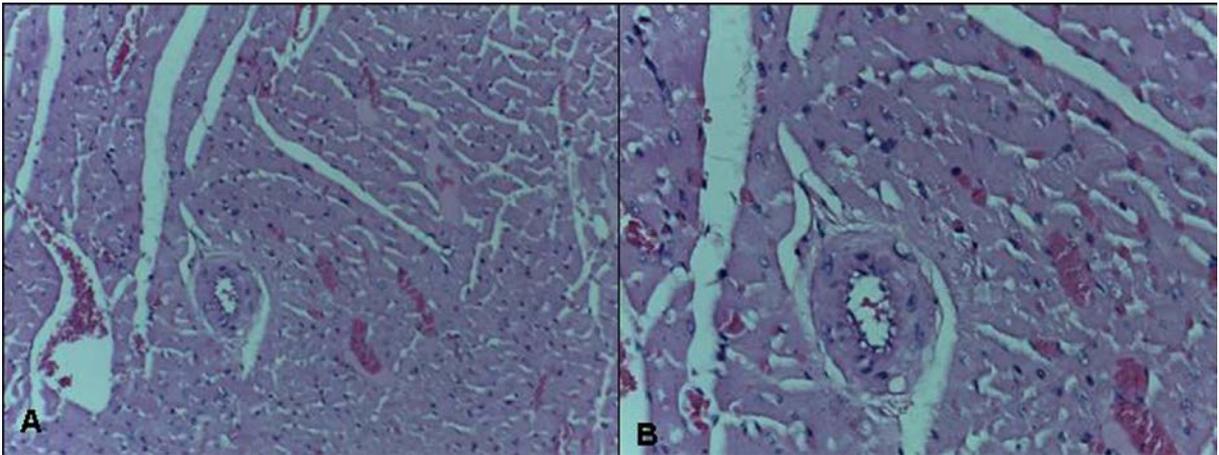


Figura 1 - Fotomicroscopia do coração de animal do grupo A sem alterações (Hematoxilina-eosina, A - aumento de 100x, B - aumento de 400x).

Aorta

A alteração encontrada na aorta dos animais foi estria de gordura (Figura 2), não sendo observada placa de ateroma. A incidência de estrias de gordura nos animais dos grupos A e B diferiu significativamente dos animais dos grupos C, D, E e F ($p < 0,05$) (Tabela 1).

