

VIVIANE GORETE SILVEIRA Mouro

AÇÃO ANTIOXIDANTE DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* MART.) FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO CÁDMIO NO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS ADULTOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T
M931a
2018

Mouro, Viviane Gorete Silveira, 1987-
Ação antioxidante de açaí (*Euterpe oleracea* MART.) frente
ao estresse oxidativo induzido pelo cádmio no testículo de
camundongos adultos / Viviane Gorete Silveira Mouro. –
Viçosa, MG, 2018.
x, 120 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Matéria médica vegetal. 2. Testículos - Histologia.
3. Reprodução. 4. Stress oxidativo. 5. Antioxidantes.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 615.321

VIVIANE GORETE SILVEIRA MOURO

AÇÃO ANTIOXIDANTE DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* MART.) FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO CÁDMIO NO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS ADULTOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2018.


Kyvia Lugate Cardoso Costa


Camilo Amaro de Carvalho


Paulo Cesar Stringheta


Sirlene Souza Rodrigues Sartori


Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades, pela força e por me fazer forte ao longo da caminhada. Sem Ele nada seria possível.

A minha família, por compreenderem minha ausência ao longo desses anos. Ao meu pai José Walter (em memória), por sempre demonstrar orgulho de minhas escolhas e conquistas, e meus irmãos Álvaro e Walter pelo incentivo e por apostarem em mim. Especialmente a minha mãe Graça por me incentivar a ter um curso superior e não ter medido esforços para que fosse possível, além de apostar nas minhas escolhas. Ao meu marido Wanderson, que me acompanhou durante o mestrado e agora no doutorado. Pelo apoio, incentivo e compreensão da ausência mesmo na presença. Por me fazer forte quando acreditei não ter mais forças, por me carregar quando não consegui mais sozinha. Com você essa jornada tornou-se mais doce.

Ao meu estimado orientador Sérgio da Matta, não somente pela orientação e ensinamentos acadêmicos, que muito contribuíram para minha formação. Agradeço também pelas conversas diárias sempre animadas e acompanhadas de um cafezinho que só ele sabe preparar. Pelos aprendizados de vida, conselhos e preocupação demonstrados. Obrigada por acreditar e pelas palavras ditas nos momentos certos. Agradeço pelo seu profissionalismo e competência que muito me inspiram em minha vida profissional.

Agradeço as minhas co-orientadoras Fabiana Cristina S. A. de Melo e Marli do Carmo Cupertino, por compartilharem seu conhecimento, por todas as contribuições e ensinamentos ao longo dessa caminhada.

Preciso agradecer também a outros mestres vindos anteriormente. Primeiro a Mariana Neves por ter me orientado no mestrado, sem ele o doutorado não seria possível. Ao Camilo Amaro, orientador na graduação, obrigada por todo conhecimento passado, pelo profissional que é por também me inspirar. Obrigada por ter me mostrado o caminho para a pós-graduação.

Para a realização deste trabalho algumas parcerias foram necessárias. Assim, agradeço a todos os professores parceiros, João Paulo Viana Leite no Departamento de Bioquímica, Mariella B. D. De Freitas no Departamento de Biologia Animal, Antônio Jacinto Demuner no Departamento de Química, Paulo César Stringheta no Departamento de Tecnologia de Alimentos e Juraci Alves de Oliveira na Biologia

Celular e Estrutural. Obrigada por disponibilizarem seus laboratórios, equipamentos e reagentes. Ao Faustino Pereira Monteiro técnico no Departamento de Zootecnia. Ao Tonye Gil M. Waughon, professor na Universidade do Estado do Pará pela coleta e processamento do açaí. Extendo os agradecimentos aos respectivos alunos Rodrigo, Jerusa, Gabriela e Thaís.

Aos membros da banca examinadora, por disponibilizarem seu tempo para leitura. Por todas as contribuições na correção deste trabalho.

Aos colegas do laboratório 333, Susana, Luiz, Felipe, Talita, Graziela, Juliana, Marcela e Lidiane por todos esses anos de convívio, pelas risadas muitas vezes no momento certo, pelas confraternizações sempre muito divertidas. Ao Mateus, técnico do laboratório, pela ajuda no preparo dos reagentes. A Kyvia, pelo estágio e pelos primeiros aprendizados, antes mesmo do mestrado. Em especial ao grupo do Sérgio, a Janaína, Verônica, Eduardo, Ana Luiza, Fernanda, Elisabeth e Amanda, por toda a ajuda desde o experimento até a obtenção dos resultados, além do companherismo. Só se foi possível concluir este trabalho tendo uma grande equipe. A Tatiana pela amizade que se estende antes do mestrado.

A Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Biologia Geral e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, não somente pelo doutorado, mas também pelo mestrado. Por todos estes anos que aqui passei. Sim, tenho orgulho de dizer que sou UFV!

A CAPES pela bolsa concedida e ao CNPQ pelo financiamento no projeto.

Aos meus alunos na Faculdade Univértix, mesmo sem perceber vocês contribuíram para que eu pudesse chegar neste momento. A Faculdade, pelo apoio durante o doutorado.

Por fim aos animais, peça fundamental na realização deste trabalho. Obrigada!

SUMÁRIO

| | Páginas |
|---|---------|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | ix |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Cádmio | 1 |
| 1.2. Toxicidade do cádmio | 2 |
| 1.3. Antioxidante e reprodução masculina | 4 |
| 1.4. <i>Euterpe oleracea</i> MARTIUS | 7 |
| 2. Objetivos | 10 |
| 2.1. Objetivo geral | 10 |
| 2.2. Objetivo específico | 10 |
| 3. Referências | 11 |
| | |
| Artigo 1 | |
| Toxicidade testicular de camundongos adultos à exposição aguda ao cádmio administrado via intraperitoneal e via oral | 19 |
| Resumo | 19 |
| Introdução | 19 |
| Material e Métodos | 21 |
| Animais | 21 |
| Grupos experimentais e coleta do material biológico | 21 |
| Determinação do bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais | 22 |
| Avaliação do estresse oxidativo | 22 |
| Processamento histológico | 23 |
| Histopatologia testicular | 23 |
| Viabilidade celular | 24 |
| Histomorfometria testicular | 24 |
| <i>Morfometria tubular</i> | 24 |
| <i>Morfometria intertubular</i> | 26 |
| Determinação da concentração sérica de testosterona..... | 26 |
| Análises estatísticas | 27 |
| Resultados | 27 |
| Bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais | 27 |
| Estresse oxidativo | 27 |
| Parâmetros biométricos..... | 29 |
| Histopatologia testicular | 30 |
| Viabilidade celular | 30 |
| Histomorfometria testicular | 33 |
| Concentração sérica de testosterona..... | 37 |
| Discussão | 38 |
| Conclusões | 41 |
| Referências | 42 |
| | |
| Artigo 2 | |
| Óleo de <i>Euterpe oleracea</i> MARTIUS reverte alterações testiculares induzidas pelo cádmio | 48 |
| Resumo | 48 |
| Introdução | 48 |

| | |
|--|----|
| Material e Métodos | 50 |
| Obtenção do óleo de <i>E. oleracea</i> | 50 |
| Análise qualitativa e quantitativa do óleo de <i>E. oleracea</i> | 50 |
| Animais | 50 |
| Grupos experimentais e coleta do material biológico | 51 |
| Processamento histológico | 51 |
| Histopatologia testicular | 52 |
| Viabilidade celular | 52 |
| Histomorfometria testicular | 52 |
| <i>Morfometria tubular</i> | 53 |
| <i>Morfometria intertubular</i> | 54 |
| Determinação da concentração sérica de testosterona..... | 55 |
| Determinação do bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais | 55 |
| Avaliação do estresse oxidativo | 55 |
| Análises estatísticas | 56 |
| Resultados | 57 |
| Análise qualitativa e quantitativa do óleo de <i>E. oleracea</i> | 57 |
| Parâmetros Biométricos | 58 |
| Histopatologia testicular | 60 |
| Viabilidade celular | 60 |
| Histomorfometria testicular | 64 |
| Concentração sérica de testosterona..... | 64 |
| Bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais | 69 |
| Estresse oxidativo | 71 |
| Discussão | 73 |
| Conclusões | 76 |
| Referências | 77 |

Artigo 3

| | |
|--|----|
| Compostos fenólicos de <i>Euterpe oleracea</i> MARTIUS (Açaí) reduzem efeitos tóxicos do cádmio em parâmetros testiculares de camundongos adultos | 84 |
| Resumo | 84 |
| Introdução | 84 |
| Material e Métodos | 85 |
| Obtenção da polpa desengordurada rica em antocianinas de <i>E. oleracea</i> | 85 |
| Determinação da atividade antioxidante da PDRA <i>in vitro</i> | 86 |
| Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais da PDRA..... | 86 |
| Dosagem das antocianinas totais por espectrofotometria da PDRA..... | 87 |
| Determinação do conteúdo mineral da PDRA..... | 87 |
| Animais | 87 |
| Grupos experimentais e coleta do material biológico | 88 |
| Determinação do bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais testiculares | 88 |
| Avaliação do estresse oxidativo | 89 |
| Processamento histológico | 90 |
| Histopatologia testicular | 90 |
| Viabilidade celular | 90 |
| Histomorfometria testicular | 91 |
| <i>Morfometria tubular</i> | 91 |

| | |
|---|-----|
| <i>Morfometria intertubular</i> | 92 |
| Determinação da concentração sérica de testosterona..... | 93 |
| Análises estatísticas | 93 |
| Resultados | 94 |
| Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> , conteúdo de compostos fenólicos totais e de antocianinas da PDRA..... | 94 |
| Conteúdo mineral da PDRA..... | 94 |
| Bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais essenciais testiculares. | 95 |
| Estresse oxidativo | 95 |
| Parâmetros Biométricos | 98 |
| Histopatologia testicular | 98 |
| Viabilidade celular | 98 |
| Histomorfometria testicular | 98 |
| Concentração sérica de testosterona..... | 103 |
| Discussão | 108 |
| Conclusões | 112 |
| Referências | 113 |
| | |
| 4. Considerações finais | 119 |

RESUMO

MOURO, Viviane Gorete Silveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Ação antioxidante do açaí (*Euterpe oleracea* MART.) frente ao estresse oxidativo induzido pelo cádmio no testículo de camundongos adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadoras: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo e Marli do Carmo Cupertino.

O Cádmio (Cd) é um metal pesado, cuja contaminação na água e solo é bem conhecida. O Cd interfere no metabolismo de vários órgãos, particularmente nos testículos, onde é capaz de romper a barreira hematotesticular, com apoptose das células germinativas e perda do epitélio. Alteração nas células de Leydig e redução na concentração sérica de testosterona também refletem ação do Cd. O Cd pode competir com minerais essenciais e com isso causar o desbalanço destes elementos no testículo. Além disso, o estresse oxidativo é um dos mecanismos de toxicidade do metal. Dessa forma, vários estudos têm-se voltado para a descoberta de produtos naturais com ação antioxidante frente ao Cd. Dentre as plantas com potencial antioxidante destaca-se o açaí da Amazônia (*Euterpe oleracea*). Seu fruto é conhecido por sua atividade antioxidante devido a presença de compostos fenólicos, destacando-se as antocianinas, e de ácidos graxos presentes na fração lipídica. Assim, neste trabalho inicialmente foi comparada a toxicidade do Cd por diferentes vias e forma de administração, para posteriormente ser feita a escolha da via na avaliação dos efeitos do óleo e da polpa desengordurada rica em antocianinas (PDRA) de *E. oleracea*. Camundongos Swiss receberam CdCl₂ nos modos seguintes: 1,5 mg/Kg intraperitoneal (*i.p.*) dose única; 30 mg/Kg via oral dose única e 4,28 mg/Kg via oral durante 7 dias. No oitavo dia os animais foram eutanasiados. O Cd bioacumulou em todas as vias, sendo maior na oral fracionada. As concentrações de Ca e Cu testicular reduziram em todos os animais expostos ao Cd, enquanto que Zn e Mn reduziram apenas na via *i.p.*. A atividade de SOD reduziu em ambas formas de administração via oral, CAT aumentou na via *i.p.*, Glutathiona aumentou em todos os animais intoxicados. A concentração sérica de testosterona reduziu em ambas administrações via oral. Danos tubulares foram mais intensos naqueles que receberam o metal via oral fracionado. Assim, quanto o Cd é ofertado de forma fracionada via oral, as alterações no epitélio germinativo são mais intensas, sendo esta forma de administração escolhida para se testar os efeitos do fruto de *E. oleracea*. Camundongos Swiss receberam solução aquosa de CdCl₂ na concentração

de 4,28 mg/Kg por via oral durante 7 dias. Após este tratamento, os animais foram separados em grupos e tratados com óleo de *E. oleracea* nas doses de 50, 100 e 150 mg/Kg e com PDRA nas doses de 100, 200 e 300 mg/Kg por 42 dias. Parâmetros morfométricos tubulares e de Leydig foram recuperados após o tratamento com o óleo associado a aumento na concentração sérica de testosterona e da viabilidade celular. O tratamento com PDRA levou melhoria nestes parâmetros. O tratamento com o óleo preveniu a progressão dos danos na morfologia tubular causados pelo Cd, enquanto que a PDRA apenas de danos leves. A concentração de Mn e Zn testiculares, aumentaram nos animais tratados com o óleo, além da estimulação na atividade de SOD e CAT. A PDRA causou aumento na concentração de Zn e Mg na concentração de 300 mg/Kg. Cu reduziu em todos os tratamentos e Fe naqueles que receberam 100 mg/Kg de PDRA. O tratamento com PDRA aumentou a atividade de SOD e a concentração de 300 mg/Kg reduziu a peroxidação lipídica. Assim, concluiu-se que o tratamento com o óleo de *E. oleracea* apresentou atividade antioxidante curativa contra alterações testiculares induzidas pelo Cd, enquanto a PDRA, nas doses testadas, ameniza os danos testiculares causados pelo Cd, sendo considerada com potencial antioxidante.

ABSTRACT

MOURO, Viviane Gorete Silveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Antioxidant action of acai (*Euterpe oleracea* MART.) against oxidative stress induced by cadmium in the testis of adult mice.** Advisor: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-advisers: Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo and Marli do Carmo Cupertino.

Cadmium (Cd) is a heavy metal whose contamination in water and soil is well known. Cd interferes in the metabolism of several organs, particularly the testes, where it is able to breakdown the hematotesticular barrier, with apoptosis of germinative cells and loss of the epithelium. Alteration in Leydig cells and reduction in serum testosterone levels also reflect actions of Cd. The Cd can compete with essential minerals and thereby promote the unbalance of these elements in the testicle. In addition, oxidative stress is one of the metal's toxicity mechanisms. Thus, several studies have focused on the discovery of natural products with antioxidant action against Cd. The Amazonian palm (*Euterpe oleracea*) stands out among the plants with antioxidant potential. Its fruit is known for its antioxidant activity due to the presence of phenolic compounds, especially anthocyanins, and fatty acids present in the lipid fraction. Thus, in this work, the toxicity of Cd was compared by different routes and forms of administration, for the subsequent selection of the route in the evaluation of the effects of the oil and the defatted pulp rich in anthocyanins (DPRA) of *E. oleracea*. Swiss mice received CdCl₂ in the following ways: 1.5 mg/kg intraperitoneal (*i.p.*) route single dose; 30 mg/kg oral route single dose; and 4.28 mg/kg oral route for 7 days. On the eighth day the animals were euthanized. The Cd bioaccumulated in all routes, being greater in the fractional oral dose. Ca and Cu testicular concentrations reduced in all animals exposed to Cd, whereas Zn and Mn reduced only in the *i.p.* route. SOD activity reduced in both forms of oral administration, whereas CAT increased in *i.p.* route and glutathione increased in all intoxicated animals. Serum testosterone levels decreased in both forms of oral administration. Tubular damages were more intense in the animals that received the fractioned oral metal. Thus, when Cd is fractionally offered orally, changes in the germinal epithelium are more intense, and this form of administration was chosen to test the effects of *E. oleracea* fruit. Swiss mice received aqueous solution of CdCl₂ at a concentration of 4.28 mg/kg orally for 7 days. After this treatment, the animals were separated into groups and treated with *E. oleracea* oil at doses of 50, 100 and

150 mg/kg, and with DPRA at doses of 100, 200 and 300 mg/kg for 42 days. Tubular and Leydig morphometric parameters were recovery after the treatment with the oil associated with an increase in serum testosterone level and cell viability. Treatment with DPRA led to improvement in these parameters. The treatment with oil prevented the progression of damage in the tubular morphology caused by Cd, whereas DPRA prevented only slight damages. The concentration of testicular Mn and Zn increased in animals treated with oil, in addition to stimulation in SOD and CAT activity. DPRA promoted an increase in the concentration of Zn and Mg at 300 mg/kg dose. Cu reduced in all treatments and Fe in those who received 100 mg/kg of DPRA. Treatment with DPRA increased SOD activity and the concentration of 300 mg/kg reduced lipid peroxidation. Thus, the treatment with *E. oleracea* oil presented curative antioxidant activity against Cd-induced testicular alterations, while DPRA, at tested doses, attenuated the testicular damage caused by Cd, being considered with antioxidant potential.

1. Introdução

1.1.Cádmio

O cádmio (Cd) é considerado um metal pesado, apresenta número atômico 48 e peso atômico de 112,4, sendo encontrado em baixas concentrações na crosta terrestre (Varma, 1986; Mattiazzo- Prezotto, 1994). Ocupa a posição 67º entre os metais em abundância no meio ambiente e sua forma estável é na ionização na forma de Cd^{+2} (Mattiazzo- Prezotto, 1994). Na atmosfera, este metal é liberado na forma de óxido, cloreto ou sulfeto de cádmio, ambos resultantes da fabricação de baterias, pigmentos, além da fundição e refino de minerais (Martelli et al., 2006).

Atividades industriais e agrícolas têm resultado em aumento da contaminação de leitos de água por metais pesados, os quais podem apresentar capacidade de bioacumulação na cadeia aquática (Han et al., 2015). Devido à crescente exposição aos metais, o número de pesquisas voltadas para os efeitos nocivos destes na saúde humana têm sido cada dia maiores, visto que metais como cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) não apresentam função biológica conhecida, podendo bioacumular e levar a alterações em diversos órgãos (Stankovic et al., 2014).

O Cd é um metal não essencial cuja contaminação pode ocorrer por exposição ocupacional ou não ocupacional. A exposição ocupacional se dá na fabricação de tintas, plásticos, vidros, ligas de metais e mineração (Gao et al., 2014). Enquanto a não ocupacional se dá pela ingestão de água e alimentos contaminados por adubos ou bioacumulação em plantas e organismos aquáticos, além da inalação do Cd pelo cigarro ou ar poluído por incêndios florestais, áreas de mineração e indústrias de refino de metais (Satarug et al., 2010).

Nos solos de países como Itália, China e Japão são relatados alta contaminação pelo Cd. Assim, os cultivos nestas localidades estão relacionados a bioacumulação deste metal nas plantas, as quais são fontes de alimentação do ser humano. Portanto, a acumulação de Cd na cadeia alimentar representa uma ameaça à saúde (Jha e Bohra, 2016; Shi et al 2017).

Tendo em vista que este metal pode estar presente em alimentos contaminados, a concentração máxima permitida de Cd nestes varia de acordo com o tipo de alimento conforme a Resolução RDC N º 42, de 29 de agosto de 2013, que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de

Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Assim, para óleos o máximo permitido é 0,1 mg de Cd/Kg, cereais e frutas 0,3 mg/Kg, hortaliças 0,1-0,3 mg/Kg, carnes 0,5 mg/Kg, exceto fígado e rim que é 1 mg/Kg (Brasil, 2013). Na água potável o limite máximo de Cd aceitável é 0,001 mg/L (Brasil, 2005).

O cádmio não é bem absorvido pelo trato gastrointestinal, sendo somente 5% da dose administrada absorvida no duodeno (Leazer, 2002). Os enterócitos duodenais expressam a proteína transportadora de metal divalente (DMT-1), responsável pela absorção, por exemplo de ferro (Fe), zinco (Zn) e magnésio (Mg) e, em casos de dietas deficientes neste minerais, a absorção do cádmio pode ser aumentada (Hentze et al., 2004; Ryu et al., 2004). Assim, fatores nutricionais também podem contribuir para a absorção do cádmio por via oral. Após absorvido este metal é transportado para o fígado, ligado à albumina, e posteriormente distribuído para os demais órgãos através das metalotioneínas formando o complexo Cd-MT (Dalton et al., 2005). Este complexo alcança os rins, sua filtração ocorre pela membrana glomerular, sendo sua reabsorção no túbulo proximal, onde o complexo se quebra e o Cd é liberado. Assim, o Cd é eliminado pela urina, porém em pequena quantidade e de forma lenta (Arroyo et al., 2012). Seu tempo de meia vida, nos humanos é de 20 a 40 anos (Thévenod e Lee, 2013).

1.2.Toxicidade do Cádmio

Em humanos, a exposição ao Cd leva à doença conhecida como Itai-itai, relatada pela primeira vez no Japão após a Segunda Guerra Mundial, decorrente do consumo de arroz contaminado pela água do rio Jinzu usada na irrigação dos grãos (Nordberg, 2009). As pessoas acometidas apresentavam intensa dor e fraturas ósseas (Nordberg, 2009), além de osteomalácia generalizada, disfunção renal (Inaba et al., 2005) e redução na concentração sérica de cálcio (Ca) (Murata et al., 1970).

Nos parâmetros reprodutivos humanos, os efeitos do Cd estão associados a infertilidade. Nos Estados Unidos foi verificado aumento da presença de Cd no sangue e no plasma seminal de homens com problemas de fertilidade, com relação inversa aos parâmetros de motilidade, concentração e anormalidades espermáticas (Benoff et al., 2009). Segundo os autores, o acúmulo de Cd nos voluntários deste trabalho não apresentava relação com contaminação ocupacional e sim diretamente com o tabagismo.

Estudos em animais demonstram que diversos órgãos podem ser afetados pelo Cd, como rins, fígado e pulmão, porém os testículos são particularmente sensíveis à toxicidade desse metal (Blanco et al., 2007; Amamou et al., 2015). Em roedores, o Cd pode levar a atrofia dos túbulos seminíferos, degeneração do epitélio e apoptose de células germinativas, além de extensa fibrose no compartimento intertubular (Predes et al., 2010; Cupertino et al., 2017). Os danos causados por este metal em roedores se dão por alterações no microambiente tecidual testicular, induzindo fragilidade microestrutural (Cupertino et al., 2018). O rompimento da barreira hematotesticular é uma das formas do Cd promover alterações na função espermatogênica (Minutoli et al., 2015). Proteínas como ocludina e claudina-11, que participam da formação das junções de oclusão, e N-caderina, presente nas junções de adesão que compõem a barreira hematotesticular, apresentam redução nas suas expressões em casos de intoxicação pelo Cd (Minutoli et al., 2015; Squadrito et al., 2017). Acredita-se que danos na barreira hematotesticular causados por este metal estejam relacionados à sua capacidade de substituir o Ca em locais de ligação onde este mineral é necessário (Prozialeck e Lamar, 1999).

As células de Leydig também são alvo da toxicidade causada pelo Cd, com redução do número destas células devido à morte celular (Leite et al., 2011) e consequente redução na concentração sérica de testosterona, havendo aumento do colesterol total sérico e redução na expressão de receptores de andrógeno (Abdelrazek et al., 2016; Nna et al., 2017). Também é relatada redução nas concentrações de FSH e LH (Minutoli et al., 2015; Nna et al., 2017). Como consequência da alteração em parâmetros de Leydig e na testosterona, a redução na produção espermática diária é observada além de alteração na morfologia normal dos espermatozoides (Pires et al., 2013).