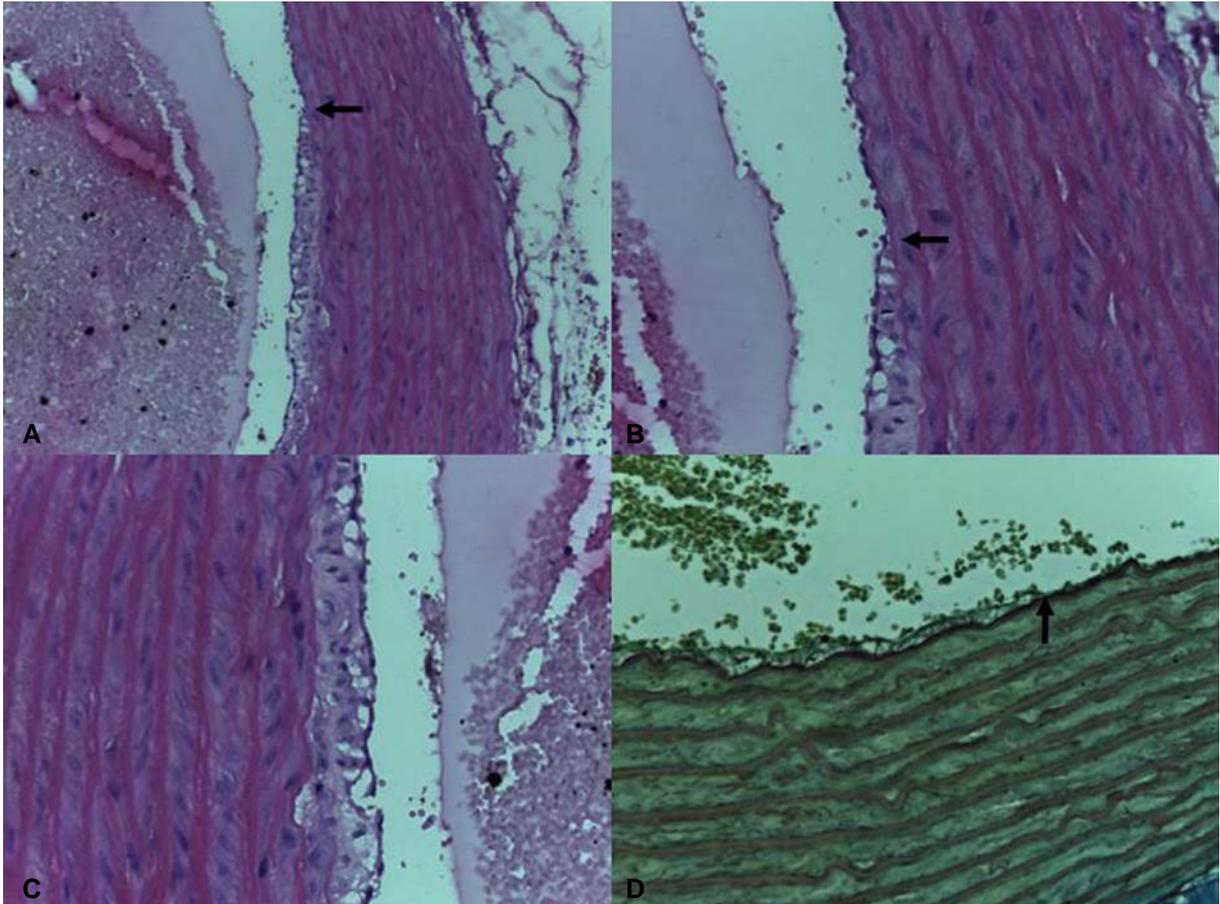


Figura 2 - Fotomicroscopia da aorta de animal do grupo B mostrando elevação do endotélio pela presença de macrófagos xantomatosos na camada íntima (estrias de gordura). As setas indicam a transição entre o endotélio normal (à direita) e o alterado (à esquerda) (A, B e C - Hematoxilina-eosina, aumento de 40x, 100x e 400x, respectivamente; D – Verhoeff-van Gienson - VVG, aumento de 100x).

Tabela 1 – Frequência de estrias de gordura na aorta dos animais, segundo o grupo de estudo (n=84).

Grupos	Estrias de colesterol
A	7/14 (50%) ^a
B	7/15 (46,6%) ^a
C	2/13 (15,3%) ^b
D	0/14 (0%) ^b
E	1/13 (7,7%) ^b
F	2/15 (13,3%) ^b

*Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0.05$).

DISCUSSÃO

As principais vias de contaminação por cádmio para o ser humano são a inalatória e por ingestão. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a ingestão diária máxima de cádmio deve ser de 1 µg/kg de massa corporal [18]. Neste estudo, os animais foram expostos a 400mg de cádmio / litro de água ingerida, um valor bem acima da ingestão diária permitida, simulando situações de contaminação ambiental em larga escala.

Não há uma concordância na literatura sobre o tratamento da intoxicação por cádmio. Estudos anteriores, *in vitro*, indicam efeito protetor do zinco (Zn) sobre o dano cardiovascular provocado pelo cádmio [6,10]. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se o pH da água teria efeito sobre a toxicidade cardiovascular do cádmio.

A aterosclerose é a base da maioria das doenças cardiovasculares, e tem início nas fases precoces da vida. As alterações da parede arterial podem começar na infância e progredirem lentamente por décadas [9]. O estudo de Navas-Acien et al. [14] mostrou que a razão de chance de doença arterial periférica era de 2,82 para a maior concentração de cádmio sanguínea (6.23 nmol/l ou 0.70 µg/l) quando comparada com as menores dosagens (3.56 nmol/l ou 0.40 µg/l). O cádmio vem sendo considerado um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose [7,11]. As células endoteliais absorvem o cádmio e permitem o transporte deste para o espaço subendotelial. O cádmio é absorvido pelas células musculares lisas, iniciando a proliferação destas células, levando ao espessamento da camada média da parede do vaso. O cádmio interrompe as ligações intercelulares endoteliais, assim, facilita a sua difusão e permite que os lipídeos e as células do sistema imunológico tenham acesso à camada íntima. O acúmulo das células musculares lisas na íntima, invasão da íntima por macrófagos, morte das células endoteliais, de células musculares lisas e de células espumosas, promove a inflamação, iniciando um grave processo de remodelação tecidual, incluindo depósito de matriz extracelular e lagos de lipídeos livres. Assim, o processo aterosclerótico, com formação da placa e a progressão da doença, é iniciado [9]. Neste estudo, observou-se maior incidência de formação de estrias de gordura (lesão inicial da aterosclerose) nos animais expostos ao cádmio em água com pH neutro e ácido e aqueles que foram expostos a este metal pesado em água com pH básico apresentaram incidência desta lesão semelhante aos grupos não expostos. Estes dados mostram que o pH básico confere certa proteção a formação de estrias de gordura na exposição ao cádmio. Assim, o uso de água com pH básico deve ser preferido por pessoas expostas ao cádmio. O aparecimento de estrias de gordura em alguns animais dos demais grupos não expostos ao cádmio pode ser devido à idade avançada dos animais.

A patofisiologia dos efeitos do cádmio sobre a estrutura e integridade do tecido cardíaco ainda não está bem estabelecida. Os possíveis mecanismos são: dano oxidativo, redução do fluxo coronário, inibição da transferência elétrica entre cardiomiócitos e interação

direta do cádmio com troponina e mioglobina [9]. Os efeitos sobre o sistema de condução cardíaco são baseados em interações do cádmio com sistemas de contração e estimulação [9].

Os pulmões absorvem de 10 a 40% do cádmio inalado, enquanto que o cádmio ingerido através dos alimentos e da água é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal (5-7%), sendo a maior parte eliminada pelas fezes [1]. Este fato pode justificar a ausência de lesões cardíacas nos animais expostos ao cádmio neste estudo, sugerindo que a exposição ao cádmio via ingestão não leva a lesões cardíacas à microscopia óptica. Porém, isto não descarta a possibilidade de ocorrência de lesões funcionais, associadas à condução elétrica cardíaca, ou de lesões microestruturais, que só podem ser observadas à microscopia eletrônica.

Estudos que avaliem a função elétrica e a microestrutura cardíaca poderão trazer mais substrato para compreensão do efeito do pH sobre a toxicidade cardíaca do cádmio.

CONCLUSÃO

O pH básico da água parece proteger da formação de aterosclerose nos animais expostos ao cádmio.

AGRADECIMENTOS

A Edvaldo Mamede dos Santos, pelo preparo das soluções.

CONFORMIDADE COM AS NORMAS ÉTICAS

Divulgação de potenciais conflitos de interesse

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão a partir de qualquer agência de fomento em setores públicos, comerciais ou sem fins lucrativos.

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Pesquisas envolvendo animais

Todos os procedimentos realizados no estudo envolvendo animais estavam de acordo com os padrões éticos da instituição em que este foi realizado.

REFERENCIAS

1. Bernhoft RA (2013) Cadmium Toxicity and Treatment. The Scientific World Journal. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/394652>.
2. CONTAM (2009) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on cadmium in food. EFSA J 980:1-139.

3. Clemens S, Aarts MG, Thomine S, Verbruggen N (2013) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant. Sci.* 18:92-99. doi: 10.1016/j.tplants.2012.08.003.
4. Ferramola ML, Pérez Díaz MF, Honoré SM, Sánchez SS, Antón RI, Anzulovich AC, Giménez MS (2012) Cadmium-induced oxidative stress and histological damage in the myocardium. Effects of a soy-based diet. *Toxicol Appl Pharmacol* 265(3): 380-9.
5. Järup L, Akesson A (2009) Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238: 201-208. doi:10.1016/j.taap.2009.04.020.
6. Kaji T, Mishima A, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H (1993) Zinc protection against cadmium-induced destruction of the monolayer of cultured vascular endothelial cells. *Toxicol Lett* 66:247-255.
7. Knoflach M, Messner B, Shen YH, Frotschnig S, Liu G, Pfaller K, Wang X, Matosevic B, Willeit J, Kiechl S, Laufer G, Bernhard D (2011) Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. *Circ J* 75(10): 2491-5.
8. Menezes LM, Freitas MPM, Gonçalves TS (2009) Biocompatibility of orthodontic materials: myth or reality? *Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial* 14 (2):144-7.
9. Messner B, Bernhard D (2010) Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. *Biometals* 23:811–22. doi: 10.1007/s10534-010-9314-4
10. Messner B, Knoflach M, Seubert A, Ritsch A, Pfaller K, Henderson B, Shen YH, Zeller I, Willeit J, Laufer G, Wick G, Kiechl S, Bernhard D (2009) Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and in vivo relevance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29(9):1392-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.190082.
11. Mlynek V, Skoczynska A (2005) The proinflammatory activity of cadmium. *Postepy Hig Med Dosw* 59: 1-8.
12. Motta ACF, Migliari DA, Gioso MA, Komesu MC, Sala MA, Lopes RA (2004) The carcinogenic potential of cadmium in the palatal and gingival epithelium of rats. A morphologic and morphometric analysis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 41:183-188.
13. Nai GA, Golghetto GM, Estrella MPS, Teixeira LDS, Moura FC, Bremer Neto H, Parizi JLS (2014) Influence of pH of water in the genesis of cancer in cadmium poisoning: an experimental study in rats. *Histology and Histopathology* (in press).
14. Navas-Acien A, Tellez-Plaza M, Guallar E, Muntner P, Silbergeld E, Jaar B, Weaver V (2009) Blood cadmium and lead and chronic kidney disease in US adults: a joint analysis. *Am J Epidemiol* 170:1156–64.

15. Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Munters E, Cuypers A, Richart T, Ruttens A, Smeets K, Clijsters H, Vangronsveld J (2010) Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals* 23:769–82. doi: 10.1007/s10534-010-9343-z
16. Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS (2005) Course Handling of Laboratory Animals. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. Acesso em 03 jun 2012.
17. Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Menke A, Crainiceanu CM, Pastor-Barriuso R, Guallar E (2012) Cadmium exposure and all-cause and cardiovascular mortality in the U.S. general population. *Environ Health Perspect* 120(7): 1017-22.
18. WHO (1992) World Health Organization. Environmental Health Criteria, cadmium. World Health Organization, Geneva, v. 134.

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)

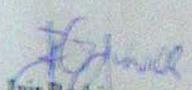
Universidade do Oeste Paulista
UNOESTE
Presidente Prudente - SP

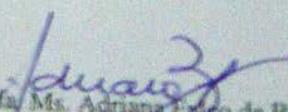
Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DO pH DA ÁGUA NA GÊNESE DE LESÕES CARDIOVASCULARES POR INTOXICAÇÃO POR CÁDMIO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq), sob o número nº 2010, tendo como pesquisador responsável a Profa. GISELE ALBORGHETTI NAI e os discentes JAIR JOSE GOLGHETTO, JULIANA APOLÔNIO ALVES, LEONARDO ALVES GARCIA e MARIANI PAULINO SORIANO ESTRELLA, foi avaliado e APROVADO nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP.

Presidente Prudente, 13 de Maio de 2014.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq


Profa. Ms. Adriana Falso de Brito
Coordenadora da CEUA-UNOESTE

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH

Biol Trace Elem Res
DOI 10.1007/s12011-014-0216-0

pH Dependence of Cadmium-Contaminated Drinking Water on the Development of Cardiovascular Injury in Wistar Rats

Gisele Alborghetti Nai · Jair José Golghetto ·
Mariani Paulino Soriano Estrella ·
Juliana Apolônio Alves · Leonardo Alves Garcia

Received: 30 October 2014 / Accepted: 17 December 2014
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The purpose of our study was to investigate the effect of water pH in the genesis of cardiovascular injury caused by cadmium poisoning. For this study, 90 male Wistar rats were used, divided into six groups: A, 15 rats that received 400 mg/l cadmium chloride (CdCl_2) in drinking water at a neutral pH of 7.0; B, 15 rats that received CdCl_2 (400 mg/l) in drinking water at an acidic pH of 5.0; C, 15 rats that received CdCl_2 (400 mg/l) in drinking water at a basic pH of 8.0; D, 15 rats that received water at an acidic pH of 5.0; E, 15 rats that received water at a basic pH of 8.0; and F, 15 rats that received water at a neutral pH of 7.0. All animals were euthanized after 6 months. We collected the heart and aorta from each rat for microscopic analysis. No microscopic changes were observed in the hearts. In the aorta, fatty streaks appeared in a large proportion of animals in groups A (50 %) and B (46 %), but fatty streaks appeared in a smaller minority of

animals in groups C (15.3 %), D (0 %), E (7 %), and F (13.3 %) ($p < 0.05$). Cadmium exposure caused the development of fatty streaks in the aorta of animals and the exposure to this metal in basic pH decreased the formation of these lesions.