Uma das formas do Cd causar alterações testiculares se dá pelo aumento na expressão de caspase-3, proteína associada à apoptose, com consequente aumento de células apoptóticas (Abdelrazek et al., 2016). No entanto, em estudo recente, Wang et al. (2017) comprovaram que o Cd pode também levar à morte celular por autofagia. De acordo com os autores, este processo ocorre naturalmente na forma de defesa contra o metal, mas em casos de excesso de Cd a autofagia é aumentada podendo levar a danos teciduais. Aumento na expressão de LC3B-II testicular,

proteína expressa em casos de autofagia, associado ao aumento da concentração de Cd, também é relatado pelos autores.

A exposição ao Cd pode também levar à redução na concentração testicular de microminerais tais como magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), selênio (Se) e cobre (Cu), os quais são essenciais para o desenvolvimento normal e manutenção da espermatogênese (Cupertino et al., 2017). Como uma das formas de exposição ao Cd se dá pelo consumo de alimentos contaminados, quando ingerido o Cd é absorvido no duodeno através da proteína transportadora de metal divalente (DMT-1), responsável pela absorção de microminerais (Hentze et al., 2004; Ryu et al., 2004). Uma vez que estes minerais atuam como cofatores de enzimas antioxidantes, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerado pelo estresse oxidativo, pode ser decorrente da exposição ao Cd (Djuric et al., 2015).

Assim, esse metal pode inibir a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST) (Ognjanovi'c et al., 2010; Nna et al., 2017). Como a SOD citosólica (Cu/Zn-SOD) apresenta Cu e Zn no sítio ativo e a mitocondrial (Mn/Zn-SOD,) manganês (Mn) e Zn (Djuric et al., 2015), a suplementação com Zn reduz a concentração plasmática e testicular de Cd, aumenta a concentração sérica de testosterona e a atividade da SOD (Said et al., 2010). Dessa forma, a redução na concentração dos minerais essenciais pode levar a prejuízos na atividade de enzimas antioxidantes e, como consequência, à indução do estresse oxidativo causado pelo Cd.

1.3. Antioxidantes e reprodução masculina

Diversos estudos relatam a atividade de antioxidantes no testículo frente a intoxicação por diversas substâncias, inclusive o Cd. Assim, o pré-tratamento com *Paullinia cupana* (guaraná) em ratos Wistar apresentou ação antioxidante protetora contra o metal (Leite et al., 2011). Estes autores observaram atenuação das alterações morfológicas nas células de Leydig, bem como redução da resposta inflamatória quando os animais receberam 1,15 mg/Kg de cloreto de cádmio (CdCl₂).

No estudo de Predes et al. (2011), ratos que receberam tratamento com *Ginkgo biloba* após intoxicação com 3 µmol/Kg de CdCl₂ apresentaram recuperação na morfologia e na ultraestrutura das células de Leydig e de Sertoli, indicando atividade antioxidante do *Ginkgo biloba* frente a danos causados pelo Cd.

O extrato aquoso das folhas de *Ocimum basilicum* (manjerição) em ratos intoxicados com Cd causou aumento do diâmetro de túbulos seminíferos e altura de ep t lio, que estavam alterados pelo metal (Sakr e Nooh, 2013). Além disso, os autores observaram que o extrato causou redu o na expressão de Bax (proteína relacionada a apoptose) e aumento na expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) e Ki-67 (marcador de prolifera o celular) nas células germinativas, ambos alterados pelo Cd.

A atividade protetora do extrato metanólico da casca do caule de *Artocarpus altilis* (Fruta-pão), frente a altera es causadas pelo Cd   relatada por Adaramoye e Akanni (2016). O tratamento com o extrato reduziu o número de túbulos seminíferos com anormalidades, preveniu altera o na concentra o sérica de testosterona, LH, FSH e colesterol testicular, além de altera o na motilidade e concentra o espermática. Reduziu também a peroxida o lipídica e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes testiculares, parâmetros que são alterados pelo Cd (Adaramoye e Akanni, 2016).

A suspensão de grãos de pólen de palmeira *Phoenix dactylifera* ao ser administrada em ratos que foram intoxicados com 1 mg/Kg de CdCl₂ *i.p.* dose única, levou ao aumento na concentra o e motilidade espermáticas associado a redu o das anormalidades nos espermatozoides (El-Neweshy et al., 2013). Os autores também detectaram aumento na atividade de glutathione e redu o da peroxida o lipídica no testículo, aumento na concentra o sérica de testosterona e do  ndice espermato-gen ico, além de recupera o na arquitetura tecidual testicular e epididimária.

O tratamento com suco de uva após a intoxica o com 1,2 mg/Kg de CdCl₂ *i.p.* em ratos Wistar, levou a aumento na concentra o sérica de testosterona, na produ o diária espermática, redu o na anormalidade espermática e aumento na atividade de SOD (Pires et al., 2013). No estudo de Lamas et al. (2015), o suco de uva levou ao aumento no percentual de túbulos seminíferos, diâmetro tubular e concentra o sérica de testosterona em ratos que foram expostos ao Cd.

Os flavonoides kolaviron e quercetina, quando administrados em ratos juntamente com o CdCl₂, causaram aumento na concentra o sérica de LH, FSH e testosterona, além de reverter as altera es nas atividades de SOD, CAT e GST causadas pelo Cd (Farombi et al., 2012). Os autores também observaram que este

tratamento restaurou a concentração de malondialdeído (MDA) para níveis normais, preveniu a redução na motilidade espermática causada pelo Cd e reduziu as anormalidades espermáticas em valores próximos ao observado no controle. Já o flavonoide naringenina, de acordo com Sahin et al. (2017), quando administrado em animais submetidos ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), leva ao restabelecimento da atividade de GST, redução de MDA, aumento na concentração testicular de Ca e Zn e na concentração sérica de testosterona. Além de recuperação do peso testicular e índice gonadossomático (IGS) e melhoria dos danos causados pelo H₂O₂ na estrutura tecidual testicular (Sahin et al., 2017).

O ômega-3 e/ou quercetina levou ao reestabelecimento da arquitetura tecidual testicular normal, com redução da apoptose observada nas células germinativas e aumento nas atividades de SOD e CAT em ratos onde houve a ingestão de álcool (Uygun et al., 2014a). Em outro estudo, Uygun et al. (2014b) relatam que o pré-tratamento com ômega-3 protege o testículo dos danos causados pela doxorrubicina, droga antineoplásica, com redução na concentração de MDA, aumento na atividade de SOD e glutathione, além de recuperação da arquitetura tecidual testicular.

De acordo com Qi et al. (2017), o pré-tratamento com ômega-3, antes da torção testicular em ratos, levou à proteção do tecido. Os animais tratados apresentaram menores danos quando comparados aos animais que sofreram torção testicular e não receberam tratamento, além de redução na peroxidação lipídica, aumento na atividade da glutathione, SOD e CAT (Qi et al., 2017). Em homens jovens foi verificado que a ingestão de ômega-3 e -6 apresenta correlação positiva com a concentração sérica de testosterona e LH (Mínguez-Alarcón et al., 2017).

É conhecido que o ômega-3 e -6 são importantes componentes da membrana dos espermatozoides em mamíferos, contribuindo para a motilidade e para a reação acrossômica (Van Tran et al., 2017). O ácido linoleico (ômega- 6) é convertido em ácido araquidônico e este está associado à produção de prostaglandinas E2 e F2. Em touros, foi observado que E2 possui relação com a motilidade espermática e F2 está relacionada ao aumento da testosterona (Van Tran et al., 2017). Yan et al. (2013) observaram que ratos alimentados com dieta rica em ácidos graxos, prevalecendo ômega- 3 e -6, apresentaram aumento na concentração sérica de testosterona.

A administração de vitamina C ou E, após a intoxicação com Cd, reduziu a peroxidação lipídica, reduziu a atividade de SOD e CAT, aumentou a concentração

espermática e reduziu as anormalidades encontradas nos espermatozoides (Acharya et al., 2008). A proteção da vitamina E contra alteração na atividade de enzimas antioxidantes e redução na peroxidação lipídica, causados pelo Cd, também é relatada em outro estudo (Ognjanović et al., 2010).

Nascimento (2017) verificou que o extrato hidroalcoólico da polpa de *E. edulis* (Juçara), quando administrada em ratos Wistar intoxicados com Cd, não levou à recuperação dos danos testiculares causados pelo metal. Entretanto, não foram encontrados estudos em que se avalia o efeito de *E. oleracea* (Açaí da Amazônia) na espermatogênese frente a intoxicação induzida pelo Cd.

1.4. *Euterpe oleracea* MARTIUS

E. oleracea é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, encontrada na região Norte Brasileira (Yamaguchi et al., 2015), com ampla ocorrência no estado do Pará (Santos et al., 2014). A palmeira é multicauleada com troncos que alcançam altura de 3 a 20 metros (Yamaguchi et al. 2015). Seus frutos possuem grande aplicação comercial devido ao alto valor nutritivo e propriedades antioxidantes, sendo, por isso, considerado um “superfruto”, o consumo do açaí se dá ao longo de todo o Brasil, além de ser extremamente consumido em outros países como Estados Unidos, Japão, China e vários da Europa (Rufino et al., 2011; Yamaguchi et al., 2015).

O fruto do açaí é rico em compostos fenólicos com destaque para as antocianinas. O alto teor de antocianinas confere ao açaí propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Petruk et al., 2017), além de lhe proporcionar sua coloração roxa (Schauss et al., 2006). A antocianina cianidina, principalmente a cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo, são encontradas em maior quantidade nesta espécie, estando relacionadas ao seu potencial antioxidante (Carvalho et al., 2017; Petruk et al., 2017). Além das antocianinas, os demais compostos fenólicos encontrados são os ácidos vanílico, cafeico e siríngico (Pacheco-Palencia et al., 2008; Carvalho et al., 2017).

A fração polifenólica da polpa e do óleo refinado de *E. oleracea* apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* contra células de carcinoma de cólon HT-29 (Pacheco-Palencia et al., 2008). De acordo com Moura et al. (2011), o extrato hidroalcoólico dos frutos de açaí quando adicionado ao cigarro atua contra o

enfisema pulmonar em camundongos, induzido pela fumaça do cigarro. Os autores relatam que esta ação ocorre devido à redução da geração de EROS e de reações inflamatórias, evidenciando o potencial antioxidante das frações do fruto de *E. oleracea*.

Em humanos verificou-se que indivíduos saudáveis consumindo a polpa de *E. oleracea* por 20 dias não apresentaram alterações na glicemia, triacilgliceróis e colesterol total, enquanto reduziu a produção de EROs por neutrófilos (Pala et al., 2017). Em outro estudo, a atividade antioxidante de polimorfonucleares e de CAT aumentaram, com redução da produção de EROs após ingestão da polpa (Barbosa et al., 2016).

A presença de minerais nos frutos de *E. oleracea* também é relatada na literatura. Santos et al. (2014) encontram altas concentrações de Ca e Mg, além de Mn, Fe, Zn e Cu. De acordo com os autores, uma dieta rica nestes elementos essenciais, além dos benefícios nutricionais, proporciona proteção frente a tóxicos ambientais.

É conhecido que o fruto de açaí possui alto teor lipídico e é fonte de vitamina E (Souza et al., 2012). De acordo com Da Silva e Rogez (2013), o fruto apresenta cerca de 50% de óleo fixo. Este óleo é rico em ácidos graxos insaturados, sendo o monoinsturado oleico (ômega-9) encontrado em maior quantidade. Entretanto, pequena concentração de poli-insaturados representados pelo linoleico (ômega-6) e palmitoleico, além de ácidos saturados como o esteárico e o palmítico também são encontrados (Rufino et al., 2011; Souza et al., 2017).

Os ácidos graxos poli-insaturados conhecidos como ômega-3 e ômega-6 atuam na síntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa como o ácido araquidônico, o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosa-hexaenóico. Apresentam ainda papéis estruturais e funcionais essenciais na pele, cérebro, retina, supras-renais e testículos, além de serem precursores de compostos envolvidos na inflamação (Sijben e Calder, 2007), sendo os ácidos docosa-hexaenóico e o docosa-pentanói cocomponentes da membrana dos espermatozoides (Van Tran et al., 2017). Além disso, os ácidos graxos atuam na síntese de colesterol (Nelson e Cox, 2014), o que pode favorecer a síntese de testosterona.

De acordo com Souza et al. (2017), o consumo do óleo de *E. oleracea* por ratos Wistar atua na proteção contra acidentes cardiovasculares e aterosclerose em casos

de dislipidemia induzida por Triton-X. Essa ação se dá pela presença, em grande quantidade, dos ácidos oleico e linoleico no óleo. Ainda de acordo com os autores, o consumo do óleo, em condições normais, não causa aumento do colesterol total, enquanto que na dislipidemia, o tratamento reduz a concentração de colesterol e de triacilglicerois. Além disso, em outro estudo foi observado que o óleo de *E. oleracea* apresenta ausência de genotoxicidade em células testiculares de ratos (Marques et al., 2016) e em linfócitos humanos (Marques et al., 2017).

Em ratos tratados com extrato hidroalcoólico das sementes dos frutos de açaí apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória (Cordeiro et al., 2017) e anti-hipertensiva (Costa et al., 2017).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Comparar a toxicidade do cádmio por diferentes vias de administração, além de avaliar os efeitos do óleo e da polpa desengordurada rica em fenóis de *Euterpe oleracea* no testículo de camundongos adultos saudáveis e expostos ao cádmio.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar, de forma comparativa, os efeitos tóxicos do cádmio sob as vias de administração intraperitoneal dose única, oral dose única e oral fracionada sobre a histomorfometria testicular, morte de células testiculares, concentração sérica de testosterona, bioacúmulo de cádmio e concentração de minerais testiculares além da atividade de enzimas testiculares antioxidantes de camundongos machos adultos (Artigo 1).
- Avaliar os efeitos de diferentes doses (50 mg/kg, 100 mg/kg e 150 mg/kg) do óleo de *E. oleracea* na histomorfometria testicular, morte de células testiculares, concentração sérica de testosterona, bioacúmulo de cádmio e concentração de minerais testiculares, além da atividade de enzimas testiculares antioxidantes de camundongos machos adultos expostos previamente ao cádmio (Artigo 2).
- Avaliar os efeitos de diferentes doses (100 mg/kg, 200 mg/kg e 300 mg/kg) da polpa desengordurada de *E. oleracea* na histomorfometria testicular, morte de células testiculares, concentração sérica de testosterona, bioacúmulo de cádmio e concentração de minerais testiculares, além da atividade de enzimas testiculares antioxidantes de camundongos machos adultos expostos previamente ao cádmio (Artigo 3).

3. Referências

Abdelrazek, H. M. A.; Helmy, S. A.; Elsayed, D. H.; Ebaid, H. M.; Mohamed, R. M. Ameliorating effects of green tea extract on cadmium induced reproductive injury in male Wistar rats with respect to androgen receptors and caspase- 3. **Reproductive Biology**, 16, 300–308, 2016.

Acharya, U. R.; Mishra, M.; Patro, J.; Panda, M. K. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. **Reproductive Toxicology**, 25, 84–88, 2008.

Adaramoye, O. A.; Akanni, O. O. Protective effects of *Artocarpus altilis* (Moraceae) on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. **Andrologia**, 48(2), 152–163, 2016.

Amamou, F.; Nemmiche, S.; Meziane, R. K.; Didi, A.; Yazit, S. M.; Chabane-Sari, D. Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium- induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, 78, 177–184, 2015.

Barbosa, P. O.; Pala, D.; Silva, C. T.; Souza, M. O.; Amaral, J. F.; Vieira, R. A. L.; Folly, G. A. F.; Volp, A. C. P.; Freitas, R. N. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, 32, 674–680, 2016.

Benoff, S.; Hauser, R.; Marmar, J. L.; Hurley, I. L.; Napolitano, B.; Centola, G. M. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlation with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial inseminations donors, and unselect volunteers). **Molecular Medicine**, 15(7-8), 248-262, 2009.

Blanco, A.; Moyano, R.; Vivo, J.; Flores-Acuña, R.; Molina, A.; Blanco, C.; Agüera, E.; Monterde, J. G. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 23, 96–101, 2007.

Brasil. 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução - RDC N° 357.

Brasil. 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Resolução - RDC N° 42.

Carvalho, A. V.; Silveira, T. F. F.; Mattietto, R. A.; Oliveira, M. S. P.; Godoy, H. T. Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97, 1467–1474, 2017.

Cordeiro, V. S. C.; Bem, G. F.; Costa, C. A.; Santos, I. B.; · Carvalho, L. C. R. M.; Ognibene, D. T.; Rocha, A. P. M.; Carvalho, J. J.; Moura, R. S.; Resende, A. C. *Euterpe oleracea* Mart. seed extract protects against renal injury in diabetic and spontaneously hypertensive rats: role of inflammation and oxidative stress. **European Journal of Nutrition**, 1-16, 2017. DOI: 10.1007/s00394-016-1371-1

Costa, C. A.; Ognibene, D. T.; Cordeiro, V. S. C.; Bem, G. F.; Santos, I. B.; Soares, R. A.; Cunha, L. L. M.; Carvalho, L. C. R. M.; Moura, R. S.; Resende, A. C. Effect of *Euterpe oleracea* Mart. Seeds Extract on Chronic Ischemic Renal Injury in Renovascular Hypertensive Rats. **Journal of Medicinal Food**, 20(10), 1002-1010, 2017.

Cupertino, M. C.; Novaes, R. D.; Santos, E. C.; Bastos, D. S. S.; Santos, D. C. M.; Fialho, M. C, Q.; Matta, S. L. P. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. **Life Sciences**, 15, 23–30, 2017.

Cupertino, M. C.; Novaes, R. D.; Santos, E. C.; Neves, A. C.; Silva, E.; Oliveira, J. A.; Matta, S. L. P. Differential susceptibility of germ and Leydig cells to cadmium-mediated toxicity: Impact on testis structure, adiponectin levels and steroidogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

Dalton, T. P.; He, L.; Wang, B.; Miller, M. L.; Jin, L.; Stringer, K. F.; Chang, X.; Baxter, C. S.; Nebert, D. W. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102(9), 3401–3406, 2005.

Da Silva, J. J. M.; Rogez, H. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açai (*Euterpe oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos. **Química Nova**, 36, 400–406, 2013.

Djuric, A.; Begic, A; Gobeljic, B.; Stanojevic, I.; Ninkovic, M.; Vojvodic, D.; Pantelic A.; Zebic, G.; Prokic, V.; Gejanovic, B.; Stojanovic, I.; Pavlica, M.; Djukic, D.; Saso, L.; Djurdjevic, D.; Pavlovic, M.; Topic, A.; Vujanovic, D.; Stevnovic, I;

Djukic, M. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. **Food and Chemical Toxicology**, 86, 25–33, 2015.

El-Neweshy, M. S.; El-Maddawy, Z. K.; El-Sayed, Y. S. Therapeutic effects of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pollen extract on cadmium-induced testicular toxicity. **Andrologia**, 45, 369–378, 2013.

Farombi, E. O.; Adedara, I. A.; Akinrinde, S. A.; Ojo, O. O.; Eboh, A. S. Protective effects of kolaviron and quercetin on cadmium-induced testicular damage and endocrine pathology in rats. **Andrologia**, 44(4), 273-84, 2012.

Gao, P.; Liu, S.; Ye, W.; Lin, N.; Meng, P.; Feng, Y.; Zhang, Z.; Cui, F.; Lu, B.; Xing, B. Assessment on the occupational exposure of urban public bus drivers to bioaccessible trace metals through resuspended fraction of settled bus dust. **Science of The Total Environment**, 508C, 37–45, 2014.

Han, Y. L.; Sheng, Z.; Liu, G.; Long, L.; Wang, Y.; Yang, W.; Zhu, J. Cloning, characterization and cadmium inducibility of metallothionein in the testes of the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 119, 2015.

Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Andrews, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, 117, 285–297, 2004.

Inaba T, Kobayashi E, Suwazono Y, Uetani M, Oishi M, Nakagawa H, Nogawa K. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. **Toxicological Letters**, 159(2), 192–201, 2005.

Jha, U. C.; Bohra, A. Genomics enabled breeding approaches for improving cadmium stress tolerance in plants. **Euphytica**, 208(1), 1–31, 2016.

Lamas, C. A.; Gollücke, A. P. B.; Dolder, H. Grape juice concentrate (G8000®) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. **International Journal of Experimental Pathology**, 96(5), 301–310, 2015.

Leazer, T. Cadmium absorption and its relationship to divalent metal transporter-1 in the pregnant rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 185(1), 18–24, 2002.

Leite, R. P.; Wada, R. S.; Monteiro, J. C.; Predes, F. S.; Dolder, H. Protective effect of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced

damages in adult Wistar testis. **Biological Trace Element Research**, 141(1–3), 262–274, 2011.

Marques, E. S.; Froder, J. G.; Carvalho, J. C. T.; Rosa, P. C. P.; Perazzo, F. F.; Maistro, E. L. Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae) fruit oil (açaí), in mammalian cells in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, 93, 13–19, 2016.

Marques, E. S.; Tsuboy, M. S. F.; Carvalho, J. C. T.; Rosa, P. C. P.; Perazzo, F. F.; Gaivão, I. O. M.; Maistro, E. L. First cytotoxic, genotoxic, and antigen toxic assessment of *Euterpe oleracea* fruit oil (açaí) in cultured human cells. **Genetics and Molecular Research**, 16(3), 1–11, 2017.

Martelli, A.; Rousselet, E.; Dycke, C.; Bouron, A.; Moulis, J-M. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**, 88, 1807–1814, 2006.

Mattiazzo-Prezotto, M.M. Comportamento de cobre, cádmio, crômio, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH. Piracicaba. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 1194.

Mínguez-Alarcón, L.; Chavarro, J. E.; Mendiola, J.; Roca, M.; Tanrikut, C.; Vioque, J.; Jørgensen, N.; Torres-Cantero, A. M. Fatty acid intake in relation to reproductive hormones and testicular volume among young healthy men. **Asian Journal of Andrology**, 19, 184–190, 2017.

Minutoli, L.; Micali, A.; Pisani, A.; Puzzolo, D.; Bitto, A.; Rinaldi, M.; Pizzino, G.; Irrera, N.; Galfo, F.; Arena, S.; Pallio, G.; Mecchio, A.; Germana, A.; Bruschetta, D.; Laura, R.; Magno, C.; Marini, H.; Squadrito, F.; Altavilla, D. Flavocoxid Protects Against Cadmium-Induced Disruption of the Blood-Testis Barrier and Improves Testicular Damage and Germ Cell Impairment in Mice. **Toxicological Sciences**, 148(1), 311–329, 2015.

Moura, R. S.; Pires, K. M. P.; Ferreira, T. S.; Lopes, A. A.; Nesi, R. T.; Resende, A. C.; Sousa, P. J.; Silva, A. J.; Porto, L. C.; Valenca, S. S. Addition of açaí (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food and Chemical Toxicology**, 49, 855–863, 2011.

Murata, I.; Hirono, T.; Saeki, Y., Nakagawa, S. Cadmium enteropathy, renal osteomalacia (itai-itai disease in Japan). **Bulletin De La Societe Internationale De Chirurgie**, 1, 34–41, 1970.

Nascimento, L. S. Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) sobre a morfologia testicular de ratos adultos saudáveis e expostos ao cádmio. Tese (Doutorado)- Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2017.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6 st. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1220 pp.