Keywords Cadmium · Acidification · Heart · Aorta · Atherosclerosis

Introduction

Cadmium (Cd) is produced by a variety of sources. This heavy metal is introduced into the environment by fumes, dust, and debris from ore smelters, burning of cadmium-based products and fossil fuels, the use of tobacco, fertilizers, and related agricultural sludge, municipal waste water, and sewage discharges [1, 5]. Additional sources of cadmium include vegetables, fish, and shellfish [1, 5]. Even silver alloy dental products (used in orthodontics) and alginate (a polysaccharide found in some algae) can result in diseases associated with heavy metal intoxication [7].

The Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain [2] noted that the average intake of cadmium in European countries is close to or slightly exceeding the limit of 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight [2]. Furthermore, it was noted that subgroups of the population, such as vegetarians, smokers, and people living in highly contaminated areas may exceed the tolerable weekly intake by up to two times [14].

Although the influence of cadmium on the cardiovascular system remains controversial [14], there is strong evidence

G. A. Nai
Department of Pathology, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680 Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

J. J. Golghetto
Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680 Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

M. P. S. Estrella · J. A. Alves · L. A. Garcia
Medical College, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680 Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

G. A. Nai (✉)
Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680 Presidente Prudente, São PauloSP, Brazil
e-mail: patologia@unoeste.br

that exposure to cadmium, even at low concentrations, is still a major contributor to death from a range of causes including cardiovascular disease [16].

Some studies show increased hypertension in patients exposed to cadmium [14], which may be due to the impact of cadmium on the structure and integrity of cardiac tissue and the cardiac conduction system [8]. One study showed that exposing rats to 100 ppm of cadmium in water induced hypertrophy and fusion of cardiomyocytes in addition to observed foci of cardiac fiber necrosis and severe microstructural damage [4].

Smoking habits are correlated with the concentration of cadmium in the three arterial layers. Studies show a high concentration of cadmium in the middle layer when compared with the serum, indicating that the vascular wall is also a target organ for depositing cadmium [8].

One of the main factors affecting the ability of plants to access heavy metals is the soil pH, which is generally inversely related to the availability of these elements [3]. The study from Nai et al. [12] showed that acidic pH increased the formation of precancerous lesions in the prostates of animals exposed to cadmium. However, no studies have evaluated the influence of the pH on the cardiovascular toxicity of cadmium-contaminated water.

In addition to occupational exposure, cadmium is a metal that contaminates many foods and through this route can also infect humans [5]. The risk of poisoning in patients exposed to this metal is high [5]. Thus, there is a need for simple, alternative ways to ameliorate the consequences of cadmium intoxication.

The objective of this study was to evaluate the pH effects of cadmium-contaminated drinking water on the development of cardiovascular lesions.

Material and Methods

Animals and Treatments

This study was approved by the Ethics Committee for Animal Use at the University of Oeste Paulista (CEUA-UNOESTE; Protocol no. 2010). All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

For our study, we used 90 male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing 200–250 g. The rats were divided into groups of four and placed in large rectangular boxes (measuring 49 × 34 × 16 cm) suitable for the accommodation of up to five adult rats. Animals were maintained under a controlled temperature of 25 ± 2 °C, relative humidity of 50 ± 15 % and normal photoperiod (12–12-h light–dark cycles).

The cadmium source used was cadmium chloride (CdCl₂; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) with a hydration of at least 98 % and water content of approximately 2.5 mol/mol. For 6 months, CdCl₂ was given to the animals in their drinking water daily at a concentration of 400 mg/l (adapted from Motta et al. [11]). The pH of the water was adjusted using hydrochloric acid or sodium hydroxide. Drinking water was changed three times a week to maintain the pH. Any wastewater containing cadmium was sent to the central reservoir of the University of Oeste do Paulista (UNOESTE) and neutralized for disposal. The quantity of water remaining in the rat troughs was measured each time the solution was changed to estimate the average intake of each animal. Also, the pH of the remaining water was measured to ensure that the pH remained the same.

The animals were divided into six groups: group A, 15 rats that received cadmium chloride in their drinking water at a neutral pH 7.0; group B, 15 rats that received cadmium chloride in their drinking water at an acidic pH 5.0; group C, 15 rats that received cadmium chloride in their drinking water at a basic pH 8.0; group D, 15 rats that received drinking water at an acidic pH 5.0; group E, 15 rats that received drinking water at a basic pH 8.0; and group F, 15 rats that received drinking water at a neutral pH 7.0.