Nna, V. U.; Ujah, G. A.; Mohamed, M.; Etim, K. B.; Igba, B. O.; Augustine, E. R.; Osim, E. E. Cadmium chloride–induced testicular toxicity in male Wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 94: 109–123, 2017.

Nordberg, G. F. Historical perspectives on cadmium toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 238, 192–200, 2009.

Ognjanović, B. I.; Marković, S. D.; Dorđević, N. Z.; Trbojević, I. S.; Stajin, A. S.; Sačić, Z. S. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. **Reproductive Toxicology**, 29(2), 191–197, 2010.

Pacheco-Palencia, L. A.; Mertens-Talcott, S.; Talcott, S. T. Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Thermal Stability of a Phytochemical Enriched Oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 4631–4636, 2008.

Pala, D.; Barbosa, P. O.; Silva, C. T.; Souza, M. O.; Freitas, F. R.; Volp, A. C. P.; Maranhão, R. C.; Freitas, R. N. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, polipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. **Clinical Nutrition**, 1-6, 2017.

Petruk, G.; Illiano, A.; Giudice, R. D.; Raiola, A.; Amoresano, A.; Rigano, M. M.; Piccoli, R.; Monti, D. M. Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized

fibroblasts. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 172, 42–51, 2017.

Pires, V. C.; Gollucke, A. P. B.; Ribeiro, D. A.; Lungato, L.; D'Almeida, V.; Aguiar Jr, O. Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: a chronic assay. **British Journal of Nutrition**, 110, 2020–2029, 2013.

Predes, F. S.; Diamante, M. A. S.; Dolder, H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **International Journal of Experimental Pathology**, 91(2), 125–131, 2010.

Predes, F. S.; Monteiro, J. C.; Matta, S. L. P.; Garcia, M. C.; Dolder, H. Testicular Histomorphometry and Ultrastructure of Rats Treated with Cadmium and *Ginkgo biloba*. **Biological Trace Element Research**, 140, 330–341, 2011.

Prozialeck, W. C.; Lamar, P. C. Interaction of Cd (Cd) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. **Biochimica et BiophysicaActa**, 1451, 93-100, 1999.

Qi, X.; Qin, Z.; Tang, J.; Han, P.; Xing, Q.; Wang, K.; Yu, J.; Zhou, G.; Tang, M.; Wang, W.; Zhang, W. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorates testicular ischemia-reperfusion injury through the induction of Nrf2 and inhibition of NF-κB in rats. **Experimental and Molecular Pathology**. 103(1), 44-50, 2017.

Rufino, M. S. M.; Pérez-Jiménez, J.;Arranz, S.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Oliveira, M. S. P.; Saura-Calixto, F. Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRSPará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, 44(7), 2100-2106, 2011.

Ryu, D. Y.; Lee, S. J.; Park, D. W.; Choi, B. S.; Klaassen, C. D.; Park, J. D. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats, **Toxicology Letters**, 152, 19–25, 2004.

Sahin, Z.; Ozkaya, A.; Cuce, G.; Uckun, M.; Yologlu, E. Investigation of the effect of naringenin on oxidative stress-related alterations in testis of hydrogen peroxide-administered rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 31(9), 2017.

Saïd, L.; Banni, M.; Kerkeni, A.; Saïd, K.; Messaoudi, I. Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 2759–2765, 2010.

Sakr, S. A.; Nooh, H. Z. Effect of *Ocimum basilicum* extract on cadmium-induced testicular histomorphometric and immunohistochemical alterations in albino rats. **Anatomy and Cell Biology**, 46(2), 122-130, 2013.

Santos, V. S.; Teixeira, G. H. A.; Barbosa, F. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.): a tropical fruit with high levels of essential minerals-especially manganese-and its contribution as a source of natural mineral supplementation. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, 77(1-3), 80-89, 2014.

Satarug, S.; Garrett, S. H.; Sens, M. A.; Sens, D. A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Environmental Health Perspectives**, 118, 182–190, 2010.

Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Huang, D.; Owens J, Agarwal, A.; Jensen, G. S.; Hart, A. N.; Shanbrom, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(22), 8604–8610, 2006.

Shi, Z.; Taylor, A. W.; Riley, M.; Byles, J.; Liu, J.; Noakes, M. Association between dietary patterns, cadmium intake and chronic kidney disease among adults. **Clinical Nutrition**, 37(1), 276-284, 2018.

Sijben, J. W. C.; Calder, P. C. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. **The Proceedings of the Nutrition Society**, 2(66), 237-259, 2007.

Squadrito, F.; Micali, A.; Rinaldi, M.; Irrera, N.; Marini, H.; Puzzolo, D.; Pisani, A.; Lorenzini, C.; Valenti, A.; Laurà, R.; Germanà, A.; Bitto, A.; Pizzino, G.; Pallio, G.; Altavilla, D.; Minutoli, L. Polydeoxyribonucleotide, an Adenosine-A2A Receptor Agonist, Preserves Blood Testis Barrier from Cadmium-Induced Injury. **Frontiers in Pharmacology**, 7, 2017.

Stankovic, S.; Kalaba, P.; Stankovic, A. R. Biota as toxic metal indicators. **Environmental Chemistry Letters**, 12(1), 63–84, 2014.

Souza, M. O.; Silva, L. S.; Magalhães, C. L. B.; Figueiredo, B. B.; Costa, D. C.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L. The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition Research**, 32(12), 976–984, 2012.

Souza, B. F. F.; Carvalho, H. O.; Ferreira, I. M.; Cunha, E. L.; Barros, A. S.; Taglialegna, T.; Carvalho, J. C. T. Effect of the treatment with *Euterpe oleracea* Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 90, 542–547, 2017.

Thévenod, F.; Lee, W. K. Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. **Metal Ions in Life Sciences**, 11, 415–490, 2013.

Uygur, R.; Yagmurca, M.; Alkoc, O. A.; Genc, A.; Songur, A.; Ucok, K.; Ozen, O. A. Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. **Andrologia**, 46, 356–369, 2014a.

Uygur, R.; Aktas, C.; Tulubas, F.; Uygur, E.; Kanter, M.; Erbogga, M.; Caglar, V.; Topcu, B.; Ozen, O. A. Protective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced testicular apoptosis and oxidative damage in rats. **Andrologia**, 46, 917–926, 2014b.

Van Tran, L.; Malla, B. A.; Kumar, S.; Tyagi, A. K. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction — A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 30(5), 622-637, 2017.

Varma, A. Handbook of atomic absorption analysis. CRC Press, Boca Ranton, 464p. 1986.

Wang, Y-J.; Yan, J.; Yin, F.; Li, L.; Qin, Y-G.; Meng, C-Y.; Lu, R-F.; Guo, L. Role of autophagy in cadmium-induced testicular injury. **Human and Experimental Toxicology**, 36(10), 1039-1048, 2017.

Yamaguchi, K. K. L.; Pereira, L. F. R.; Lamarão, C. V.; Lima, E. S.; Veiga-Junior, V. F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, 179, 137–151, 2015.

Yan, L.; Bai, X-L.; Fang, Z-F.; Che, L-Q.; Xu, S-Y.; Wu, D. Effect of different dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in male rats. **Lipids in Health and Disease**, 12, 33, 2013.

Artigo 1

Toxicidade testicular de camundongos adultos à exposição aguda ao cádmio administrado via intraperitoneal e via oral

Resumo

Os efeitos tóxicos do cádmio (Cd) em parâmetros reprodutivos são largamente descritos na literatura. Grande parte dos modelos experimentais faz uso da via intraperitoneal (*i.p.*), embora a intoxicação humana ocorra preferencialmente pela via oral podendo ser de forma contínua. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência das vias de administração do Cd na estrutura testicular. Assim, este estudo teve como objetivo comparar a exposição ao Cd pelas vias *i.p.* e oral doses única e oral fracionada, utilizando doses equivalentes. Camundongos Swiss receberam 1,5 mg/Kg *i.p.* e 30 mg/Kg via oral de cloreto de cádmio (CdCl₂) dose única e 4,28 mg/Kg de CdCl₂ via oral fracionada por sete dias consecutivos. O bioacúmulo de Cd foi observado em todas as vias, sendo maior na via oral fracionada. As concentrações de Ca e Cu testicular reduziram em todos os animais expostos ao Cd, enquanto que zinco (Zn) e manganês (Mn) reduziram apenas na via *i.p.*. A atividade de superóxido dismutase (SOD) reduziu em ambas as formas de administração via oral, catalase (CAT) aumentou na via *i.p.* e glutathione S-transferase (GST) aumentou em todos os animais intoxicados. A concentração sérica de testosterona reduziu em ambas as administrações via oral. Danos tubulares, tais como vacuolizações no epitélio germinativo, desprendimento de células germinativas e degeneração do túbulo seminífero foram observados na administração *i.p.* e oral do Cd, sendo mais intensos naqueles que receberam o metal via oral fracionada. Assim, quando o Cd é ofertado via oral de forma fracionada, as alterações no epitélio germinativo são mais intensas.

Palavras-chave: Metal pesado, Histomorfometria, Reprodução, Toxicidade

Introdução

O Cádmio (Cd) é um metal não essencial cuja contaminação pode ocorrer via exposição ocupacional e não ocupacional. A exposição ocupacional está associada à fabricação de tintas, plásticos, vidros, ligas de metais e atividades de mineração (Gao et al., 2014). Enquanto a exposição não ocupacional se dá pela ingestão de alimentos e água contaminados por adubos ou a bioacumulação em plantas e organismos aquáticos. A inalação do Cd também é uma forma de exposição a este metal e é promovida pelo cigarro ou ar poluído por incêndios florestais, áreas de mineração e indústrias de refino de metais (Satarug et al., 2010).

Sabe-se que este metal pode afetar diversos órgãos como fígado, pulmão e rins, sendo os testículos particularmente sensíveis à sua toxicidade (Predes et al., 2010; Jung et al., 2015). Alterações testiculares causadas pela exposição ao Cd incluem danos às células germinativas, células de Sertoli, além de degeneração e necrose testicular (Predes et al., 2010; Cupertino et al., 2017), devido à sua capacidade de romper a barreira hematotesticular (Minutoli et al., 2015; Squadrito et al., 2017).

Quando ingerido o Cd é absorvido no duodeno através da proteína transportadora de metal divalente (DMT-1), responsável pela absorção de microminerais. Dessa forma, o Cd compete com os minerais essenciais pelo transportador e altera a absorção dos mesmos (Hentze et al., 2004; Ryu et al., 2004). Assim, a exposição ao Cd pode levar à redução na concentração testicular de microminerais essenciais para o desenvolvimento normal e manutenção da espermatogênese como magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), selênio (Se) e cobre (Cu) (Cupertino et al., 2017). Como estes elementos apresentam importante função na prevenção do estresse oxidativo (Djuric et al., 2015), a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) também é uma das vias de toxicidade do Cd.

Em estudo anterior observamos que quando a menor dose de Cd capaz de levar a danos testiculares (1,2 mg/Kg, segundo Predes et al., 2010) é administrada intraperitonealmente (*i.p.*) e sua dose correspondente via oral, ambos em dose única e os animais avaliados após 42 dias da exposição ao metal, as alterações testiculares são semelhantes, sendo mais intensas na via oral. Por outro lado, na avaliação após 7 dias da exposição não foram observadas alterações na histomorfometria testicular (dados não publicados). Para o fígado, quando o Cd é ofertado *i.p.* (1,5 mg/Kg) e na sua dose correspondente via oral, ambos em dose única, a intoxicação hepática aguda é severa na via *i.p.* (Matovic, et al., 2012). No entanto, não se sabe se a exposição ao metal em dose única ou fracionada, por via oral ou *i.p.* equivalente, apresenta a mesma intensidade em termos de danos testiculares. Dessa forma, a influência da via de exposição do Cd em parâmetros reprodutivos ainda não está bem compreendida, principalmente em se tratando de efeitos agudos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar se a exposição ao Cd, pelas vias de administração oral e *i.p.* dose única e via oral fracionada, podem levar às mesmas alterações em parâmetros reprodutivos masculinos em camundongos machos adultos.

Material e Métodos

Animais

Vinte camundongos Swiss machos adultos, com 56 dias de idade, foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, e mantidos sob controle de luminosidade (12h claro/ 12h escuro) e temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 1$). Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), protocolo 058/2016.

Grupos experimentais e coleta do material biológico

Após 30 dias de adaptação os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais ($n = 5$ animais/grupo), sendo um grupo controle e três expostos ao Cd. O grupo controle recebeu água destilada por gavagem e os demais receberam cloreto de cádmio (CdCl_2 / Sigma, St Louis, MO, USA) nas seguintes concentrações: 1,5 mg/Kg (0,92 mg Cd/Kg) intraperitoneal (*i.p.*) dose única; 30mg/kg (18,33 mg Cd/kg) via oral por gavagem dose única; e 4,28 mg/Kg/dia (2,62 mg Cd/Kg/dia) por gavagem durante 7 dias consecutivos. Assim, após uma semana, ambos os grupos expostos ao Cd via oral receberam no total 30 mg/Kg de CdCl_2 . A dose de 1,5 mg/Kg foi escolhida com base em estudos anteriores (Matovic, et al., 2012). Como apenas 5% do cádmio ingerido por via oral é absorvido (Leazer, 2002), a dose de 30 mg/Kg via oral corresponde a 1,5 mg/Kg *i.p.*. Além disso, a dose de 4,28 mg/Kg equivale, ao final dos 7 dias de tratamento, à dose de 30 mg/Kg, porém administrada de forma fracionada.

No oitavo dia os animais foram eutanasiados. O período de 7 dias foi escolhido para observar possíveis alterações causadas por efeito agudo, antes que um possível processo de recuperação pudesse alterar o grau de dano ocasionado pelo Cd (Predes et al., 2010). Os animais foram sedados e anestesiados com tiopental 30 mg/Kg *i.p.*, e eutanasiados por aprofundamento de anestesia. Os testículos foram removidos, dissecados e pesados, sendo o testículo esquerdo fixado em Karnovsky e destinado para avaliação histológica, enquanto o direito foi congelado em freezer -80°C para análises bioquímicas.

Determinação do bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais

Amostras do testículo esquerdo foram pesadas em balança analítica digital (precisão 0.0001g – BEL Mark 210A) e, posteriormente, secas em estufa a 70°C até atingirem peso seco constante. As amostras secas foram colocadas em Erlenmeyers de 25 mL juntamente com 1,5 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado e 0,5 mL de ácido perclórico (HClO₄) (70%) e transferidas para chapa aquecedora. A temperatura foi aumentada gradualmente, até 90°C, de modo que a digestão do material fosse completa. A seguir, as amostras foram diluídas em água desionizada e filtradas em papel de filtro. A determinação das concentrações de cádmio (Cd), zinco (Zn), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu) e ferro (Fe), foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

Avaliação do estresse oxidativo

O testículo direito foi congelado em freezer -80 °C e posteriormente homogeneizado com tampão fosfato (pH 7,4, 0,2 M com EDTA 1M), na proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de tampão, em homogeneizador de tecido portátil (YO-04727-09; LabGEN) e centrifugado a 3000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises, que foram realizadas em duplicata. A concentração de proteína total no tecido testicular foi determinada usando o método de Lowry et al. (1951).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi estimada pelo método do pirogalol, com base na capacidade desta enzima para catalisar a reação do radical superóxido (O⁻²) em peróxido de hidrogênio, monitorada a 570 nm, em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X) (Sarban et al., 2005). A atividade da catalase (CAT) foi avaliada de acordo com o método descrito por Dieterich et al. (2000), medindo a cinética da decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 60s, em espectrofotômetro a 240 nm. Para a análise de malondialdeído (MDA), o homogenato reagiu com solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e HCl 0,25 N), durante 40 minutos, em banho-maria a 90°C. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535 nm, em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X), (Buege e Aust, 1978). Os resultados foram expressos por mg de proteína.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida por leitura em espectrofotômetro a 340 nm (Habig et al., 1974) e calculada a partir da taxa de formação do conjugado 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB).

A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito no sobrenadante do homogenato do testículo, pela reação de Griess padrão. Incubou-se 50 µL de sobrenadante do homogenato testicular com um volume igual de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de hidrocloreto de naftilenodiamina e 2,5% de H₃PO₄) à temperatura ambiente durante 10 min. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X). A concentração de nitrito foi calculada com referência à curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) (Ricart-Jané et al., 2002).

Processamento histológico

O testículo esquerdo foi imerso em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e transferido para etanol 70%. Posteriormente, fragmentos testiculares foram desidratados em solução crescente de etanol e incluídos em metacrilato (Historesin®, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de 3µm foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), respeitando-se o intervalo de, no mínimo, 40 µm entre os cortes. As preparações histológicas foram coradas com azul de toluidina + borato de sódio (1%). Imagens do parênquima testicular foram obtidas em fotomicroscópio (Olympus BX -53, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão). Nas avaliações morfométricas, todas as imagens foram analisadas utilizando o programa Image J®.

Histopatologia testicular

Para a avaliação histopatológica do testículo foram contados 200 túbulos por animal e classificados em túbulos normais e patológicos, sendo os patológicos divididos em patologias leves (vacuolização e desprendimento do epitélio germinativo) e patologias graves (ausência de células germinativas e/ou células de Sertoli), adaptado do índice de Johnsen (1970). Sendo os resultados expressos em percentuais.

Viabilidade celular

Secções histológicas testiculares foram coradas com laranja de acridina e iodeto de propídio para avaliação de alterações morfológicas celulares (Giri e Roy, 2016). Laranja de Acridina (LA, verde) é um corante vital que marca tanto células viáveis quanto células mortas (ou apoptóticas), enquanto o iodeto de propídio (IP, vermelho) marca apenas células que perderam a integridade da membrana. A classificação celular, portanto, é baseada em condensação nuclear e fragmentação, bem como a integridade da membrana (Giri e Roy, 2016).

As células viáveis apresentam núcleo verde com estrutura intacta, enquanto que as células apoptóticas exibem denso núcleo amarelo/laranja/vermelho devido à condensação de cromatina e o grau de perda de integridade da membrana, caracterizado pela co-coloração do LA com IP (sendo consideradas como células iodeto de propídio positivas (+)) (Lowry et al., 1951). As imagens digitais foram capturadas em fotomicroscópio EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canadá) e analisadas com o software de análise de imagens Image-Pro Plus[®] 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) de acordo com Oberholzer et al. (1956). Para isso, foi utilizada uma área total de $30 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ para calcular o percentual de células germinativas apoptóticas nos túbulos seminíferos por grupo.

Histomorfometria testicular

O índice gonadossomático (IGS) foi calculado utilizando-se seguinte fórmula: $\text{IGS} = \text{PG}/\text{PC} \times 100$ sendo PG = peso gonadal e PC = peso corporal (Amann, 1970). O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se o peso da albugínea do peso total dos testículos. O índice parenquimossomático (IPS) foi determinado pela fórmula: $\text{IPS} = \text{PP}/\text{PC} \times 100$ (PP = peso do parênquima testicular e PC = Peso corporal).

Morfometria tubular. As proporções volumétricas destes foram obtidas por contagem de 2.660 pontos projetados em 10 imagens capturadas das lamínas histológicas, com ampliação de 100X. Foram contados pontos coincidentes sobre a túnica própria, epitélio seminífero e lúmen (compartimento tubular) e pontos no compartimento intertubular. A determinação do percentual de cada componente se deu pela seguinte fórmula: proporção volumétrica (%) = (número de pontos no túbulo ou intertúbulo / 2.660 pontos no total) x 100. O volume (mL) de cada componente testicular foi

estimado a partir da fórmula: % túbulo/intertúbulo (ou seus constituintes) / 100 x volume total do parênquima testicular (Melo et al., 2010). Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Johnson et al., 1981), considerou-se a massa do testículo igual ao seu volume. O índice tubulossomático (ITS) foi calculado a partir da fórmula $ITS (\%) = VT/PC \times 100$ (VT = Volume de túbulo seminífero e PC = Peso corporal) (Amann, 1970). O índice epiteliossomático (IES) foi obtido pela seguinte fórmula: $IES = VE/PC \times 100$ (VE = Volume de epitélio seminífero e PC = Peso corporal).

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir da mensuração de 20 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Uma vez que o diâmetro tubular permanece constante em camundongos machos adultos, em todo o ciclo do epitélio seminífero, não é necessário considerar a fase do epitélio dentro do ciclo (França e Russell, 1998). Estas secções também foram usadas para medir a altura do epitélio seminífero, a partir da túnica própria para o lúmen tubular, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal. Para determinar o diâmetro do lúmen subtraiu-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero (Mouro et al., 2017).

A área de túbulo seminífero foi calculada pela seguinte fórmula: $ArTS = \pi \cdot (RT)^2$, em que $ArTS$ = área de túbulo seminífero, RT = raio tubular, enquanto que a área de lúmen calculada pela fórmula: $ArL = \pi \cdot (RL)^2$, onde ArL = área de lúmen, RL = raio luminal. A área de epitélio foi obtida subtraindo-se da área do túbulo seminífero a área do lúmen. Os resultados de área foram expressos em milímetro quadrado (mm^2). A relação túbulo epitélio foi determinada dividindo-se a área tubular pela área de epitélio.

O comprimento total (metros) dos túbulos seminíferos nos dois testículos (CT/T), foi estimado a partir do conhecimento prévio do volume ocupado por estas estruturas dentro do parênquima, bem como a partir do diâmetro tubular médio: $VTS/\pi r^2$ (VTS = volume do túbulo seminífero; πr^2 = área do túbulo seminífero; r = diâmetro/2) (Attal e Courot, 1963). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o comprimento total pelo peso bruto dos testículos.

Morfometria intertubular. A proporção volumétrica dos componentes intertubulares foi obtida pela contagem de 1.000 pontos, por animal, projetados em imagens do compartimento intertubular dos testículos. Pontos coincidentes sobre os componentes intertubulares foram registados para núcleo e citoplasma da célula de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo. Para calcular as proporções utilizou-se a fórmula: proporção volumétrica de cada componente intertubular (%) = número de pontos do componente intertubular x 100/1000 pontos totais. Para calcular o volume (mL) de cada componente intertubular aplicou-se a seguinte fórmula: proporção do elemento nos testículos x peso parênquima dos dois testículos/100.

O diâmetro médio do núcleo da célula de Leydig foi obtido a partir de imagens capturadas com ampliação de 400x, sendo medidos 30 núcleos por animal, escolhendo-se aqueles mais esféricos, com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear ($VN = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio nuclear) e citoplasmático ($VC = \% \text{ citoplasma} \times VN/\% \text{ núcleo}$) e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig, somando-se VN e VC, sendo os valores expressos em μm^3 .

O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam nos testículos foi realizado a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular x peso do parênquima dos dois testículos/100. O volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo foi obtido utilizando-se o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig nos testículos foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam nos testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3). Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo foi utilizada a fórmula: volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3). O índice Leydigossomático (ILS) foi calculado pela fórmula: $ILS = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular}/PC \times 100$, onde PC= peso corporal (Mouro et al., 2017).

Determinação da concentração sérica de testosterona

Durante a anestesia, o sangue foi coletado por punção cardíaca e centrifugado a 419 g durante 15 min. O soro foi armazenado em microtubos e congelado a -20°C . A quantificação da testosterona sérica foi determinada por ensaio de

quimioluminescência utilizando o kit de reagente de testosterona do Access, adequado para o Sistema de Imunoensaio Access 2 (Beckman Coulter, Brea, CA).