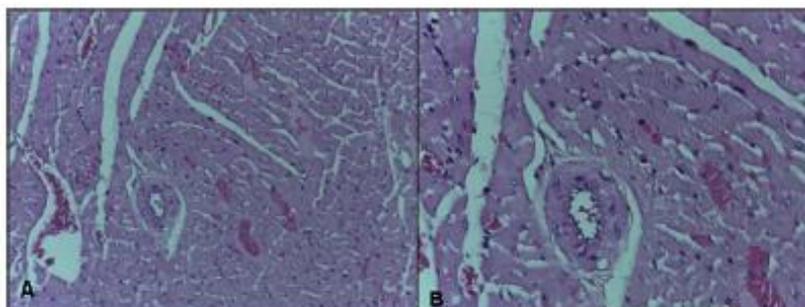
Animals of all groups were euthanized 6 months after the beginning of the experiment. Euthanasia was performed by intraperitoneal injection of thiopental (Syntec, USA) at a dose of 100 mg/kg [15]. The onset of death was inferred by the absence of breathing movements, heartbeat, and protective reflexes [15]. Necropsy was performed and the heart and aorta from each rat were removed for microscopic analysis.

Histological Study

Half of the heart and five longitudinal cross-section fragments of the aorta were fixed in 10 % formalin (Chemical Kinetics, São Paulo, Brazil) for 24 h, subjected to standard histological processing, and paraffin embedded (Dynamic Analytical Reagents, São Paulo, Brazil). Sections of 5-µm thickness were obtained and stained with hematoxylin-eosin (HE) (Dolles, São Paulo, Brazil). Histological sections of the aorta were also stained with Verhoeff-van Gienson (VVG) for better identification of the elastic lamina (Merck, Darmstadt, Germany).

Histopathologic analysis was blinded and performed by a single experienced observer (GAN) using a conventional optical microscope (NIKON Labophot, Japan). The following parameters were evaluated with the respective scoring

Fig. 1 Photomicroscopy of the heart without changes (animal from group A; hematoxylin-eosin, a $\times 100$ magnification, b $\times 400$ magnification)



scheme: 1. heart: interstitial inflammatory infiltrate (0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe) and inflammatory cell-type present (polymorphonuclear and/or mononuclear cells); tissue congestion (0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe); changes in muscle fibers (atrophy, necrosis, hypertrophy, sclerosis - 0 = absent, 1 = present); vascular changes (arteriosclerosis and atherosclerosis, 0 = absent, 1 = focal, 2 = diffuse); benign and malignant neoplastic lesions (0 = absent, 1 = present); and 2. Aortic atherosclerosis (0 = absent, 1 = fatty streaks, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe).

Statistical Analysis

The likelihood ratio (LR) test was performed. To make comparisons 2×2 , we used the Holm-Sidak correction to control the group error rate ($\alpha = 5\%$). Statistical tests were performed at a significance level of 5%.

Results

Five animals died during the course of our study (one rat each from groups A, C, and D and two rats from group E). The cause of death for the animals from group A and C was acute pulmonary edema, a complication associated with cadmium exposure [5]. It was not possible to establish the cause of death for the rats from groups D and E.

The average water intake per animal per day was as follows: 55 ml for group A (approximately 22 mg of cadmium), 57 ml for group B (approximately 22.8 mg of cadmium), 52 ml for group C (approximately 20.8 mg of cadmium), 60 ml for group D, 70 ml for group E, and 73 ml for group F. No statistically significant difference was found between the groups with respect to cadmium intake and water intake ($p > 0.05$).

Fig. 2 Photomicroscopy of the aorta showing an elevation of the endothelium by the presence of foam cells in the intimal layer (fatty streaks). Arrows indicate transition from the normal endothelial cells (right) and the altered cells (left) (animal from group B; a, b c Hematoxylin-eosin, $\times 40$, $100\times$, and $\times 400$ magnification, respectively; d Verhoeff-van Gienson VVG, $\times 100$ magnification)