Análises estatísticas

Os valores percentuais foram convertidos para arco seno, com finalidade de torná-los mais exatos, para posteriormente ser realizada a estatística (Matta et al., 2002). Os resultados quantitativos foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

Resultados

Bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais

A concentração de Cd aumentou em todas as formas de administração do metal em comparação ao controle, sendo maior na via oral fracionada, enquanto Ca e Cu reduziram em todos os animais intoxicados com Cd. Por outro lado, as concentrações de Mn e Zn reduziram nos animais que receberam Cd *i.p.* comparados ao controle e administração via oral fracionado, sendo semelhante à via oral dose única (Figura 1).

Estresse oxidativo

A atividade de SOD reduziu nos animais que receberam Cd via oral em ambas as formas de administração. A atividade de CAT aumentou somente nos animais onde o Cd foi ofertado *i.p.* em relação ao controle, apresentando semelhança com as administrações via oral. A atividade da GST aumentou na administração *i.p.* e via oral dose única em relação ao controle. No entanto, a atividade desta enzima não diferiu entre os grupos que receberam Cd tanto *i.p.* quanto via oral (Figura 2). Os valores de malondialdeído e óxido nítrico não variaram significativamente entre os grupos.

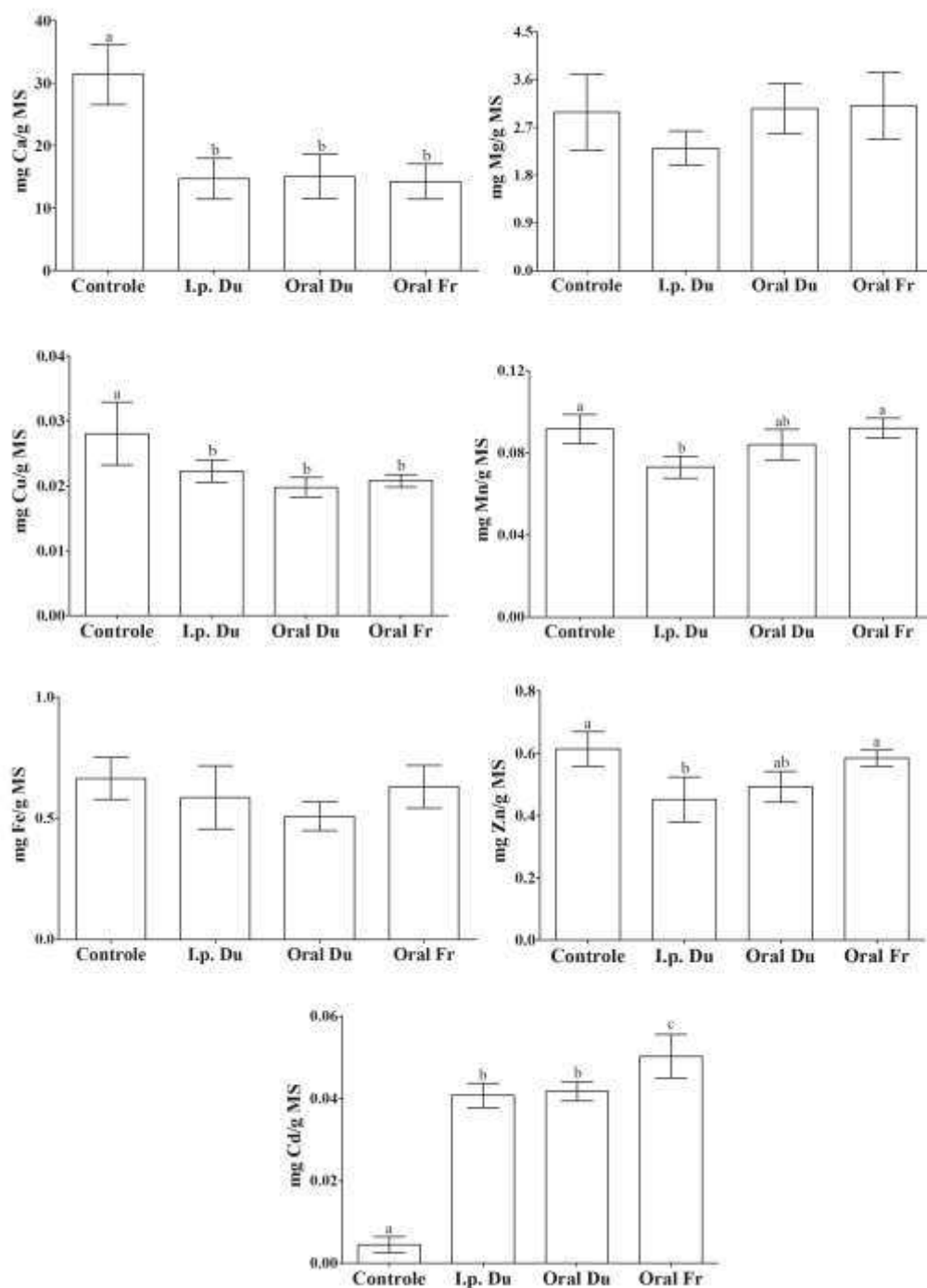


Figura 1. Concentração de cádmio e minerais essenciais testiculares de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal dose única e via oral dose única e fracionada. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; Cd = Cádmio; Zn = Zinco; Cu = Cobre; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; Fe = Ferro; Mn = Manganês. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

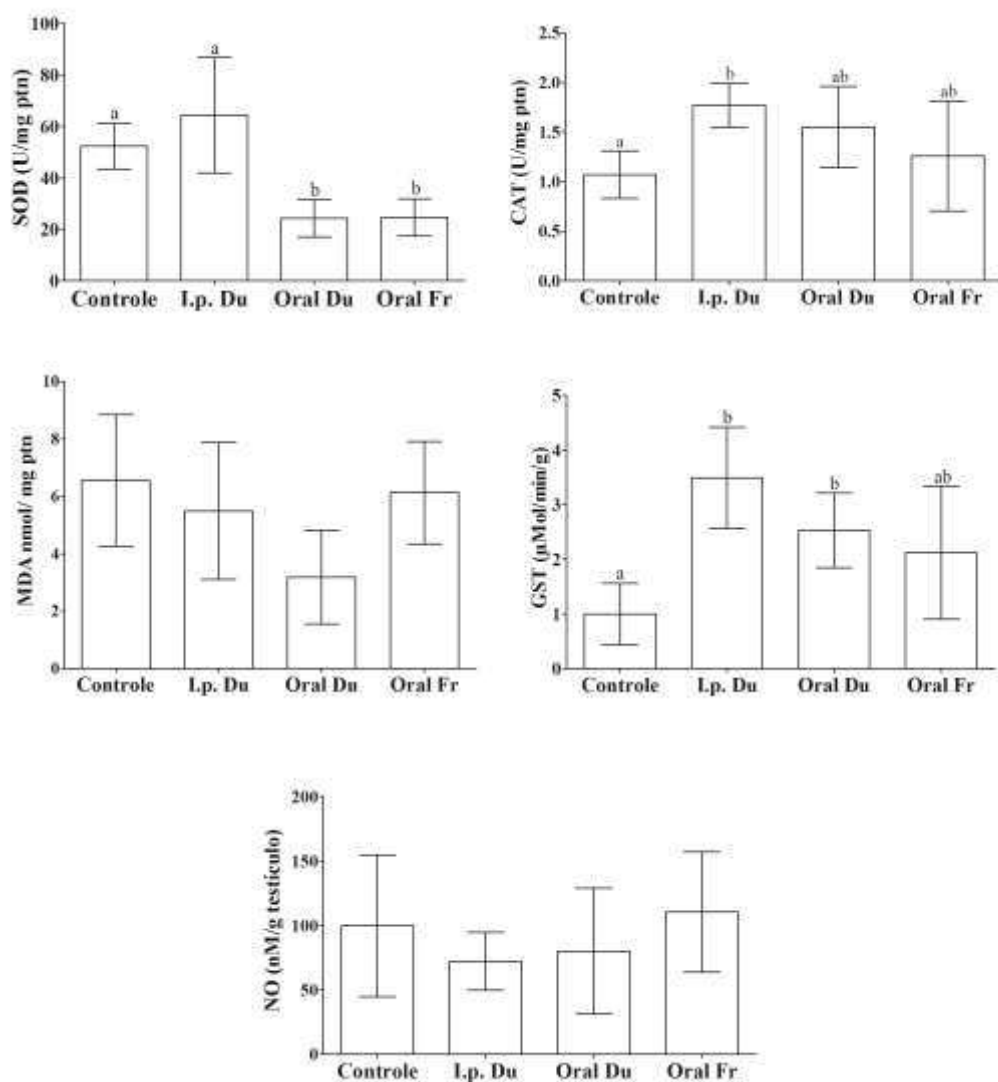


Figura 2. Atividade de enzimas antioxidantes, concentração de malondialdeído e de óxido nítrico testiculares de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal dose única e via oral dose única e fracionada. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; SOD = Superóxido dismutase; CAT = Catalase; MDA = Malondialdeído; GST = Glutathiona S-transferase; NO = Óxido nítrico. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Parâmetros Biométricos

O peso testicular e do parênquima reduziram nos animais que receberam Cd via oral nas duas formas de administração quando comparados aos animais controle e

Cd administrado *i.p.*. Os valores de peso corporal, IGS e IPS não sofreram alteração pela exposição (Tabela 1).

Tabela 1. Biometria corporal e testicular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal dose única e via oral dose única e fracionada (n = 5 animais/grupo).

| | Controle | I.p. Du | Oral Du | Oral Fr |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Peso corporal (g) | 38,10 ± 0,47 | 39,60 ± 4,00 | 33,71 ± 4,30 | 36,57 ± 4,20 |
| Peso testicular (g) | 0,220 ± 0,020 ^a | 0,216 ± 0,017 ^a | 0,188 ± 0,016 ^b | 0,181 ± 0,013 ^b |
| Peso parênquima (g) | 0,202 ± 0,017 ^a | 0,206 ± 0,022 ^a | 0,175 ± 0,021 ^b | 0,171 ± 0,011 ^b |
| Peso albugínea (g) | 0,018 ± 0,009 | 0,010 ± 0,005 | 0,013 ± 0,007 | 0,010 ± 0,004 |
| IGS (%) | 0,58 ± 0,06 | 0,55 ± 0,02 | 0,57 ± 0,11 | 0,50 ± 0,07 |
| IPS (%) | 0,53 ± 0,05 | 0,52 ± 0,02 | 0,53 ± 0,11 | 0,47 ± 0,07 |

Média ± desvio-padrão. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; IGS = Índice gonadossomático; IPS = Índice parenquimossomático. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls (p≤0,05).

Histopatologia testicular

Nos animais intoxicados com Cd observa-se degeneração dos túbulos seminíferos, com ausência de células germinativas, além de vacuolização generalizada do epitélio germinativo (Figura 3). Assim, o percentual de túbulos seminíferos com patologias leves e graves aumentou em todos os animais intoxicados com Cd (Figura 4).

Viabilidade celular

Nos animais expostos ao Cd, em ambas as vias e formas de administração, aumentou o percentual de células com dano inicial marcadas pela sobreposição do laranja de acridina e iodeto de propídio e células iodeto de propídio positivas. Sendo que, este percentual foi maior nos animais em que o Cd foi administrado via oral, tanto dose única quanto fracionada (Figura 5).

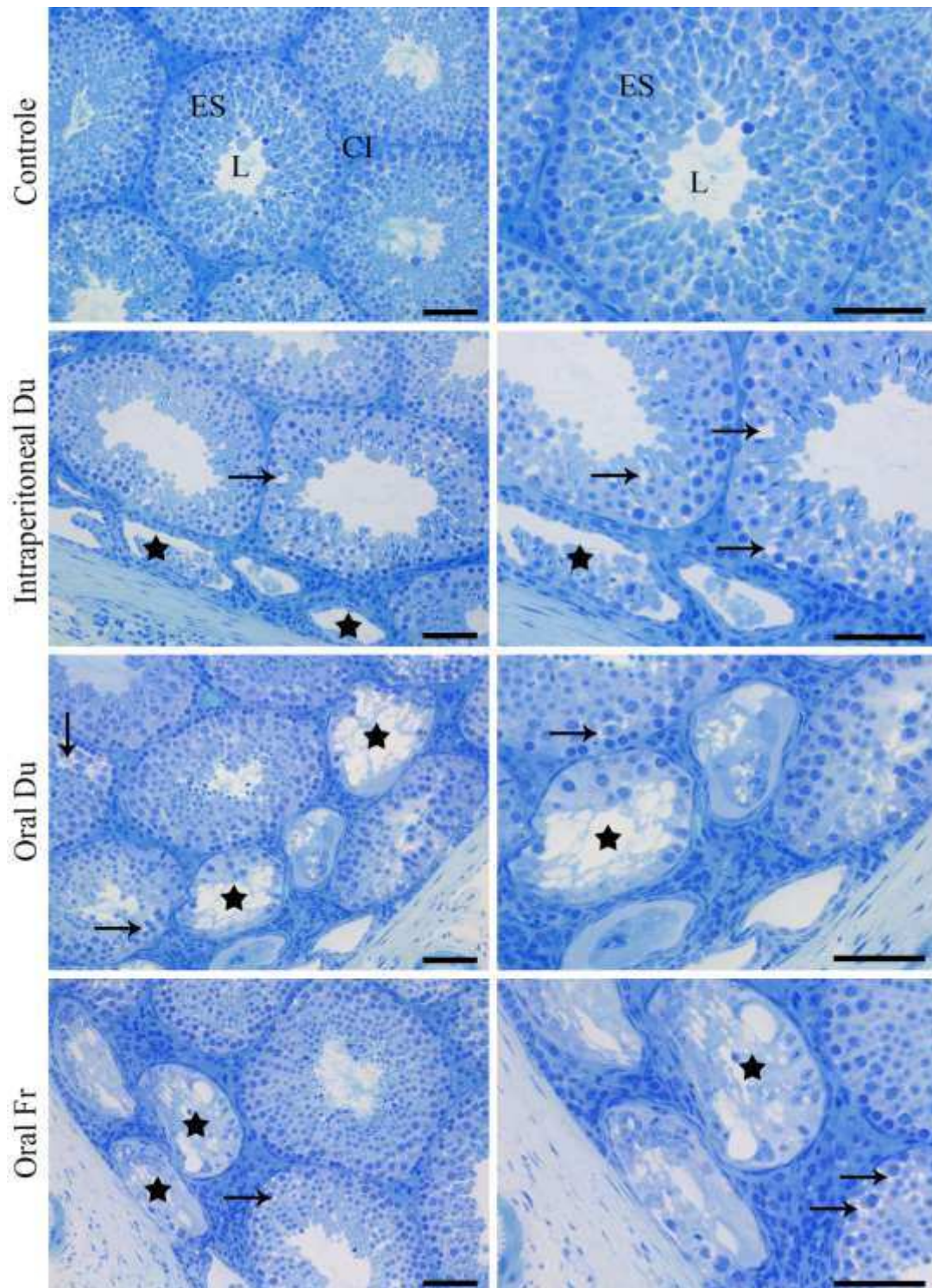


Figura 3. Fotomicrografias de secções testiculares de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal dose única e via oral dose única e fracionada. Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; ES = Epitélio seminífero; L = Lúmen; CI = Compartimento intertubular; Setas = epitélio germinativo vacuolizado (Patologia leve); Estrelas = Túbulos seminíferos degenerados (Patologia grave). Azul de Toluidina. Barras = 60 μ m.

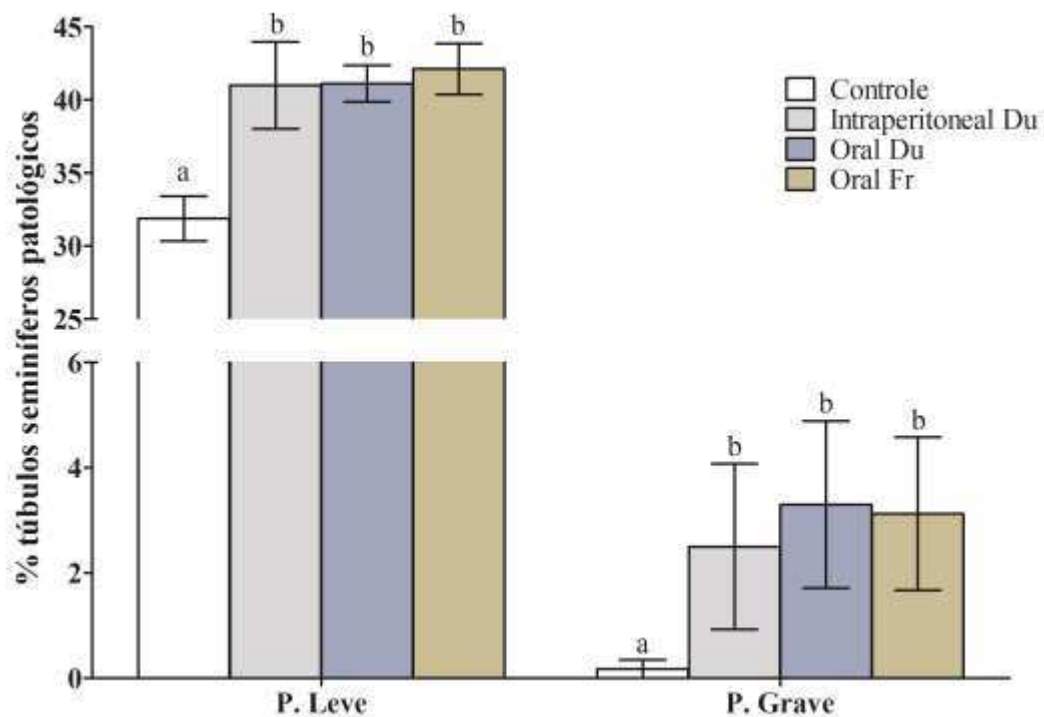


Figura 4. Quantificação de túbulos seminíferos patológicos de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal dose única e via oral dose única e fracionada. Du = Dose única; Fr = Dose fracionada. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

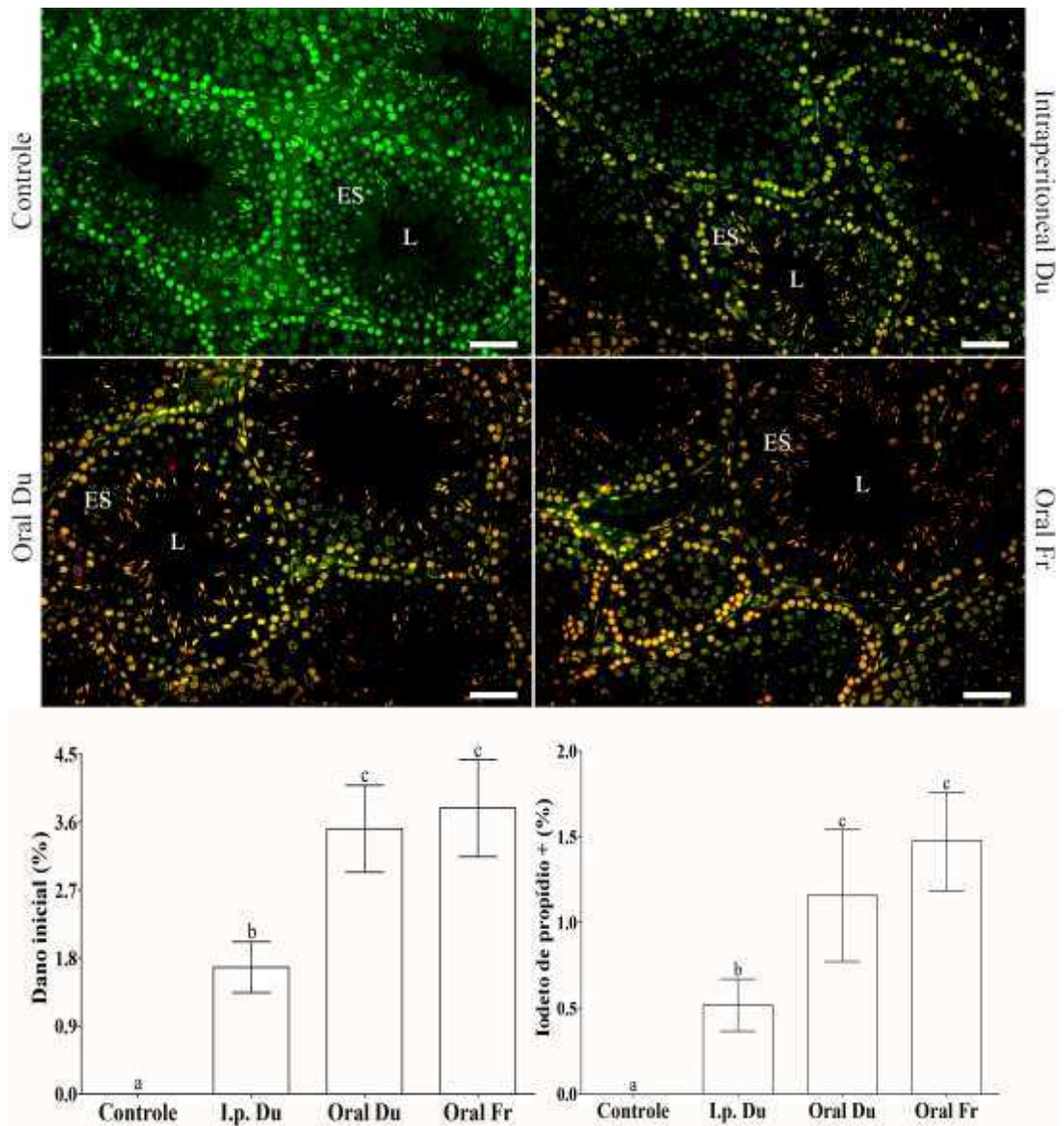


Figura 5. Viabilidade celular testicular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal dose única e via oral dose única e fracionada. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; ES = Epitélio seminífero; L = Lúmen. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$). Barras = 50 μ m.

Histomorfometria testicular

Com relação aos parâmetros histomorfométricos tubulares, o percentual e o volume de lúmen aumentaram nos animais que receberam Cd *i.p.*. Entretanto, nos animais que receberam Cd via oral dose única o volume de lúmen reduziu comparado aos animais controle, porém foi semelhante à administração fracionada.

O percentual de epitélio reduziu na exposição do Cd *i.p.* comparado aos demais tratamentos (Tabela 2).

O volume de túbulo seminífero reduziu nos animais em que o Cd foi administrado via oral, tanto na dose única quanto na fracionada. Enquanto o volume de epitélio reduziu somente no Cd via oral fracionado em relação ao controle, sendo semelhante às demais formas de administração do Cd. A altura de epitélio reduziu nos animais que receberam Cd via oral fracionado quando comparados aos animais controle e àqueles que receberam Cd via oral dose única. A relação túbulo epitélio aumentou quando o Cd foi administrado via oral fracionado comparado ao controle e demais formas de exposição ao metal (Tabela 3).

Tabela 2. Proporção volumétrica de elementos tubulatos testiculares de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal dose única e via oral dose única e fracionada (n = 5 animais/grupo).

| | Controle | I.p. Du | Oral Du | Oral Fr |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Túbulo (%) | 88,80 ± 0,41 | 87,75 ± 1,52 | 88,12 ± 1,10 | 88,74 ± 1,07 |
| Epitélio (%) | 64,72 ± 1,21 ^a | 61,12 ± 1,72 ^b | 65,32 ± 1,65 ^a | 63,98 ± 2,14 ^a |
| Túnica (%) | 10,75 ± 0,22 | 10,38 ± 0,84 | 10,49 ± 0,60 | 10,65 ± 0,71 |
| Lúmen (%) | 13,33 ± 1,05 ^a | 16,25 ± 1,09 ^b | 12,31 ± 1,91 ^a | 14,11 ± 0,94 ^a |
| ITS (%) | 0,47 ± 0,05 | 0,46 ± 0,02 | 0,47 ± 0,09 | 0,42 ± 0,06 |
| IES (%) | 0,34 ± 0,03 | 0,32 ± 0,02 | 0,35 ± 0,07 | 0,30 ± 0,04 |

Média ± desvio-padrão. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; ITS = Índice tubulossomático; IES = Índice epiteliossomático. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls (p≤0,05).

Tabela 3. Morfometria e estereologia de elementos tubulares testiculares de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal dose única e via oral dose única e fracionada (n = 5 animais/grupo).

| | Controle | I.p. Du | Oral Du | Oral Fr |
|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Túbulo (mL) | 0,179 ± 0,015 ^a | 0,181 ± 0,021 ^a | 0,154 ± 0,016 ^b | 0,151 ± 0,010 ^b |
| Epitélio (mL) | 0,130 ± 0,010 ^a | 0,126 ± 0,014 ^{ab} | 0,115 ± 0,014 ^{ab} | 0,109 ± 0,008 ^b |
| Túnica (mL) | 0,022 ± 0,002 | 0,021 ± 0,003 | 0,018 ± 0,003 | 0,018 ± 0,002 |
| Lúmen (mL) | 0,027 ± 0,004 ^a | 0,034 ± 0,005 ^b | 0,021 ± 0,001 ^c | 0,024 ± 0,002 ^{ac} |
| D. tubular (µm) | 225,11 ± 9,04 | 222,41 ± 11,36 | 226,81 ± 11,0 | 215,27 ± 14,86 |
| D. luminal (µm) | 74,19 ± 3,89 | 75,42 ± 6,39 | 80,21 ± 5,31 | 83,23 ± 7,70 |
| Alt. epitélio (µm) | 150,92 ± 6,86 ^a | 146,99 ± 11,10 ^{ab} | 146,60 ± 5,88 ^a | 132,04 ± 10,77 ^b |
| Ár. túbulo (mm ²) | 0,0398 ± 0,0032 | 0,0389 ± 0,0040 | 0,0404 ± 0,0039 | 0,0365 ± 0,0050 |
| Ár. lúmen (mm ²) | 0,0043 ± 0,0004 | 0,0045 ± 0,0007 | 0,0051 ± 0,0007 | 0,0053 ± 0,0010 |
| Ár. epitélio (mm ²) | 0,0355 ± 0,0029 | 0,0344 ± 0,0038 | 0,0354 ± 0,0033 | 0,0311 ± 0,0044 |
| RTE | 1,12 ± 0,01 ^a | 1,13 ± 0,03 ^a | 1,14 ± 0,01 ^a | 1,17 ± 0,03 ^b |
| CTT/T (m) | 4,50 ± 0,31 | 4,71 ± 0,85 | 3,83 ± 0,38 | 4,20 ± 0,58 |
| CTT/gT (m/g) | 20,58 ± 2,28 | 21,68 ± 2,60 | 20,42 ± 2,23 | 23,24 ± 3,07 |

Média ± desvio-padrão. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; D. = Diâmetro; Alt. = Altura; Ár. = Área; RTE = Relação túbulo epitélio; CTT/T = Comprimento de túbulo seminífero nos testículos; CTT/gT = Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls (p≤0,05).

O volume de intertúbulo reduziu nos animais que receberam Cd via oral fracionado em relação aos animais onde o Cd foi administrado *i.p.* (Tabela 4). O percentual de macrófagos aumentaram em todas as formas de exposição ao Cd, enquanto que o volume aumentou em ambas formas de administração oral do Cd. O percentual de tecido conjuntivo foi maior nos animais que receberam Cd via oral dose única, enquanto o seu volume aumentou nestes mesmos animais somente comparados ao controle e ao grupo de administração fracionada. O volume de vaso sanguíneo reduziu quando o Cd foi ofertado via oral dose única comparado aos animais controle e aqueles que receberam Cd *i.p.*, e semelhante à administração oral fracionada. O percentual de citoplasma de Leydig aumentou nos animais que receberam Cd *i.p.* em comparação aos demais grupos experimentais. O percentual de núcleo de Leydig foi maior nos animais que receberam Cd via oral dose única quando comparado ao controle. O volume de citoplasma de Leydig reduziu quando o Cd foi administrado via oral fracionado comparado aos grupos controle e Cd *i.p.*.

Entretanto, a administração de Cd via *i.p.* apresentou maior volume de citoplasma e da célula de Leydig em relação a todos os animais experimentais (Tabela 4).

Tabela 4. Proporção volumétrica e volume dos elementos do compartimento intertubular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal e duas formas de administração via oral (n = 5 animais/grupo).

| | Controle | I.p. Du | Oral Du | Oral Fr |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Percentual nos testículos (%)</i> | | | | |
| Intertúbulo | 11,20 ± 0,41 | 12,25 ± 1,50 | 11,88 ± 1,12 | 11,26 ± 1,07 |
| Conjuntivo | 0,70 ± 0,19 ^a | 0,92 ± 0,17 ^a | 1,36 ± 0,25 ^b | 0,94 ± 0,17 ^a |
| Linfático | 0,92 ± 0,43 | 0,42 ± 0,24 | 0,56 ± 0,11 | 0,87 ± 0,51 |
| V. sanguíneo | 1,92 ± 0,48 | 1,79 ± 0,42 | 1,22 ± 0,41 | 1,51 ± 0,42 |
| Macrófago | 0,23 ± 0,02 ^a | 0,50 ± 0,21 ^b | 0,78 ± 0,20 ^b | 0,60 ± 0,19 ^b |
| Cit. Leydig | 6,09 ± 0,53 ^{ab} | 7,06 ± 1,05 ^b | 6,22 ± 0,37 ^a | 5,84 ± 0,23 ^a |
| N. Leydig | 1,33 ± 0,25 ^a | 1,56 ± 0,25 ^{ab} | 1,74 ± 0,18 ^b | 1,50 ± 0,18 ^{ab} |
| Leydig | 7,42 ± 0,75 | 8,62 ± 1,30 | 7,96 ± 0,54 | 7,34 ± 0,35 |
| <i>Volume nos testículos (mL)</i> | | | | |
| Intertúbulo | 0,023 ± 0,001 ^{ab} | 0,025 ± 0,002 ^a | 0,022 ± 0,005 ^{ab} | 0,019 ± 0,002 ^b |
| Conjuntivo | 0,0014 ± 0,0004 ^a | 0,0019 ± 0,0003 ^{ab} | 0,0024 ± 0,0006 ^b | 0,0016 ± 0,0003 ^a |
| Linfático | 0,0019 ± 0,0009 | 0,0009 ± 0,0005 | 0,0010 ± 0,0003 | 0,0015 ± 0,0009 |
| V. sanguíneo | 0,0038 ± 0,0008 ^a | 0,0037 ± 0,0009 ^a | 0,0022 ± 0,0010 ^b | 0,0026 ± 0,0008 ^{ab} |
| Macrófago | 0,0005 ± 0,0001 ^a | 0,0010 ± 0,0005 ^{ab} | 0,0014 ± 0,0004 ^b | 0,0010 ± 0,0003 ^b |
| Cit. Leydig | 0,0123 ± 0,0014 ^a | 0,0144 ± 0,0014 ^b | 0,0110 ± 0,0018 ^{ac} | 0,099 ± 0,0005 ^c |
| N. Leydig | 0,0027 ± 0,0004 | 0,0032 ± 0,0004 | 0,0031 ± 0,0006 | 0,0025 ± 0,0003 |
| Leydig | 0,0150 ± 0,0016 ^a | 0,0176 ± 0,0017 ^b | 0,0141 ± 0,0024 ^a | 0,0124 ± 0,0007 ^a |

Média ± desvio-padrão. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; V. sanguíneo = Vaso sanguíneo; Cit. Leydig = Citoplasma de Leydig; N. Leydig = Núcleo de Leydig. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls (p≤0,05).

O volume de células de Leydig nos testículos aumentou nos animais em que o Cd foi ofertado *i.p.* comparado às administrações via oral (Tabela 5).

Tabela 5. Morfometria das células de Leydig de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal e duas formas de administração via oral (n = 5 animais/grupo).

| | Controle | I.p. Du | Oral Du | Oral Fr |
|---|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Diâmetro nuclear (μm) | 5,01 \pm 0,23 | 4,98 \pm 0,25 | 5,21 \pm 0,30 | 5,09 \pm 0,15 |
| ILS (%) | 0,039 \pm 0,004 | 0,045 \pm 0,007 | 0,043 \pm 0,011 | 0,034 \pm 0,004 |
| Vol. nuclear (μm^3) | 66,37 \pm 9,43 | 64,88 \pm 9,42 | 74,87 \pm 13,16 | 69,15 \pm 5,88 |
| Vol. citoplasmático (μm^3) | 316,06 \pm 92,76 | 294,72 \pm 40,04 | 268,46 \pm 43,01 | 273,92 \pm 51,76 |
| Vol. celular (μm^3) | 382,43 \pm 102,13 | 359,60 \pm 49,31 | 343,33 \pm 55,66 | 343,07 \pm 57,06 |
| Vol. Leydig/T (mL) | 0,015 \pm 0,002 ^{ab} | 0,018 \pm 0,002 ^b | 0,014 \pm 0,002 ^a | 0,012 \pm 0,001 ^a |
| Vol. Leydig/g T (mL) | 0,068 \pm 0,008 | 0,082 \pm 0,011 | 0,074 \pm 0,008 | 0,069 \pm 0,004 |
| N. Leydig/T ($\times 10^6$) | 41,17 \pm 9,43 | 49,28 \pm 4,91 | 41,01 \pm 4,38 | 37,29 \pm 7,31 |
| N. Leydig/g T ($\times 10^6$) | 191,10 \pm 52,89 | 227,82 \pm 10,13 | 215,50 \pm 33,39 | 205,98 \pm 35,80 |

Média \pm desvio-padrão. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada; ILS = Índice Leydigossomático; Vol. = Volume; Vol. Leydig/T = Volume de células de Leydig nos testículos, Vol. Leydig/g T = Volume de células de Leydig por grama de testículo; N. Leydig/T = Número de células de Leydig nos testículos; N. Leydig/g T = Número de células de Leydig por grama de testículo. ^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Concentração sérica de testosterona

A concentração sérica de testosterona reduziu nos animais que receberam Cd via oral, tanto dose única quanto fracionada (Figura 6).

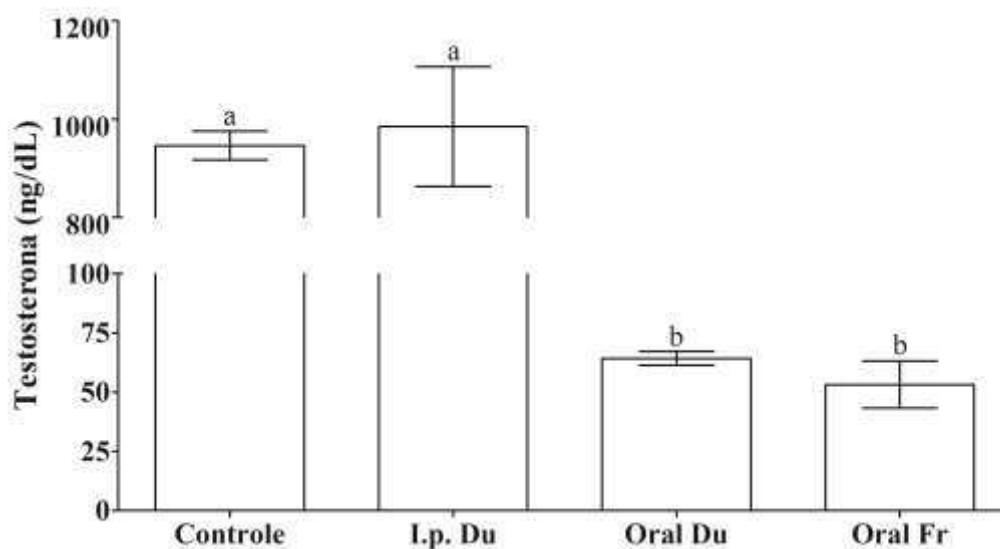


Figura 6. Concentração sérica de testosterona de camundongos expostos ao cloreto de cádmio via intraperitoneal e duas formas de administração via oral. I.p. = Intraperitoneal; Du = Dose única; Fr = Dose fracionada. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Discussão

O bioacúmulo de Cd pôde ser observado pela maior concentração deste metal nos animais intoxicados, sendo que na via oral fracionada houve maior concentração de Cd testicular. O maior acúmulo na via oral fracionada pode estar relacionado ao fato do metal ter sido administrado diariamente, mantendo a absorção contínua de Cd ao longo do período experimental.

Visto que o Cd apresenta capacidade de competir com Cu no sítio de proteínas de membrana e citoplasmáticas e, assim como o Fe, o Cu participa da reação de Fenton catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio (Jomova e Valko, 2011), a presença destes minerais leva à proteção contra a produção de EROs. Assim sendo, a redução na concentração de Cu nos grupos expostos ao Cd pode estar relacionada à indução do estresse oxidativo nestes animais. Como a concentração deste mineral reduziu em ambas as vias de administração do Cd, acredita-se que a via não interferiu na concentração de Cu testicular. Sabe-se que o Cu, juntamente com Zn e Mn, atua como cofator de SOD (Djuric et al., 2015). Assim, a menor concentração deste mineral pode estar relacionada à redução na atividade de SOD nas administrações oral de Cd. Além disso, a redução na atividade enzimática pode ter sido causada pelo excesso de radical superóxido na via oral, com consequente saturação da enzima (Aitken e Romann, 2008). Apesar de serem cofatores de SOD, a redução de Zn e Mn nos animais que receberam Cd *i.p.* não refletiu em perda da atividade enzimática. O aumento na atividade de CAT na administração *i.p.* também é indicativo da ocorrência do estresse oxidativo, pela maior produção de peróxido de hidrogênio por SOD, antes de sua saturação, a ser decomposto via CAT.

Em estudo anterior, a avaliação dos efeitos crônicos após 42 dias da exposição ao Cd mostrou que a via oral tende a causar alterações na concentração mineral e na atividade de enzimas antioxidantes mais intensas quando comparada à via *i.p.* (dados não publicados). De acordo com Hentze et al. (2004), o Cd apresenta capacidade de competir com minerais pelo receptor de metal divalente (DMT-1) localizado no duodeno. No entanto, como no presente trabalho, a via *i.p.* se mostrou mais efetiva na redução da concentração dos minerais em relação à via oral, acredita-se que na

avaliação dos efeitos agudos, a competição do Cd com os minerais nas administrações via oral não foi possível de ser observada neste trabalho.

A GST pertence à segunda linha de defesa antioxidante e apresenta função de desintoxicação de substâncias nocivas ao organismo, com consequente proteção contra estresse oxidativo (Casalino et al., 2004), além da desintoxicação de lipídios peroxidados (Aitken e Roman, 2008). Como a concentração de MDA não alterou, entende-se que não houve peroxidação lipídica e o aumento da atividade de GST evidencia que a atividade desta não foi alterada pelo Cd.

Semelhanças químicas entre os átomos de Cd e Ca permitem que o Cd substitua o Ca nas proteínas de ligação (Martelli et al., 2006). Assim, no testículo, o Ca é substituído nas junções celulares e a barreira hematotesticular é desestabilizada com consequente ruptura (Prozialeck e Lamar, 1999). Dessa forma, a redução na concentração de Ca testicular, em ambas as via de administração, pode estar relacionada à substituição deste pelo Cd. Estudos anteriores verificaram que camundongos expostos ao Cd apresentaram redução nas proteínas formadoras da barreira hematotesticular como, caderinas, cateninas, ocludina e claudina-11 (Wong, 2004; Minutoli et al., 2015). Assim, alterações nas proteínas presentes na barreira podem causar danos no epitélio germinativo (Squadrito et al., 2017). Portanto, as patologias tubulares encontradas nos animais expostos ao Cd podem estar relacionadas à baixa concentração de Ca, especialmente nas junções iodeto de propídio positivas nos animais em que o metal foi ofertado via oral, assim como as alterações nos parâmetros morfométricos tubulares naqueles que receberam Cd via oral fracionado, indicando perda do epitélio germinativo com consequente perda na capacidade espermatogênica. Estas alterações podem ser associadas à maior geração de EROs nestes animais, devido a redução na atividade de SOD, além da maior concentração de Cd testicular encontrado naqueles que receberam o metal via oral fracionado. Sendo assim, as alterações tubulares estão relacionadas com a redução no peso testicular e no peso do parênquima encontrados na via oral, o que indica maior toxicidade do Cd quando administrado por essa via. Considerando a administração via oral fracionada, o metal foi fornecido até um dia antes da eutanásia, neste caso, acredita-se que não houve intervalo suficiente para que o tecido pudesse se recuperar dos danos causados. Dessa forma, as alterações tubulares apresentam maior intensidade, principalmente no epitélio seminífero, quando a exposição ao Cd é

constante. Assim, Wang et al. (2017) relataram que em casos de excesso de Cd, a morte celular por autofagia pode ser intensificada, o que leva a alterações teciduais. Portanto, a maior intensidade de danos tubulares na via oral fracionada, pode estar relacionado ao maior acúmulo deste metal no testículo, com consequente aumento da autofagia.

O aumento no percentual de lúmen associado à redução no percentual de epitélio observado nos animais que receberam Cd *i.p.* não refletiu em alteração nos demais parâmetros tubulares. Sabendo-se que a proporção é uma análise pontual e que os outros parâmetros tratam de análises globais do órgão, considera-se que a via *i.p.* não apresentou a intensidade de toxicidade mostrada pela via oral em parâmetros tubulares.

Alterações na histologia testicular também foram observadas em outros trabalhos, como obstrução tubular e vacuolização das células germinativas em ratos que receberam 1,4 mg/Kg (Cupertino et al., 2017), desorganização dos túbulos seminíferos nos animais que receberam 1,2 mg/Kg (Predes et al., 2010; Predes et al., 2016), ambos de CdCl₂ *i.p.* dose única avaliados após 7 dias. A ausência de alteração nos diâmetros tubular e luminal também foram relatadas (Predes et al., 2010; Leite et al., 2011; Li et al., 2016; Predes et al., 2016).

O aumento no percentual de tecido conjuntivo foi observado somente nos animais que receberam Cd via oral dose única, apesar de a sua proporção ter sido maior nas demais administrações de Cd. A maior proporção de tecido conjuntivo pode estar associado ao aumento no percentual de macrófagos em todos os animais intoxicados com Cd. Sabe-se que a presença de macrófagos induz a síntese de colágeno via fibroblastos (Wynn e Barron, 2010). Além disso, o excesso de fibras pode prejudicar a comunicação entre os compartimentos tubular e intertubular, causando prejuízos na espermatogênese, o que, neste estudo, pode ser observado pelo aumento de túbulos com patologias. Assim, a fibrose testicular causada pela exposição ao Cd já é conhecida (Cupertino, 2012), além do aumento no percentual de macrófagos (Leite et al., 2011).

O maior percentual de núcleo de células de Leydig em ambas as vias, juntamente com o aumento no percentual de citoplasma na administração *i.p.*, pode ser devido ao início do processo de morte celular isquêmica ou necrose oncótica (Majno e Joris, 1995). Nas administrações via oral, apesar de não ter sido observada

redução no número das células de Leydig, a concentração sérica da testosterona reduziu, o que indica prejuízo na função esteroidogênica desta via em comparação à via *i.p.*. Assim, a redução do peso testicular e do parênquima, e os danos morfológicos no testículo dos animais que receberam Cd via oral, principalmente na forma fracionada, em que as alterações apresentaram-se mais intensas, podendo portanto estarem relacionadas à menor concentração sérica de testosterona (Figura 7).

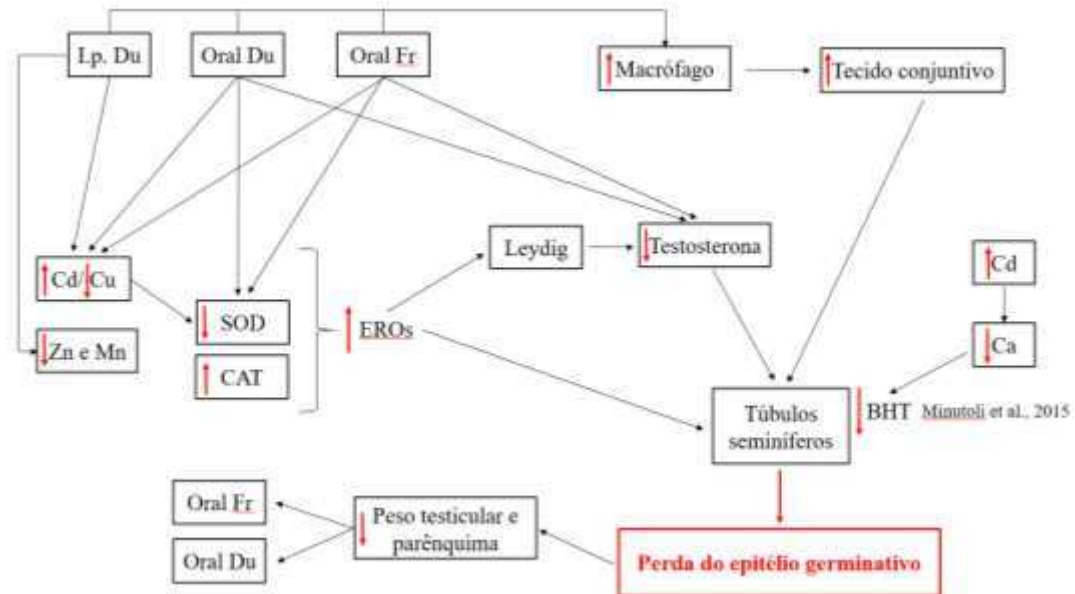


Figura 7. Vias de toxicidade do cádmio sob administração intraperitoneal dose única, oral dose única e fracionada.

Conclusões

A exposição aguda ao Cd leva ao bioacúmulo deste metal independente da via de administração, embora na via oral fracionada o acúmulo tenha sido mais expressivo. A via de administração não interfere na redução de Ca e Cu testiculares, enquanto que a via *i.p.* dose única leva à redução na concentração de Mn e Zn. A atividade de SOD reduz apenas quando o metal é administrado via oral. Alterações nos parâmetros tubulares e na viabilidade celular são observadas em ambas as vias, sendo mais intensas na via oral, principalmente a fracionada. Nos parâmetros intertubulares verificou-se que ambas as vias levaram a alterações em seus componentes. A administração oral, tanto dose única quanto fracionada, foi capaz de reduzir a concentração sérica de testosterona. Portanto, a administração oral

fracionada do Cd apresentou maior toxicidade ao testículo na avaliação dos efeitos agudos.

Referências

Aitken, R. J.; Roman, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1, 15-24, 2008.

Amann, R. P. Sperm production rates. In: Johnson, A. D.; Gomes, W. R. The testis. New York: Academic Press, 1970.

Attal, J.; Courot, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, 3, 219–241, 1963.

Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52, 302–310, 1978.

Casalino, E.; Sblano, C.; Landriscina, V.; Calzaretti, G.; Landriscina, C. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. **Toxicology**, 200, 29–38, 2004.

Cupertino, M. C. Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, 2012.

Cupertino, M. C.; Novaes, R. D.; Santos, E. C.; Bastos, D. S. S.; Santos, D. C. M.; Fialho, M. C, Q.; Matta, S. L. P. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. **Life Sciences**, 15, 23–30, 2017.

Dieterich, S.; Bieligg, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, 101(1), 33-39, 2000.