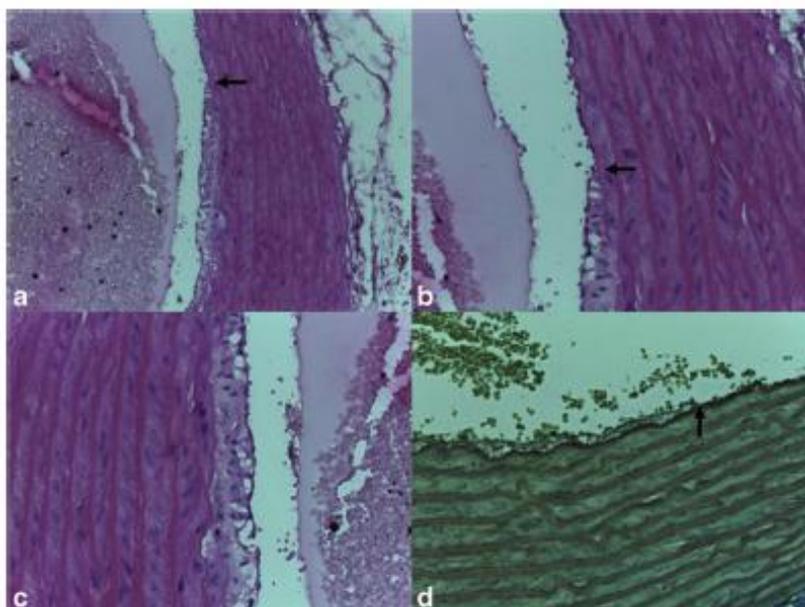


Table 1 Frequency of fatty streaks in the aorta of animals, according to the study group ($n = 84$)

Groups	Fatty streaks
A	7/14 (50 %) ^a
B	7/15 (46,6 %) ^a
C	2/13 (15,3 %) ^b
D	0/14 (0 %) ^b
E	1/13 (7,7 %) ^b
F	2/15 (13,3 %) ^b

Superscript letters are a comparison between groups; a different letter superscript denotes a significant difference ($p < 0.05$)

Heart

In the hearts of all animals assessed, no interstitial inflammatory infiltrate, tissue congestion, changes in muscle fibers (atrophy, necrosis, hypertrophy, sclerosis), vascular changes (arteriosclerosis and atherosclerosis), nor benign or malignant neoplastic lesions were observed (Fig. 1).

Aorta

The only abnormality found in the aorta of the animals was fatty streaks (Fig. 2). No atheroma was observed. The incidence of fatty streaks in the animals of groups A and B differ significantly from those of animals in groups C, D, E, and F ($p < 0.05$) (Table 1).

Discussion

The main routes of human cadmium exposure are inhalation and ingestion. According to the World Health Organization (WHO), the maximum daily intake of cadmium should be 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight [17].

Atherosclerosis is the basis of most cardiovascular diseases and begins in early life. Changes in the arterial wall may begin in childhood and progress slowly over decades [8]. A study by Navas-Acien et al. [13] showed that the odds ratio of peripheral arterial disease was 2.82 for the highest concentration of blood cadmium (6.23 nmol/l or 0.70 mg/l) compared with lower doses (3.56 nmol/l or 12.40 mg/l). Cadmium exposure is considered a risk factor for developing atherosclerosis [6, 9, 10]. Endothelial cells absorb cadmium and can transport the metal to the subendothelial space. Smooth muscle cells also absorb cadmium, initiating the proliferation of these cells and thus leading to the thickening of the medial layer of the vessel wall. Cadmium disrupts the endothelial intercellular connections, thus facilitating their diffusion and allows

lipids and immune cells to access the intima layer. The accumulation of smooth muscle cells in the intima, the intimal invasion by macrophages, and the death of endothelial cells promotes inflammation. The inflammation causes severe tissue remodeling, including extracellular matrix deposition and the appearance of lakes of free lipid. These events thus initiate the atherosclerotic process with plaque formation and progression of the disease [8]. In this study, we observed a higher incidence of fatty-streak formation (an initial lesion of characteristic of atherosclerosis) in animals exposed to cadmium in water with neutral or acidic pH. Those animals exposed to this heavy metal in water at basic pH showed an incidence of this injury similar to the non-exposed groups. These data suggests that the basic pH could provide a level of protection against the formation of cadmium-induced fatty streaks. Thus, the use of water with alkaline pH could be preferable for people exposed to cadmium. The appearance of fatty streaks in a portion of non-exposed animals may be due to the advanced age of the animals.

The pathophysiological effects of cadmium on the structure and integrity of cardiac tissue is still not well established. Possible mechanisms include oxidative damage, reduced coronary flow, inhibited conductivity between cardiomyocytes, and the direct interaction of cadmium with troponin and myoglobin [8]. The effects on the cardiac conduction system are based on interactions between cadmium and the systems for contraction and stimulation [8]. In our study, there was an absence of cardiac lesions in animals exposed to cadmium.