Djuric, A.; Begic, A.; Gobeljic, B.; Stanojevic, I.; Ninkovic, M.; Vojvodic, D.; Pantelic A.; Zebic, G.; Prokic, V.; Gejanovic, B.; Stojanovic, I.; Pavlica, M.; Djukic, D.; Saso, L.; Djurdjevic, D.; Pavlovic, M.; Topic, A.; Vujanovic, D.; Stevnovic, I.; Djukic, M. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. **Food and Chemical Toxicology**, 86, 25–33, 2015.

França, L. R.; Russell, L. D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J (Eds). Male reproduction - a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications. 1998. pp. 198-219.

Gao, P.; Liu, S.; Ye, W.; Lin, N.; Meng, P.; Feng, Y.; Zhang, Z.; Cui, F.; Lu, B.; Xing, B. Assessment on the occupational exposure of urban public bus drivers to bioaccessible trace metals through resuspended fraction of settled bus dust. **Science of The Total Environment**, 508C, 37–45, 2014.

Giri, B. R.; Roy, B. *Cysticercus fasciolaris* infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver: a strategy for host-parasite cross talk. **Parasitology Research**, 115(7), 2617-2624, 2016.

Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, 249, 7130–7139, 1974.

Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Andrews, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, 117, 285–297, 2004.

Johnsen, S. G. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 352 hypogonadal males. **Hormones**, 1, 1–24, 1970.

Johnson, L.; Petty, C. S.; Neaves, W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. **Biology of Reproduction**, 25(1), 217-226, 1981.

Jomova, K.; Valko, M. Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. **Current Pharmaceutical Design**, 17(31), 3460-3473, 2011.

Jung, H. Y.; Seo, D. W.; Hong, C. O.; Kim, J. Y.; Yang, S. Y.; Lee, K. W. Nephroprotection of plantamajoside in rats treated with cadmium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 39(1), 125–802, 2015.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 27, 137A, 1965.

Leazer, T. Cadmium absorption and its relationship to divalent metal transporter-1 in the pregnant rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 185(1), 18–24, 2002.

Leite, R. P.; Wada, R. S.; Monteiro, J. C.; Predes, F. S.; Dolder, H. Protective effect of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. **Biological Trace Element Research**, 141(1–3), 262–274, 2011.

Li, R.; Luo, X.; Li, L.; Peng, O.; Yang, Y.; Zhao, L.; Ma, M.; Hou, Z. The protective effects of melatonin against oxidative stress and inflammation induced by acute cadmium exposure in mice testis. **Biological Trace Element Research**, 170(1), 152-164, 2016.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275, 1951.

Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, 146, 3–15, 1995.

Martelli, A.; Rousselet, E.; Dycke, C.; Bouron, A.; Moulis, J-M. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**, 88, 1807–1814, 2006.

Matta, S. L. P.; Vilela, D. A. R.; Godinho, H. P.; França, L. R. The Goitrogen 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) Givenduring Testis Development Increases Sertoli and GermCell Numbers per Cyst in Fish: The Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. **Endocrinology**, 143(3),970–978, 2002.

Matovic, V.; Buha, A.; Bulat, Z.; Dukic-Cosic, D.; Miljkovic, M.; Ivanišević, J.; Kotur-Stevuljevic, J. Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. **Food and Chemical Toxicology**, 50, 552–557, 2012.

Melo, F. C.; Matta, S. L. P.; Paula, T. A.; Gomes, M. L.; Oliveira, L. C. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. **Biological Research**, 43(4), 445–450, 2010.

Minutoli, L.; Micali, A.; Pisani, A.; Puzzolo, D.; Bitto, A.; Rinaldi, M.; Pizzino, G.; Irrera, N.; Galfo, F.; Arena, S.; Pallio, G.; Mecchio, A.; Germana, A.; Bruschetta, D.; Laura, R.; Magno, C.; Marini, H.; Squadrito, F.; Altavilla, D. Research Article Flavocoxid Protects Against Cadmium-Induced Disruption of the Blood-Testis Barrier and Improves Testicular Damage and Germ Cell Impairment in Mice. **Toxicological Sciences**, 148(1), 311–329, 2015.

Mouro, V. G. S.; Menezes, T. P.; Lima; G.D.A.; Domingues, R.R.; Souza, A.C.F.; Oliveira, J.A.; Matta, S.L.P.; Machado-Neves, M. How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? **Biological Trace Element Research**, 2017. DOI: 10.1007/s12011-017-1139-3.

Oberholzer, M.; Östreicher, M.; Christen, H.; Brühlmann, M. Methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and Cell Biology**, 105, 333-355, 1996.

Predes, F. S.; Diamante, M. A. S.; Dolder, H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **International Journal of Experimental Pathology**, 91(2), 125–131, 2010.

Predes, F. S.; Diamante, M. A. S.; Foglio, M. A.; Dolder, H. Effects of *Arctium lappa* on cadmium-induced damage to the testis and epididymis of adult Wistar rats. **Biological Trace Element Research**, 173(2), 362-371, 2016.

Prozialeck, W. C.; Lamar, P. C. Interaction of Cd (Cd) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1451, 93-100, 1999.

Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide**, 6, 178–185, 2002.

Ryu, D. Y.; Lee, S. J.; Park, D. W.; Choi, B. S.; Klaassen, C. D.; Park, J. D. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats, **Toxicology Letters**, 152, 19–25, 2004.

Sarban, S.; Kocyigit, A.; Yazar, M.; Isikan, U. E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**, 38, 981–986, 2005.

Satarug, S.; Garrett, S. H.; Sens, M. A.; Sens, D. A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Environmental Health Perspectives**, 118, 182–190, 2010.

Squadrito, F.; Micali, A.; Rinaldi, M.; Irrera, N.; Marini, H.; Puzzolo, D.; Pisani, A.; Lorenzini, C.; Valenti, A.; Laurà, R.; Germanà, A.; Bitto, A.; Pizzino, G.; Pallio, G.; Altavilla, D.; Minutoli, L. Polydeoxyribonucleotide, an Adenosine-A2A Receptor Agonist, Preserves Blood Testis Barrier from Cadmium-Induced Injury. **Frontiers in Pharmacology**, 7, 2017.

Wang, Y-J.; Yan, J.; Yin, F.; Li, L.; Qin, Y-G.; Meng, C-Y.; Lu, R-F.; Guo, L. Role of autophagy in cadmium-induced testicular injury. **Human and Experimental Toxicology**, 36(10), 1039-1048, 2017.

Wong, C-H.; Mruk, D. D.; Lui, W-Y.; Cheng, C. Y. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. **Journal of Cell Science**, 117(5), 783-798, 2004.

Wynn, T. A.; Barron, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, 30, 245–257, 2010.

Artigo 2

Óleo de *Euterpe oleracea* MARTIUS reverte alterações testiculares induzidas pelo cádmio

Resumo

O Cádmio (Cd) é um poluente ambiental que pode causar danos à saúde, sendo conhecida sua toxicidade reprodutiva. A geração de espécies reativas de oxigênio com consequente estresse oxidativo é uma consequência da exposição a esse metal. Sabe-se que os frutos da espécie *Euterpe oleracea* são ricos em óleos contendo triacilglicerol e compostos fenólicos, sendo considerados como potente antioxidante, a investigação de seus efeitos no testículo faz-se necessária. Dessa forma, foi avaliada a ação antioxidante do óleo de *E. oleracea* no testículo de camundongos expostos ao Cd. Para os ensaios *in vivo*, os camundongos receberam solução aquosa de CdCl₂ na concentração de 4,28 mg/Kg por via oral durante 7 dias. Após este tratamento, os animais foram separados em grupos e tratados com óleo nas doses de 50, 100 e 150 mg/Kg durante 42 dias. Parâmetros morfométricos tubulares e de Leydig foram recuperados após o tratamento com óleo, associado ao aumento na concentração sérica de testosterona e da viabilidade celular. O tratamento com o óleo preveniu a progressão dos danos na morfologia tubular causados pelo Cd. A concentração de Mn e Zn testiculares, aumentaram nos animais tratados com óleo, além da estimulação na atividade de SOD e CAT. Assim, pode se concluir que o tratamento com óleo apresentou atividade antioxidante curativa contra alterações testiculares induzidas pelo Cd.

Palavras-chave: Açaí, Antioxidante, Histomorfometria, Metal pesado, Reprodução.

Introdução

O Cádmio (Cd) é um conhecido poluente ambiental que pode causar sérios danos à saúde humana e de animais, sendo classificado como carcinogênico (WHO, 2010). A presença do cádmio (Cd) no meio ambiente pode ocorrer devido a atividades de mineração, industrial e pelo uso de pesticidas organofosforados. Outra forma de contaminação pelo metal pode ser pela inalação da fumaça de cigarros (Satarug et al., 2010; Gao et al., 2014). A exposição a este metal, tanto em animais quanto em humanos, pode ocorrer pela ingestão de água contendo o metal, assim como por vegetais irrigados por esta água ou cultivados em solos contaminados. Assim,

Alterações na estrutura e função testiculares devido à intoxicação pelo Cd são bem descritas na literatura (Predes et al., 2010; Cupertino et al., 2017; Cupertino et

al., 2018). Este metal provoca rompimento da barreira hematotesticular com consequente perda do epitélio germinativo (Minutoli et al., 2015), além de redução na concentração sérica de testosterona como consequência da ação do Cd nas células de Leydig (Predes et al., 2010, Wu et al., 2017).

O Cd apresenta capacidade de competir com minerais essenciais, como zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), ferro (Fe) e magnésio (Mg) pelo seu receptor de metal divalente (DMT-1) localizado no duodeno (Hentze et al., 2004; Ryu et al., 2004). Essa competição pode levar à redução na concentração destes elementos nos testículos. Considerando que o Zn é fundamental para a ocorrência normal da espermatogênese, prejuízos na produção espermática podem ser decorrentes da baixa concentração de Zn testicular (Cupertino et al., 2017; Wu et al., 2017).

Estes minerais agem como cofatores de enzimas antioxidantes (Djuric et al., 2015) e assim, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um mecanismo de toxicidade do Cd (Turner e Lysiak, 2008; Arafa et al., 2014). Vários estudos têm sido voltados para a descoberta de produtos vegetais com atividade antioxidante frente aos danos testiculares causados pelo Cd, como por exemplo *Ginkgo biloba* (Predes et al., 2011), *Paullinia cupana* (Leite et al., 2011; Leite et al., 2013), suco de uva (Pires et al., 2013; Lamas et al., 2015), extrato de semente de uva (Sonmez e Tascioglu, 2016), *Artocarpus altilis* (Adaramoye e Akanni, 2016) e *Arctium lappa* (Predes et al., 2016).

Dentre os produtos vegetais destaca-se o fruto de *Euterpe oleracea*, conhecido como açaí da Amazônia (Menezes et al., 2008). Este é rico em óleos fixos com alta concentração de ácidos graxos insaturados com prevalência do oleico (ômega-9) e linoleico (ômega-6), e menor concentração de ácidos saturados como palmítico e esteárico (Souza et al., 2017). A administração do óleo de *E. oleracea* em ratos Wistar apresentou atividade protetora contra a aterosclerose em casos de dislipidemias induzidas pelo Triton-X, além da redução do colesterol total (Souza et al., 2017). É conhecido que os ácidos graxos são importantes na síntese de colesterol (Nelson e Cox, 2014). Além disso são precursores de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido araquidônico, os quais atuam como reguladores da proteína esteroidogênica StAR que é responsável pelo transporte de colesterol para a membrana mitocondrial (Manna et al., 2009). Nas células de Leydig esse mecanismo pode favorecer a síntese de testosterona. No entanto, a ação do óleo de *E. oleracea*

nas funções reprodutivas masculinas não foi encontrada na literatura. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a ação do óleo de *E. oleracea* frente ao estresse oxidativo testicular induzido pelo Cd.

Material e Métodos

Obtenção do óleo de *E. oleracea*

Os frutos de *E. oleracea* foram coletados na Ilha das Onças (S 1°26'21" e O 48°32'29"), Município de Barcarena, Pará. Frutos maduros foram selecionados, lavados, pesados e desinfetados com água clorada. A polpa foi congelada a -18°C contendo de 11 a 14% de sólidos e enviada para a Universidade Federal de Viçosa (UFV). A polpa foi liofilizada em liofilizador (Liotop lyophilizer, Brasil), acondicionada em potes de polietileno revestido com folha de alumínio para impedir a passagem da luz, e armazenada em temperatura de -20 °C. O óleo foi obtido pela extração da polpa liofilizada (20 g) com éter de petróleo (670 mL) em aparelho Soxhlet por 8 horas, conforme Freitas et al. (2016). O solvente foi removido até a secura em rotaevaporador, obtendo ao final o óleo de *E. oleracea*, com rendimento final de 52% (10,4 g) para a realização dos ensaios de atividade antioxidante.

Análise qualitativa e quantitativa do óleo de *E. oleracea*

As análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas no Departamento de Química da UFV, em espectrofotômetro FT-IR VARIAN 660 equipado com GladiATR. A determinação dos ácidos graxos no Óleo foi realizada em equipamento CG-SHIMADZU GCMS-QP 2010 Ultra do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA). Para esta análise, os triacilglicerois foram hidrolisados e derivatizados com BSTFA para formação dos ácidos graxos sililados.

Animais

Quarenta e nove camundongos Swiss machos adultos, com 56 dias de idade, foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, e foram mantidos sob controle de iluminação (12h claro/ 12h escuro) e temperatura (21°C ± 1). Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados

pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), protocolo 058/2016.

Grupos experimentais e coleta do material biológico

Após 30 dias de adaptação os animais foram divididos, aleatoriamente, em sete grupos experimentais ($n = 7$ animais/grupo), sendo quatro grupos controle e três grupos tratados com Óleo. Os animais do grupo controle negativo receberam água destilada por gavagem; o grupo controle positivo recebeu 4,28 mg/Kg de cloreto de cádmio (CdCl_2 / Sigma, St Louis, MO, USA) por gavagem durante sete dias consecutivos; o controle óleo de *E. oleracea* recebeu 150 mg/Kg do óleo diluído em Tween 20 1%, adaptado de Marques et al. (2016), durante 42 dias a partir do oitavo dia de experimento; os animais controle veículo receberam Tween 20 1%, durante 42 dias a partir do oitavo dia de experimento. Os demais animais receberam 4,28 mg/Kg de CdCl_2 por gavagem durante sete dias e a partir do oitavo dia receberam tratamento com 50, 100 e 150 mg/Kg do óleo de *E. oleracea* baseado no estudo de Marques et al. (2016), durante 42 dias.

No 50º dia do experimento os animais foram eutanasiados. O período de 42 dias foi escolhido de acordo com o tempo do ciclo do epitélio seminífero em camundongos (Russell et al., 1990). Os animais foram sedados e anestesiados com tiopental 30 mg/Kg *i.p.* e eutanasiados por aprofundamento anestésico. Os testículos foram removidos, dissecados e pesados, sendo o testículo esquerdo fixado em Karnovsky e destinado para avaliação histológica, e o direito congelado $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para análises bioquímicas.

Processamento histológico

O testículo esquerdo foi imerso em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e transferido para etanol 70%. Posteriormente, fragmentos testiculares foram desidratados em solução crescente de etanol e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de $3\mu\text{m}$ foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), respeitando-se o intervalo de, no mínimo, $40\mu\text{m}$ entre os cortes. As preparações histológicas foram coradas com azul de toluidina + borato de sódio (1%) para realização das análises morfométricas. Foram utilizadas imagens capturadas em

fotomicroscópio (Olympus BX -53, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão). Nas avaliações morfométricas, todas as imagens foram analisadas utilizando o programa Image J[®].

Histopatologia testicular

Para a avaliação histopatológica do testículo foram contados 200 túbulos por animal e classificados em túbulos normais e patológicos, sendo os patológicos divididos em patologias leves (vacuolização e desprendimento do epitélio germinativo) e patologias graves (ausência de células germinativas e/ou células de Sertoli), adaptado do índice de Johnsen (1970). Sendo os resultados expressos em percentuais.

Viabilidade celular

Secções histológicas testiculares foram coradas com laranja de acridina e iodeto de propídio para avaliação de alterações morfológicas celulares (Giri e Roy, 2016). Laranja de Acridina (LA, verde) é um corante vital que marca tanto células viáveis quanto células mortas (ou apoptóticas), enquanto o iodeto de propídio (IP, vermelho) marca apenas células que perderam a integridade da membrana.

A classificação celular, portanto, é baseada em condensação nuclear e fragmentação, bem como na integridade da membrana (Giri e Roy, 2016). As células viáveis apresentam núcleo verde com estrutura intacta, enquanto que as células apoptóticas exibem denso núcleo amarelo/laranja/vermelho devido à condensação de cromatina e o grau de perda de integridade da membrana, caracterizado pela coloração com IP (Lowry et al., 1951). As imagens digitais foram capturadas pelo fotomicroscópio EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canadá) e analisadas utilizando o software de análise de imagens Image J[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) de acordo com Oberholzer et al. (1956). Para isso, foi utilizada uma área total de $30 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ para calcular o percentual de células germinativas apoptóticas nos túbulos seminíferos por grupo.

Histomorfometria testicular

O índice gonadossomático (IGS) foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula: $\text{IGS} = \text{PG}/\text{PC} \times 100$, sendo PG = peso gonadal e PC = peso corporal (Amann,

1970). O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se o peso da albugínea do peso total dos testículos. O índice parenquimossomático (IPS) foi determinado pela fórmula: $PP/PC \times 100$ (PP = peso do parênquima testicular e PC = peso corporal).

Morfometria tubular. As proporções volumétricas foram obtidas por contagem de 2.660 pontos projetados em 10 imagens capturadas das lâminas histológicas, com ampliação de $100\times$. Foram contados pontos coincidentes sobre a túnica própria, epitélio seminífero e lúmen (compartimento tubular) e pontos no compartimento intertubular. A determinação do percentual de cada componente se deu pela seguinte fórmula: proporção volumétrica (%) = (número de pontos no túbulo ou intertúbulo / 2.660 pontos no total) x 100. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado a partir da fórmula: % túbulo/intertúbulo (ou seus constituintes) / 100 x volume total do parênquima testicular (Melo et al., 2010). Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Johnson et al., 1981), considera-se a massa do testículo igual ao seu volume. O índice tubulossomático (ITS) foi calculado a partir da fórmula $ITS (\%) = VT/PC \times 100$ (VT = Volume de túbulo seminífero e PC = Peso corporal) (Amann, 1970). O índice epiteliossomático (IES) foi obtido pela seguinte fórmula: $IES = VE/PC \times 100$ (VE = Volume de epitélio seminífero e PC = Peso corporal).

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir da mensuração de 20 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Uma vez que o diâmetro tubular permanece constante em camundongos machos adultos, em todo o ciclo do epitélio seminífero, não é necessário considerar a fase do epitélio dentro do ciclo (França e Russell, 1998). Estas secções também foram utilizadas para medir a altura do epitélio seminífero, a partir da túnica própria até o lúmen tubular, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal. Para determinar o diâmetro do lúmen subtraiu-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero (Mouro et al., 2017).

A área de túbulo seminífero foi calculada pela seguinte fórmula: $ArTS = \pi \cdot (RT)^2$, em que $ArTS$ = área de túbulo seminífero, RT = raio tubular, enquanto a área de lúmen foi calculada pela fórmula: $ArL = \pi \cdot (RL)^2$, onde ArL = área de lúmen, RL = raio luminal. A área de epitélio foi obtida subtraindo-se da área do túbulo seminífero a área do lúmen. Os resultados de área foram expressos em milímetro

quadrado (mm^2). A relação túbulo epitélio foi determinada dividindo-se a área tubular pela área de epitélio.

O comprimento total (metros) dos túbulos seminíferos (CT), foi estimado a partir do conhecimento prévio do volume ocupado por estas estruturas dentro do parênquima, bem como a partir do diâmetro tubular médio: $VTS/\pi r^2$ (VTS = volume do túbulo seminífero; πr^2 = área da secção transversal do túbulo; r = diâmetro/2) (Attal e Courot, 1963). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o comprimento total pelo peso bruto dos testículos.

Morfometria intertubular. A proporção volumétrica dos componentes intertubulares foi obtida pela contagem de 1.000 pontos, por animal, projetados em imagens do compartimento intertubular dos testículos. Foram registrados pontos coincidentes sobre os seguintes componentes intertubulares: núcleo e citoplasma da célula de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo. Para calcular as proporções volumétricas destes componentes utilizou-se a fórmula: proporção volumétrica de cada componente intertubular (%) = número de pontos do componente intertubular x 100/1000 (total de pontos). Para calcular o volume (ml) de cada componente intertubular aplicou-se a seguinte fórmula: proporção do elemento nos testículos x peso do parênquima testicular/100.

O diâmetro médio do núcleo da célula de Leydig foi obtido a partir de imagens capturadas com ampliação de 400x, sendo medidos 30 núcleos por animal, escolhendo-se aqueles mais esféricos, com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear ($VN = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio nuclear) e citoplasmático ($VC = \% \text{ citoplasma} \times VN / \% \text{ núcleo}$) e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig, somando-se VN e VC , sendo os valores expressos em μm^3 .

O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam nos testículos foi realizado a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular x peso do parênquima de um testículo/100. O volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo foi obtido utilizando-se o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig por testículo foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam nos testículos (μm^3)/volume de uma célula de Leydig

(μm^3). Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo foi utilizada a fórmula: volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3). O índice Leydigossomático (ILS) foi calculado pela fórmula: $\text{ILS} = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular}/\text{PC} \times 100$, onde PC= peso corporal (Mouro et al., 2017).

Determinação da concentração sérica de testosterona

Durante a anestesia, o sangue foi coletado por punção cardíaca e centrifugado a 419 x g durante 15 min. O soro foi armazenado em microtubos e congelado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. A quantificação da testosterona sérica foi determinada por ensaio de quimioluminescência utilizando o kit de reagente de testosterona do Access, adequado para o Sistema de Imunoensaio Access 2 (Beckman Coulter, Brea, CA).

Determinação do bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais

Amostras do testículo esquerdo foram pesadas em balança analítica de precisão (0.0001 g – BEL Mark 210A) e, posteriormente, secas em estufa a $70\text{ }^\circ\text{C}$ até atingirem peso seco constante. As amostras secas foram colocadas em Erlenmeyers de 25 mL juntamente com 1,5 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado e 0,5 mL de ácido perclórico (HClO_4) (70%) e transferidas para chapa aquecedora. A temperatura foi aumentada gradualmente, até $90\text{ }^\circ\text{C}$, de modo que a digestão do material fosse completa. A seguir, as amostras foram diluídas em água desionizada e filtradas em papel de filtro. A determinação das concentrações de cádmio, zinco, cálcio, magnésio, manganês, cobre e ferro, foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

Avaliação do estresse oxidativo

O testículo direito foi congelado em freezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$ e posteriormente homogeneizado com tampão fosfato (pH 7,4, 0,2 M com EDTA 1M), na proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de tampão, em homogeneizador de tecido portátil (YO-04727-09; LabGEN) e centrifugado a 3000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises, que foram realizadas em duplicata. A concentração de proteína total no tecido testicular foi determinada usando o método de Lowry et al. (1951).

A atividade de SOD foi estimada pelo método do pirogalol, com base na capacidade desta enzima para catalisar a reação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio, monitorada a 570 nm, em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X) (Sarban et al., 2005). A atividade da CAT foi avaliada de acordo com o método descrito por Dieterich et al. (2000), medindo a cinética da decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 60s, em espectrofotômetro a 240 nm. Para a análise de malondialdeído (MDA), o homogenato reagiu com solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e HCl 0,25 N), durante 40 minutos, em banho-maria a 90°C. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535 nm, em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X), (Buege e Aust, 1978). Os resultados foram expressos por mg de proteína.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida por leitura em espectrofotômetro a 340 nm (Habig et al., 1974) e calculada a partir da taxa de formação do conjugado 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB).

A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito no sobrenadante do homogenato do testículo, pela reação de Griess padrão. Incubou-se 50 μ L de sobrenadante do homogenato testicular com um volume igual de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de hidrocloreto de naftilenodiamina e 2,5% de H_3PO_4) à temperatura ambiente durante 10 min. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X). A concentração de nitrito foi calculada com referência à curva padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$) (Ricart-Jané et al., 2002).

Análises estatísticas

Os valores percentuais foram convertidos para arco seno, com finalidade de torná-los mais exatos, para posteriormente ser realizada a estatística (Matta et al., 2002). Os resultados obtidos a partir das avaliações quantitativas foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo método de post-hoc de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

Resultados

Análise qualitativa e quantitativa do óleo de *E. oleracea*

Pela análise do espectro no infravermelho do óleo pode-se verificar a presença de insaturação com ligação dupla devido a absorção em 3005 cm^{-1} . Pode-se verificar também a ocorrência de grande quantidade de ligações entre carbono e hidrogênio com as absorções em 2921 e 2852 cm^{-1} . Ligações insaturadas entre carbono e oxigênio formando a carbonila (-C=O) também foram verificadas pela absorção em 1743 cm^{-1} , indicativo de ésteres na constituição do óleo. A absorção em 1159 cm^{-1} é atribuída à ligação Carbono-Oxigênio. A absorção em 721 cm^{-1} indica que a cadeia carbônica possui cadeia longa $(\text{CH}_2)_n$ onde $n > 4$. Pela ausência de absorção na região de $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, verifica-se que a amostra do óleo não possui ácido graxo livre na amostra (Figura 1).

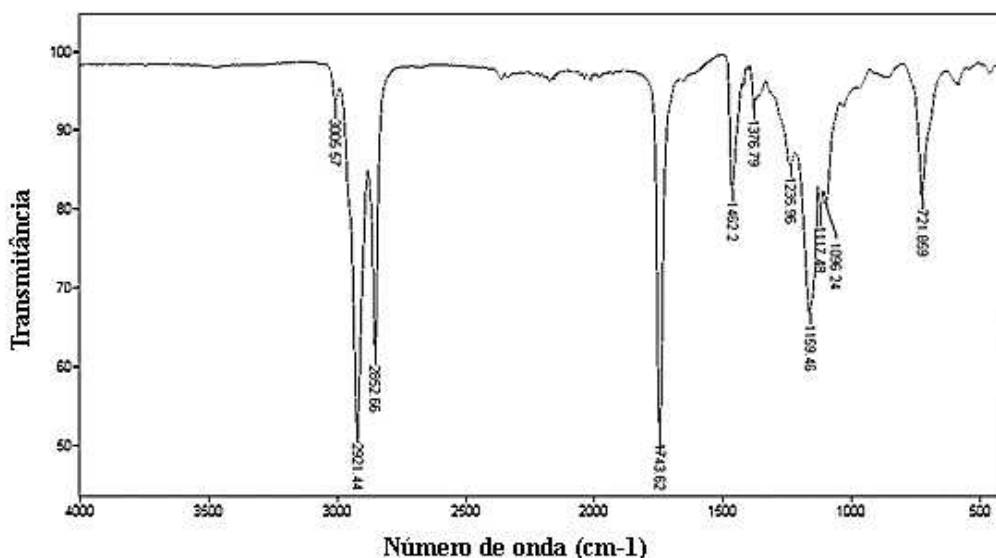


Figura 1. Espectro no infravermelho do Óleo.

Verifica-se que o óleo de *E. oleracea* apresentou, em maior quantidade, ácidos graxos monoinsaturados, prevalecendo o ácido oleico na forma de seus isômeros *Z* e *E* e pequena quantidade do oleato de metila, sendo estes componentes formadores do ômega-9. Observou-se também pequeno percentual de ácidos poli-insaturados como o linoleico (ômega-6) e a presença de ácidos saturados com prevalência do palmítico (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos no óleo de *E. oleracea*

| Ácido graxo (n:n) | % relativo de área | Tempo de retenção (minutos) |
|---|--------------------|-----------------------------|
| Ácido palmítico (16:0) | 34,39 | 34,600 |
| Ácido esteárico (18:0) | 8,68 | 38,884 |
| Σ Saturado | 43,07 | - |
| Ácido palmitoleico (16:1 ^{Δ9}) | 4,60 | 34,050 |
| Éster metílico do ácido oleico (18: 1 ^{Δ9}) | | |
| (Z) - Éster metílico do ácido oleico | 7,77 | 35,831 |
| (E) - Éster metílico do ácido oleico | 0,31 | 35,391 |
| Ácido Oleico (18: 1 ^{Δ9}) | | |
| Ácido (Z) - Oleico | 40,27 | 38,427 |
| Ácido (E) - Oleico | 2,27 | 38,504 |
| Σ Monoinsaturado | 55,22 | - |
| Ácido linoleico (18:2 ^{Δ9,12}) | 1,71 | 38,250 |
| Σ Poli-insaturado | 1,71 | - |

(n:n) = Número de átomos de carbono: insaturações em cada ácido graxo. Óleo = Óleo de *Euterpe oleracea*.

Parâmetros Biométricos

Não foram observadas alterações nos parâmetros biométricos corporais e testiculares, tanto na intoxicação causada pelo Cd, quanto nos animais que receberam tratamento com óleo após exposição ao metal (Tabela 2).

Tabela 2. Biometria corporal e testicular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *Euterpe oleracea*.

| | Controle | Cd | Óleo | Tween 20 | Cd + Óleo 50 | Cd + Óleo 100 | Cd + Óleo 150 |
|-----------------------|-----------------|---------------|---------------|-----------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Peso corporal (g) | 39,98 ± 2,45 | 41,48 ± 3,44 | 40,85 ± 4,63 | 41,32 ± 5,61 | 44,12 ± 4,36 | 38,69 ± 4,16 | 40,50 ± 2,15 |
| Peso testicular (g) | 0,20 ± 0,02 | 0,20 ± 0,02 | 0,20 ± 0,04 | 0,19 ± 0,03 | 0,21 ± 0,02 | 0,21 ± 0,01 | 0,19 ± 0,04 |
| Peso parênquima (g) | 0,18 ± 0,02 | 0,19 ± 0,02 | 0,19 ± 0,04 | 0,18 ± 0,02 | 0,20 ± 0,02 | 0,20 ± 0,01 | 0,18 ± 0,04 |
| Peso da albugínea (g) | 0,012 ± 0,003 | 0,011 ± 0,001 | 0,010 ± 0,001 | 0,010 ± 0,003 | 0,012 ± 0,002 | 0,013 ± 0,005 | 0,012 ± 0,007 |
| IGS (%) | 0,50 ± 0,08 | 0,49 ± 0,05 | 0,50 ± 0,10 | 0,47 ± 0,06 | 0,48 ± 0,03 | 0,55 ± 0,06 | 0,47 ± 0,09 |
| IPS (%) | 0,46 ± 0,08 | 0,45 ± 0,05 | 0,47 ± 0,10 | 0,44 ± 0,06 | 0,45 ± 0,03 | 0,52 ± 0,05 | 0,45 ± 0,09 |

Média ± desvio-padrão. Óleo = Óleo de *Euterpe oleracea*; IGS = Índice gonadossomático; IPS = Índice parenquimossomático; Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg. (p>0,05).

Histopatologia testicular

Alterações na arquitetura tecidual observadas na intoxicação causada pelo Cd incluem vacuolização, desprendimento e desorganização de células do epitélio germinativo, assim como ausência de células germinativas e/ou células de Sertoli. As mesmas alterações foram encontradas nos animais que receberam tratamento com óleo de *E. oleracea* (Figura 2).

O tratamento com óleo após intoxicação pelo Cd reduziu o percentual de patologias leves e graves, que apresentaram-se aumentadas pela exposição ao Cd. A redução nas patologias graves ocorreu de forma dose dependente. Sendo estas alterações ainda maiores em relação ao controle água. Animais que receberam somente óleo também apresentaram aumento de patologias leves em relação ao grupo controle (Figura 3).

Viabilidade celular

O tratamento com óleo reduziu o percentual de células com danos de forma dose dependente em relação àqueles animais intoxicados e que não receberam tratamento com óleo (Figura 4). Enquanto que aos animais intoxicados com Cd apresentaram percentual superior comparado a todos os grupos experimentais. Os danos foram encontrados principalmente no compartimento tubular (Figura 4).

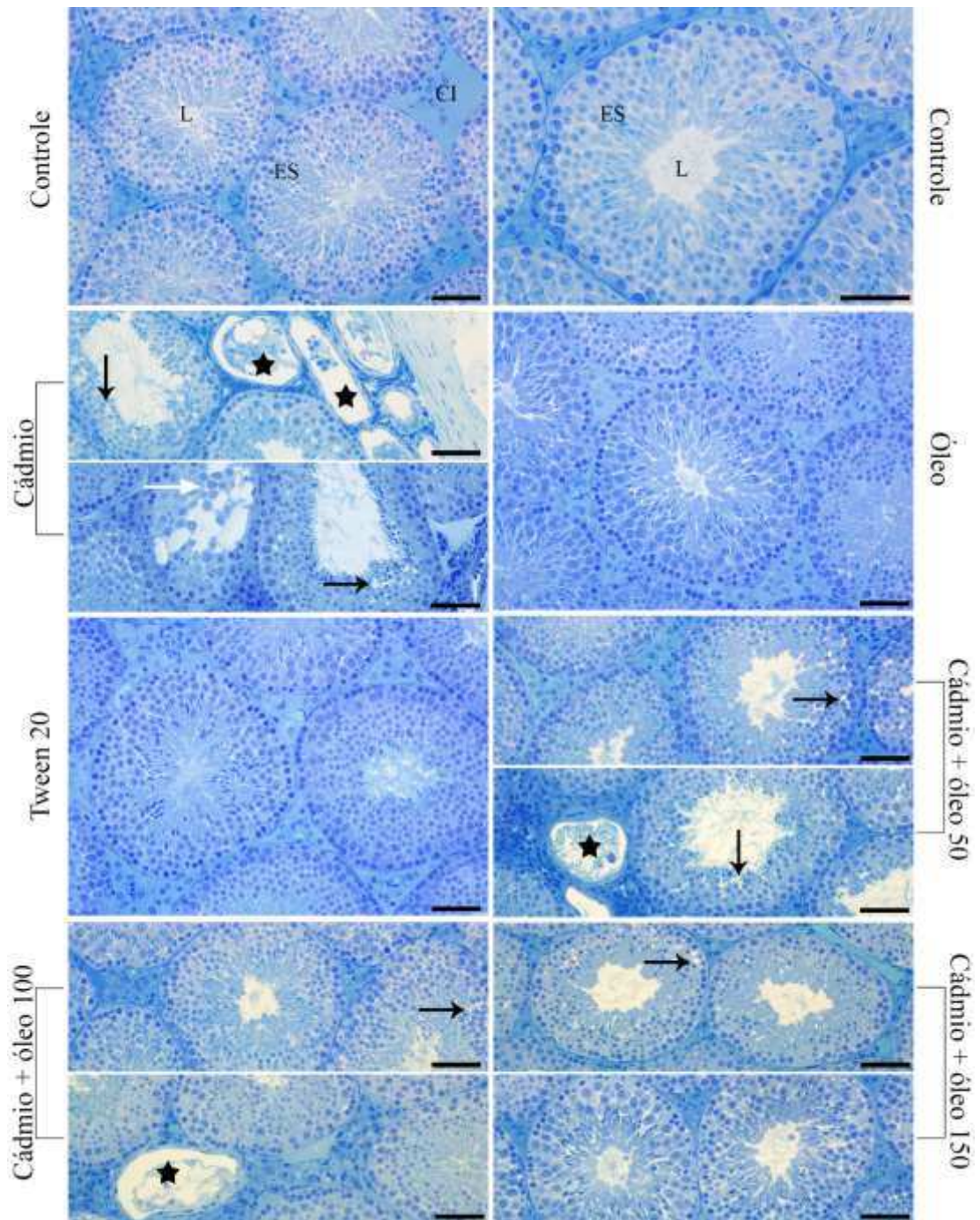


Figura 2. Fotomicrografias testiculares de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo *E. oleracea*. Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg; ES = Epitélio Seminífero; L = Lúmen; CI = Compartimento Intertubular; Setas pretas = Vacuolização; Seta Branca = Desprendimento do epitélio; Estrela = Túbulos seminíferos com ausência de células de germinativas e/ou Sertoli. Azul de Toluidina. Barras = 50 μ m.

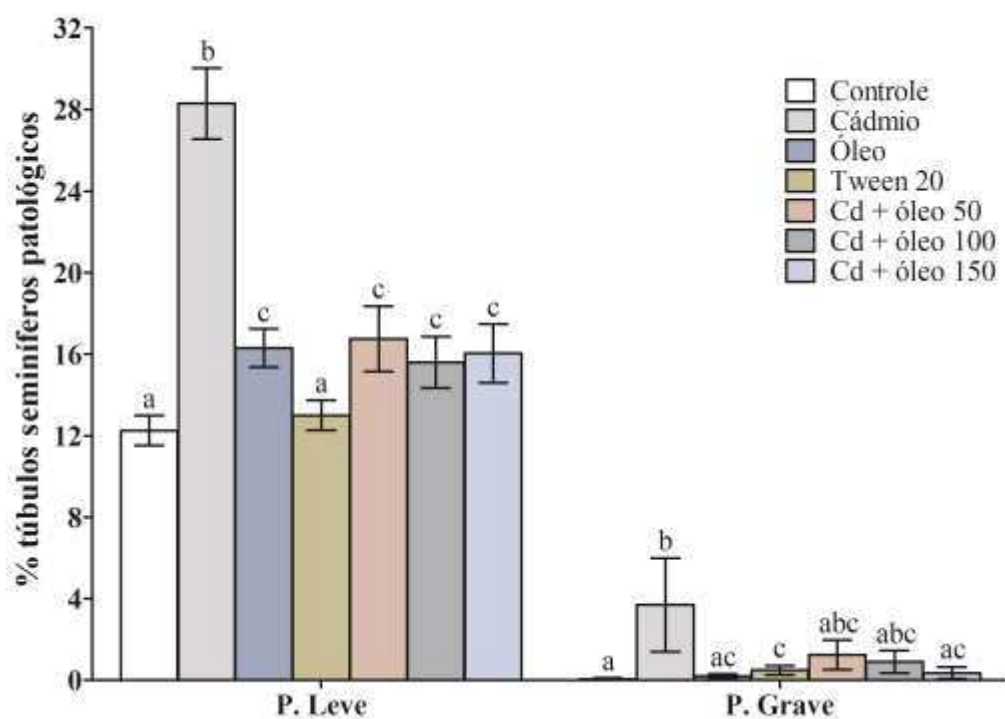


Figura 3. Quantificação de túbulos com patologias de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *E. oleracea*. Cd= Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg.^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

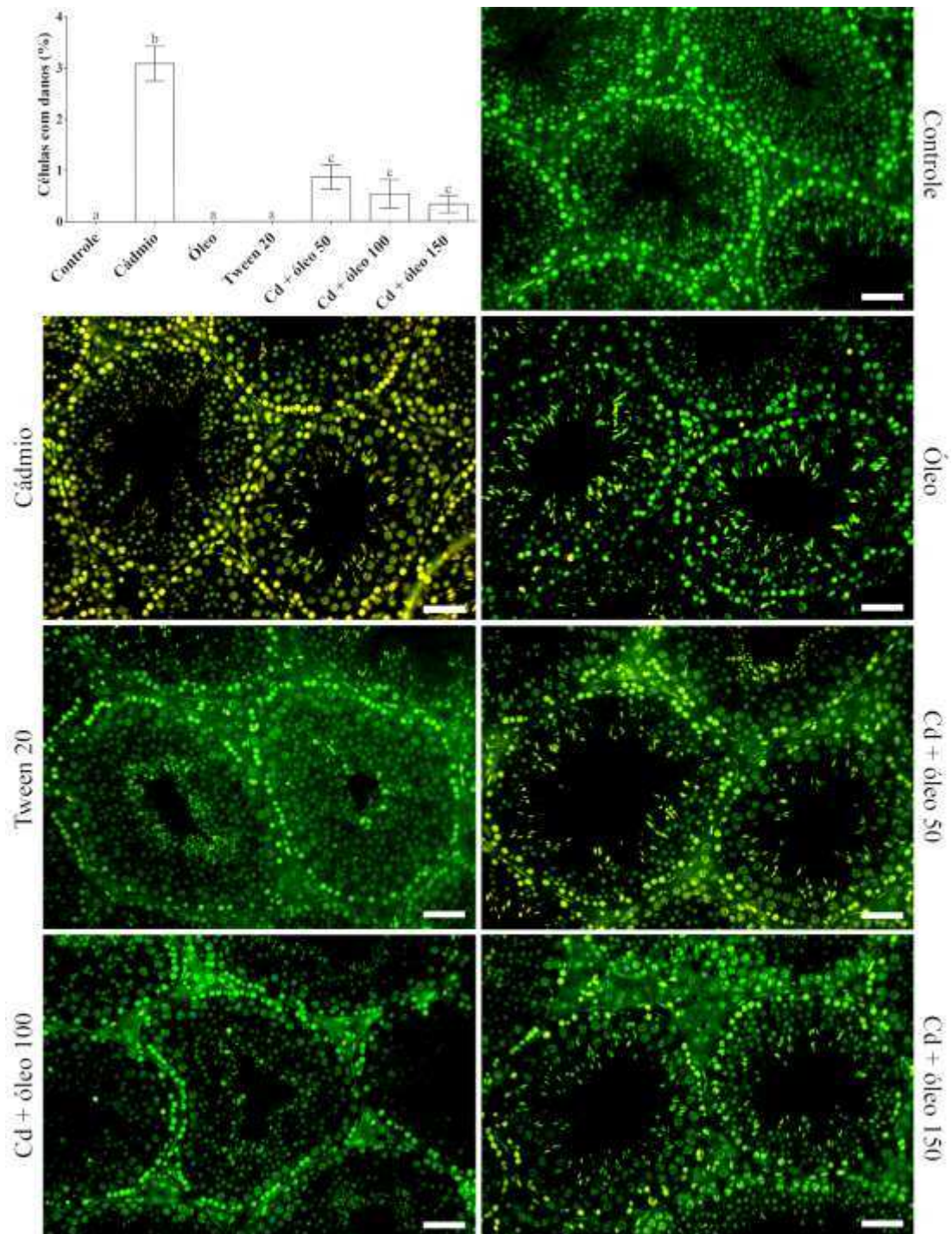


Figura 4. Viabilidade celular testicular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *E. oleracea*. Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$). Barras = 50 μm .

Histomorfometria testicular

O percentual de túnica própria reduziu nos animais que receberam somente Cd e nos animais intoxicados com Cd e tratados com 50 mg/Kg de Óleo (Tabela 3). A intoxicação com Cd levou ao aumento no diâmetro e área luminal e, após o tratamento com óleo, os valores para estes parâmetros normalizaram. A altura de epitélio reduziu nos animais expostos somente ao Cd em comparação ao controle, enquanto que o tratamento com óleo atenuou esta alteração. A relação túbulo epitélio aumentou nos animais intoxicados com Cd (Tabela 4).

O percentual de citoplasma de Leydig e de células de Leydig reduziu nos animais que receberam somente Cd e naqueles intoxicados tratados com óleo 100 e 150 mg/Kg em comparação com controle. Além disso, o percentual de citoplasma reduziu nos animais que receberam Tween 20 em comparação ao grupo controle (Tabela 5).

Na estereologia das células de Leydig, a intoxicação com Cd levou à redução no diâmetro nuclear e no volume nuclear, sendo que o tratamento com Óleo reverteu esta alteração, apresentando valores semelhantes ao grupo controle. O volume citoplasmático e o volume celular reduziram frente à intoxicação pelo Cd somente quando comparados ao controle. Para estes parâmetros, o tratamento com óleo, apesar de apresentar semelhança com o controle, não diferiu do Cd nem do veículo Tween 20 (Tabela 6). Como não houve alterações na histologia testicular e na concentração sérica de testosterona nos animais que receberam Tween 20, estes não foram utilizados para as análises de conteúdo mineral e estresse oxidativo.

Concentração sérica de testosterona

A concentração sérica de testosterona reduziu nos animais que receberam somente Cd, com aumento significativo dos valores nos grupos tratados com óleo após intoxicação (Figura 5). No entanto, os valores para o hormônio foram menores nos animais em que foi ofertado óleo na dose de 100 mg/Kg em relação ao controle, óleo, veículo e óleo 50 e 150 mg/Kg. No tratamento com óleo 150 mg/kg após intoxicação com Cd, a concentração sérica de testosterona aumentou em relação a todos os grupos experimentais (Figura 5).

Tabela 3. Proporção volumétrica tubular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *Euterpe oleracea*..

| | Controle | Cd | Óleo | Tween 20 | Cd + Óleo 50 | Cd + Óleo 100 | Cd + Óleo 150 |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Túbulo (%) | 86,48 ± 1,02 | 88,38 ± 1,66 | 87,22 ± 1,27 | 88,20 ± 0,46 | 87,57 ± 1,35 | 88,11 ± 0,72 | 87,92 ± 2,29 |
| Intertúbulo (%) | 13,56 ± 1,02 | 11,62 ± 1,66 | 12,78 ± 1,27 | 11,80 ± 0,46 | 12,43 ± 1,35 | 11,89 ± 0,72 | 12,08 ± 2,29 |
| Epitélio (%) | 59,83 ± 1,59 | 63,29 ± 2,83 | 62,27 ± 2,35 | 61,23 ± 2,18 | 61,33 ± 2,82 | 60,74 ± 2,94 | 60,92 ± 2,72 |
| Túnica (%) | 11,47 ± 0,74 ^a | 9,84 ± 0,32 ^b | 10,79 ± 1,05 ^{ab} | 11,00 ± 0,73 ^a | 10,01 ± 0,51 ^b | 11,09 ± 0,60 ^a | 11,38 ± 0,76 ^a |
| Lúmen (%) | 15,14 ± 0,60 | 15,25 ± 2,17 | 14,15 ± 1,43 | 15,97 ± 1,94 | 16,23 ± 2,60 | 16,28 ± 3,04 | 15,62 ± 0,58 |
| ITS (%) | 0,40 ± 0,07 | 0,41 ± 0,03 | 0,41 ± 0,09 | 0,39 ± 0,05 | 0,40 ± 0,02 | 0,46 ± 0,05 | 0,39 ± 0,09 |
| IES (%) | 0,28 ± 0,05 | 0,29 ± 0,02 | 0,29 ± 0,07 | 0,27 ± 0,04 | 0,28 ± 0,01 | 0,31 ± 0,02 | 0,27 ± 0,06 |

Média ± desvio-padrão. Óleo = Óleo de *Euterpe oleracea*; ITS = Índice tubulossomático; IES = Índice epiteliossomático; Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Student Newman Keuls (p≤0,05).