The lungs absorb from 10 to 40 % of inhaled cadmium, while ingested cadmium is poorly absorbed from the gastrointestinal tract (5–7 %) and is mostly eliminated in feces [1]. This fact may explain the absence of cardiac lesions in animals exposed to cadmium in this study as optical microscopy failed to reveal any cardiac injury. However, it is possible that functional injury associated with cardiac electrical conduction or microstructural damage can be detected only with electron microscopy. Studies evaluating the electrical function and cardiac microstructure may provide a better understanding of the pH dependence of cardiac effects due to cadmium toxicity.

Conclusion

Cadmium-contaminated drinking water caused the appearance of fatty streaks in the aorta of rats and a basic pH decreased the formation of this change. However, there were no cardiac lesions in the optical microscopy analysis, independent of the pH.

Acknowledgments The authors thank Edvaldo Mamede dos Santos for solution preparation

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest This research received no grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors declare that there is no conflict of interest.

Research involving animals All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

References

- Bernhoft RA (2013) Cadmium toxicity and treatment. *Scientific World Journal*. doi:10.1155/2013/394652
- CONTAM (2009) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on cadmium in food. *EFSA J* 980:1–139
- Clemens S, Aarts MG, Thomine S, Verbruggen N (2013) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci* 18:92–99. doi:10.1016/j.tplants.2012.08.003
- Ferramola ML, Pérez Díaz MF, Honoré SM, Sánchez SS, Antón RI, Anzulovich AC, Giménez MS (2012) Cadmium-induced oxidative stress and histological damage in the myocardium. Effects of a soy-based diet. *Toxicol Appl Pharmacol* 265(3):380–389
- Jänip L, Akesson A (2009) Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:201–208. doi:10.1016/j.taap.2009.04.020
- Knoflach M, Messner B, Shen YH, Frotschnig S, Liu G, Pfaller K, Wang X, Matosevic B, Willeit J, Kiechl S, Lafer G, Bernhard D (2011) Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. *Circ J* 75(10):2491–2495
- Menezes LM, Freitas MPM, Gonçalves TS (2009) Biocompatibility of orthodontic materials: myth or reality? *Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial* 14(2):144–147
- Messner B, Bernhard D (2010) Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. *Biomaterials* 23:811–822. doi:10.1007/s10534-010-9314-4
- Messner B, Knoflach M, Seubert A, Ritsch A, Pfaller K, Henderson B, Shen YH, Zeller I, Willeit J, Lafer G, Wick G, Kiechl S, Bernhard D (2009) Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and in vivo relevance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(9):1392–1398. doi:10.1161/ATVBAHA.109.190082
- Mlynek V, Skoczynska A (2005) The proinflammatory activity of cadmium. *Postepy Hig Med Dosw* 59:1–8
- Motta ACF, Migliari DA, Gioso MA, Komesu MC, Sala MA, Lopes RA (2004) The carcinogenic potential of cadmium in the palatal and gingival epithelium of rats. A morphologic and morphometric analysis. *Br J Vet Res AnimSci* 41:183–188
- Nai GA, Golghetto GM, Estrella MPS, Teixeira LDS, Moun FC, Bremer Neto H, Parizi JLS (2015) Influence of pH of water in the genesis of cancer in cadmium poisoning: an experimental study in rats. *Histol Histopathol* 30:61–67
- Navas-Acien A, Tellez-Plaza M, Guallar E, Muntner P, Silbergeld E, Jaar B, Weaver V (2009) Blood cadmium and lead and chronic kidney disease in US adults: a joint analysis. *Am J Epidemiol* 170:1156–1164
- Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Munters E, Cuypers A, Richart T, Ruttens A, Smeets K, Clijsters H, Vangronsveld J (2010) Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biomaterials* 23:769–782. doi:10.1007/s10534-010-9343-z
- Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS (2005) Course handling of laboratory animals. *Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz*. Disponível em: http://www.biocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. Acesso em 03 jun 2012
- Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Menke A, Crainiceanu CM, Pastor-Barriuso R, Guallar E (2012) Cadmium exposure and all-cause and cardiovascular mortality in the U.S. general population. *Environ Health Perspect* 120(7):1017–1022
- WHO (1992) World Health Organization. *Environmental Health Criteria, cadmium*, vol 134. World Health Organization, Geneva