Tabela 4. Morfometria e estereologia tubular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *Euterpe oleracea*.

| | Controle | Cd | Óleo | Tween 20 | Cd + Óleo 50 | Cd + Óleo 100 | Cd + Óleo 150 |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Túbulo (mL) | 0,16 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 0,17 ± 0,03 | 0,16 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 0,18 ± 0,01 | 0,16 ± 0,04 |
| Intertúbulo (mL) | 0,025 ± 0,002 | 0,022 ± 0,005 | 0,025 ± 0,006 | 0,021 ± 0,003 | 0,025 ± 0,005 | 0,024 ± 0,001 | 0,021 ± 0,003 |
| Epitélio (mL) | 0,11 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 | 0,11 ± 0,02 | 0,12 ± 0,02 | 0,12 ± 0,01 | 0,11 ± 0,03 |
| Túnica (mL) | 0,021 ± 0,0002 | 0,019 ± 0,003 | 0,020 ± 0,004 | 0,020 ± 0,003 | 0,020 ± 0,002 | 0,022 ± 0,002 | 0,020 ± 0,003 |
| Lúmen (mL) | 0,028 ± 0,03 | 0,029 ± 0,006 | 0,027 ± 0,006 | 0,029 ± 0,004 | 0,032 ± 0,004 | 0,033 ± 0,008 | 0,028 ± 0,006 |
| DT (µm) | 233,92 ± 6,55 | 226,88 ± 10,66 | 220,46 ± 16,75 | 218,77 ± 15,23 | 225,92 ± 13,67 | 235,18 ± 12,85 | 219,47 ± 7,18 |
| DL (µm) | 60,76 ± 7,03 ^a | 76,94 ± 4,96 ^b | 64,18 ± 6,77 ^a | 61,74 ± 3,71 ^a | 66,72 ± 8,62 ^a | 68,95 ± 8,85 ^a | 58,78 ± 6,93 ^a |
| AE (µm) | 173,17 ± 5,95 ^a | 149,94 ± 9,38 ^b | 156,28 ± 20,16 ^{ab} | 157,03 ± 14,51 ^{ab} | 159,20 ± 16,54 ^{ab} | 166,23 ± 15,93 ^{ab} | 160,70 ± 7,14 ^{ab} |
| ArT (mm ²) | 0,0430 ± 0,0024 | 0,0405 ± 0,0039 | 0,0383 ± 0,0060 | 0,0377 ± 0,0052 | 0,0402 ± 0,0049 | 0,0435 ± 0,0048 | 0,0378 ± 0,0024 |
| ArL (mm ²) | 0,0029 ± 0,0007 ^a | 0,0047 ± 0,0006 ^b | 0,0033 ± 0,0007 ^a | 0,0030 ± 0,0004 ^a | 0,0035 ± 0,0009 ^a | 0,0038 ± 0,0009 ^a | 0,0027 ± 0,0006 ^a |
| ArE (mm ²) | 0,0401 ± 0,0021 | 0,0358 ± 0,0036 | 0,0351 ± 0,0062 | 0,0347 ± 0,0052 | 0,0366 ± 0,0050 | 0,0397 ± 0,0049 | 0,0351 ± 0,0022 |
| RTE | 1,07 ± 0,02 ^a | 1,13 ± 0,02 ^b | 1,10 ± 0,03 ^a | 1,09 ± 0,01 ^a | 1,10 ± 0,03 ^a | 1,10 ± 0,03 ^a | 1,08 ± 0,02 ^a |
| CT/T (m) | 3,72 ± 0,44 | 4,22 ± 0,79 | 4,44 ± 1,17 | 4,27 ± 0,49 | 4,38 ± 0,61 | 4,09 ± 0,51 | 4,17 ± 0,71 |
| CT/gT (m/g) | 18,98 ± 1,37 | 20,78 ± 2,07 | 21,97 ± 3,25 | 22,52 ± 3,10 | 20,76 ± 2,48 | 19,21 ± 2,30 | 21,81 ± 1,08 |

Média ± desvio-padrão. Óleo = Óleo de *Euterpe oleracea*; DT = Diâmetro tubular; DL = Diâmetro luminal; AE = Altura de epitélio; ArT = Área de túbulo; ArL = Área de lúmen; ArE = Área de epitélio; RTE = Relação túbulo epitélio; CT/T = Comprimento de túbulo seminífero nos testículos; CT/gT = Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo; Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Student Newman Keuls (p≤0,05).

Tabela 5. Proporção volumétrica e volume dos elementos do compartimento intertubular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com Óleo de *Euterpe oleracea*.

| | Controle | Cd | Óleo | Tween 20 | Cd + Óleo 50 | Cd + Óleo 100 | Cd + Óleo 150 |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Percentual no testículo (%)</i> | | | | | | | |
| Tecido conjuntivo | 1,00 ± 0,26 | 1,00 ± 0,30 | 1,27 ± 0,42 | 1,08 ± 0,33 | 1,13 ± 0,27 | 1,18 ± 0,39 | 1,26 ± 0,53 |
| Espaço linfático | 1,27 ± 0,45 | 1,13 ± 0,39 | 1,50 ± 0,39 | 1,28 ± 0,64 | 0,89 ± 0,23 | 1,67 ± 1,02 | 1,80 ± 0,62 |
| Vaso sanguíneo | 1,74 ± 0,28 | 1,59 ± 0,43 | 1,57 ± 0,48 | 1,61 ± 0,43 | 1,60 ± 0,44 | 1,47 ± 0,36 | 1,42 ± 0,75 |
| Macrófago | 0,32 ± 0,27 | 0,41 ± 0,18 | 0,33 ± 0,18 | 0,15 ± 0,11 | 0,45 ± 0,17 | 0,36 ± 0,16 | 0,26 ± 0,08 |
| Citoplasma de Leydig | 7,62 ± 0,51 ^a | 6,09 ± 1,15 ^b | 6,56 ± 0,91 ^{ab} | 6,19 ± 0,72 ^b | 6,74 ± 0,70 ^{ab} | 5,84 ± 0,91 ^b | 5,86 ± 0,80 ^b |
| Núcleo de Leydig | 1,62 ± 0,16 | 1,40 ± 0,26 | 1,55 ± 0,34 | 1,50 ± 0,23 | 1,62 ± 0,27 | 1,37 ± 0,34 | 1,48 ± 0,28 |
| Leydig | 9,23 ± 0,63 ^a | 7,49 ± 1,38 ^b | 8,11 ± 1,18 ^{ab} | 7,69 ± 0,88 ^{ab} | 8,36 ± 0,75 ^{ab} | 7,21 ± 1,22 ^b | 7,34 ± 1,07 ^b |
| <i>Volume por testículo (mL)</i> | | | | | | | |
| Tecido conjuntivo | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 |
| Espaço linfático | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,003 ± 0,002 | 0,003 ± 0,001 |
| Vaso sanguíneo | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 |
| Macrófago | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 |
| Citoplasma de Leydig | 0,014 ± 0,001 | 0,012 ± 0,003 | 0,013 ± 0,003 | 0,011 ± 0,002 | 0,014 ± 0,003 | 0,012 ± 0,002 | 0,010 ± 0,002 |
| Núcleo de Leydig | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 |
| Leydig | 0,017 ± 0,001 | 0,014 ± 0,004 | 0,016 ± 0,004 | 0,014 ± 0,003 | 0,017 ± 0,003 | 0,014 ± 0,002 | 0,013 ± 0,002 |

Média ± desvio-padrão. Óleo = Óleo de *Euterpe oleracea*; Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Tabela 6.Estereologia das células de Leydig em camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *Euterpe oleracea*..

| | Controle | Cd | Óleo | Tween 20 | Cd + Óleo 50 | Cd + Óleo 100 | Cd + Óleo 150 |
|---|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Diâmetro nuclear (μm) | 4,87 \pm 0,15 ^a | 4,47 \pm 0,14 ^b | 4,86 \pm 0,16 ^a | 4,88 \pm 0,12 ^a | 4,90 \pm 0,11 ^a | 4,77 \pm 0,16 ^a | 4,83 \pm 0,09 ^a |
| ILS (%) | 0,04 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 |
| Volume nuclear (μm^3) | 60,71 \pm 5,59 ^a | 46,99 \pm 4,67 ^b | 60,16 \pm 5,92 ^a | 60,80 \pm 4,59 ^a | 61,61 \pm 4,08 ^a | 56,84 \pm 5,41 ^a | 59,05 \pm 3,23 ^a |
| Volume citoplasmático (μm^3) | 288,85 \pm 43,98 ^a | 206,21 \pm 32,40 ^b | 258,72 \pm 36,13 ^{ab} | 252,60 \pm 36,73 ^{ab} | 264,00 \pm 62,40 ^{ab} | 248,89 \pm 36,67 ^{ab} | 235,59 \pm 10,68 ^{ab} |
| Volume celular (μm^3) | 349,56 \pm 49,18 ^a | 253,20 \pm 36,27 ^b | 318,89 \pm 38,66 ^{ab} | 313,40 \pm 39,40 ^{ab} | 325,61 \pm 66,44 ^{ab} | 305,72 \pm 38,53 ^{ab} | 294,64 \pm 11,73 ^{ab} |
| Volume Leydig/T (mL) | 0,017 \pm 0,001 | 0,014 \pm 0,004 | 0,016 \pm 0,004 | 0,014 \pm 0,003 | 0,017 \pm 0,003 | 0,014 \pm 0,002 | 0,013 \pm 0,002 |
| Volume Leydig/g T (mL) | 0,09 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 |
| N células Leydig/T ($\times 10^6$) | 49,26 \pm 7,23 | 56,15 \pm 8,06 | 49,34 \pm 14,09 | 45,24 \pm 10,30 | 53,09 \pm 15,05 | 47,73 \pm 9,87 | 44,16 \pm 6,39 |
| N células Leydig/g T ($\times 10^6$) | 253,12 \pm 38,02 | 279,82 \pm 37,23 | 242,95 \pm 40,87 | 234,33 \pm 29,97 | 249,37 \pm 53,14 | 226,10 \pm 51,27 | 234,11 \pm 38,92 |

Média \pm desvio-padrão. Óleo = Óleo de *Euterpe oleracea*; Volume Leydig/T = Volume de células de Leydig nos testículos; Volume Leydig/g T = Volume de células de Leydig por grama de testículo; N células Leydig/T = Número de células de Leydig nos testículos; N células Leydig/g T = Número de células de Leydig por grama de testículo; ILS = Índice Leydigossomático; Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

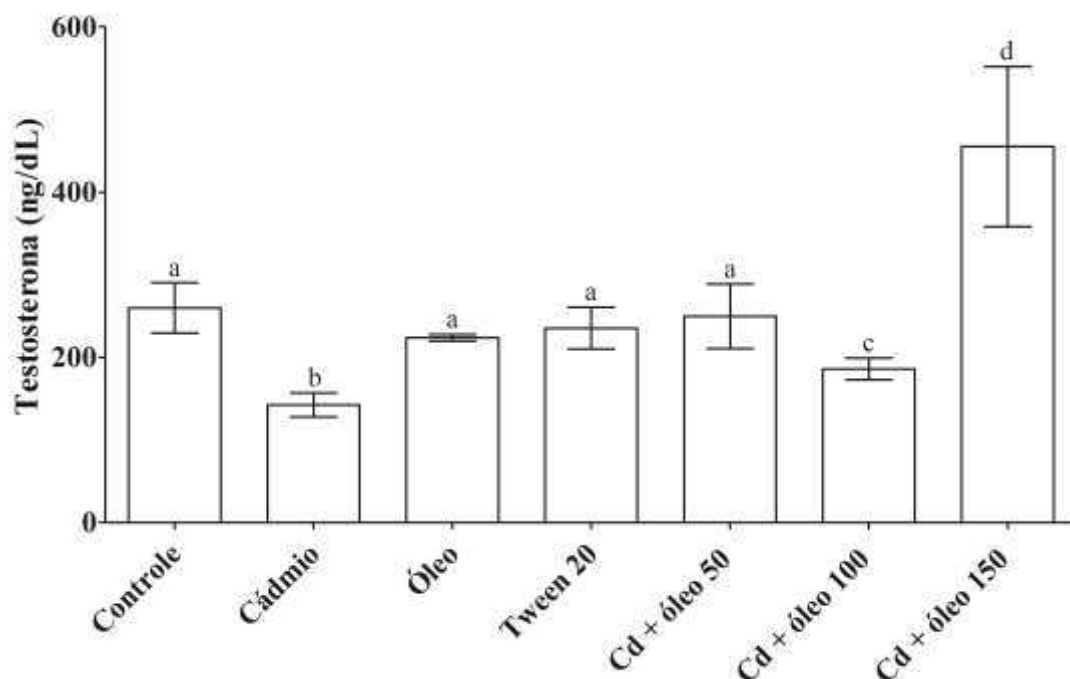


Figura 5. Concentração sérica de testosterona de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *Euterpe oleracea*. Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg.^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Bioacúmulo de Cd e dosagem de minerais essenciais

A concentração de Mg testicular aumentou nos animais que receberam somente óleo em relação àqueles que receberam somente Cd, enquanto que a concentração de Cu reduziu nos grupos tratados com óleo após intoxicação com Cd em relação ao grupo controle e óleo. A concentração de Mn reduziu nos animais que receberam somente Cd e naqueles tratados com 100 mg/Kg de óleo em relação aos demais grupos experimentais, enquanto o Zn reduziu nos animais intoxicados com Cd comparado aos animais controle (Figura 6).

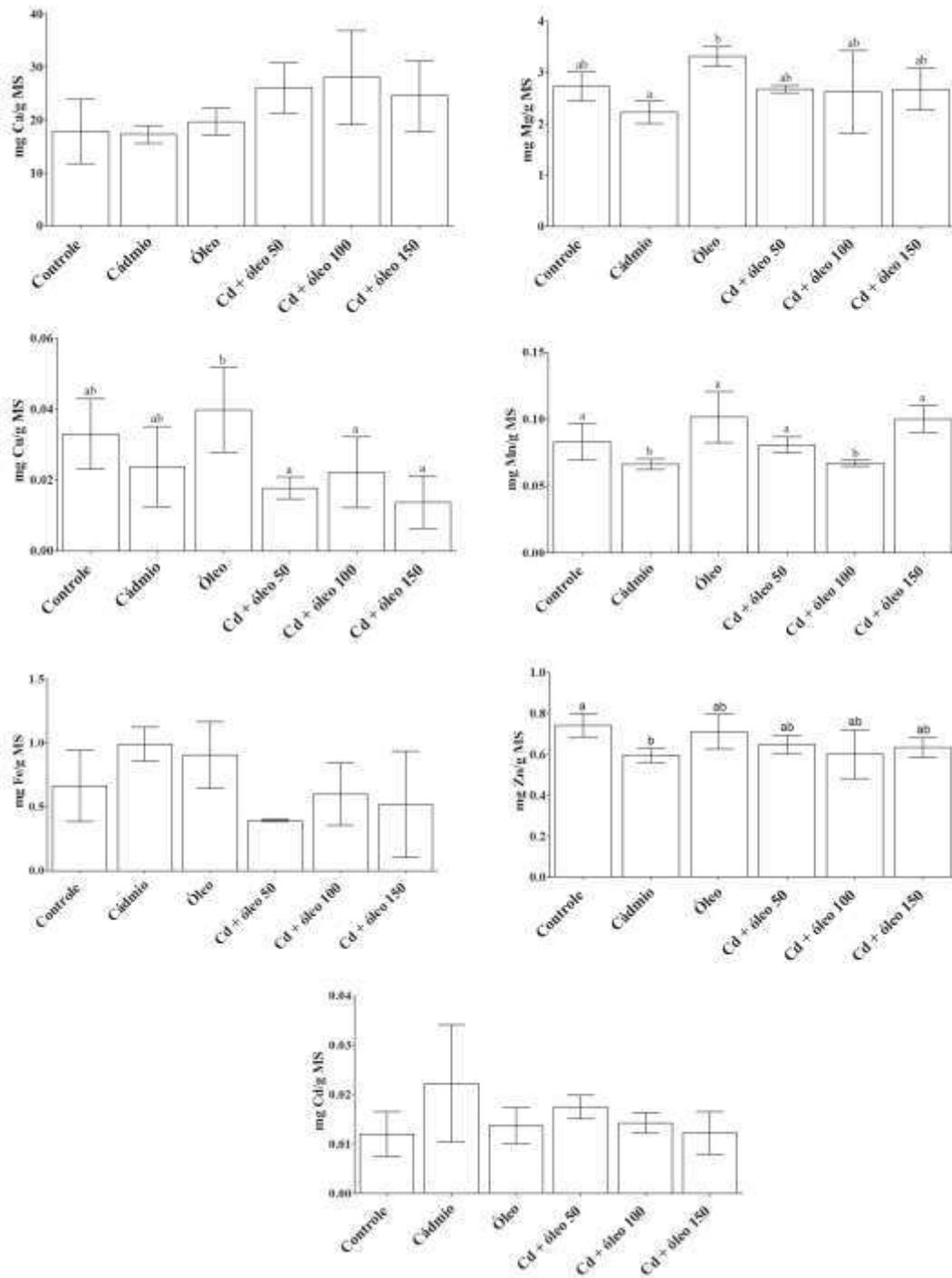


Figura 6. Concentração de cádmio e minerais essenciais testiculares de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *E. oleracea*. Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg. Zn = Zinco; Cu = Cobre; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; Fe = Ferro; Mn = Manganês; MS = Massa Seca de testículo. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Estresse oxidativo

O tratamento com óleo 150 mg/Kg após intoxicação pelo Cd aumentou a atividade de SOD que foi reduzida pelo metal. A atividade de CAT reduziu nos animais expostos Cd e não tratados com óleo em relação ao controle. A concentração de MDA aumentou nos animais que receberam óleo em relação aos tratamentos com Óleo 50 e 100 mg/Kg. A atividade da glutathiona reduziu nos animais intoxicados com Cd e tratados com óleo 100 mg/Kg comparados aos demais grupos experimentais. O NO aumentou nos animais que receberam Cd e tratados com Óleo 50 mg/Kg em relação ao controle e tratados com óleo 150 mg/Kg após intoxicação com Cd (Figura 7).

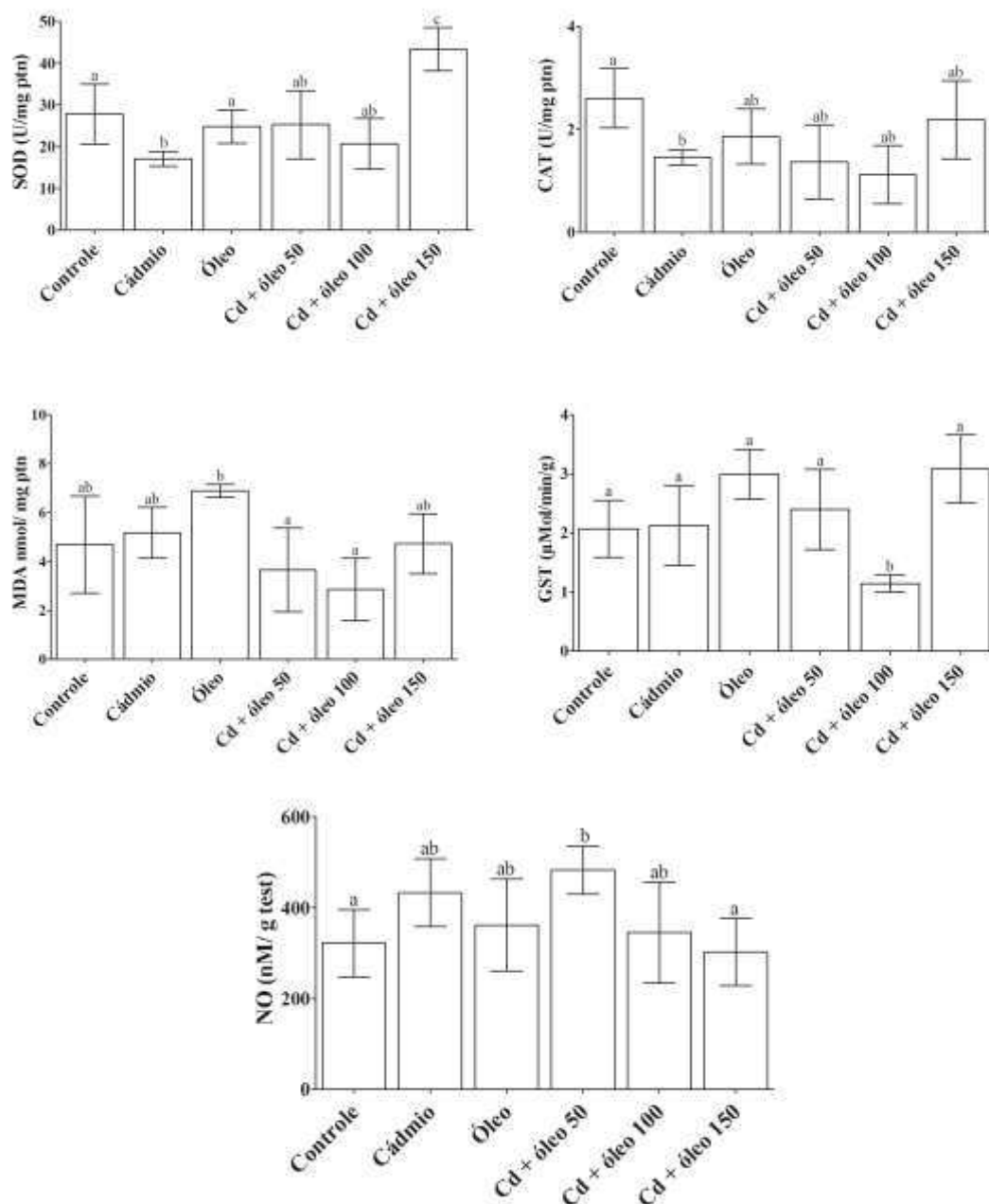


Figura 7. Atividade de enzimas antioxidantes, concentração de malondialdeído e de óxido nítrico testicular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *E. oleracea*. Cd = Cádmio; Óleo 50, 100 e 150 = óleo de *E. oleracea* em mg/Kg; SOD = Superóxido dismutase; CAT = Catalase; GST = Glutathione S-transferase; MDA = Malondialdeído; NO = Óxido nítrico. ^{ab}Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Discussão

A análise do óleo permitiu verificar a presença predominante de ácidos graxos insaturados como o monoinsaturado oleico (ômega-9), seguido do poli-insaturado linoleico (ômega-6), e menor quantidade de ácidos graxos saturados como o palmítico, estando consistente com os dados da literatura (Schauss et al., 2016; Souza et al., 2017). Sabe-se que os ácidos graxos apresentam ação antioxidante protegendo as células da peroxidação lipídica, além de reduzirem a geração de EROs (Kim et al., 2010). Assim, a maior proporção de ácidos graxos insaturados demonstra que este óleo apresenta-se adequado para consumo humano (Freitas et al., 2016). É conhecido que o óleo de açaí apresenta, além de ácidos graxos, vitamina E na sua composição (Souza et al., 2012), e que esta também possui ação antioxidante (Ognjanovi'c et al., 2010). No entanto sua dosagem não foi realizada no presente estudo.

O Cd apresenta capacidade de romper a barreira hematotesticular (Minutoli et al., 2015) o que leva à descamação e perda do epitélio germinativo (Predes et al., 2010; Cupertino et al., 2017). Assim, foi observado nos animais onde houve a intoxicação aguda por Cd aumento na proporção de células com danos, extensa vacuolização, desprendimento de células germinativas e desorganização do epitélio germinativo, associado à redução na altura de epitélio e aumento no diâmetro luminal, área de lúmen e RTE.

Após o tratamento com o óleo de *E. oleracea* foi observada redução na intensidade de danos causados no epitélio germinativo, apesar destes ainda serem encontrados em maior proporção em relação ao controle. A maior ocorrência de patologias graves, nos animais intoxicados e tratados com o óleo, pode ser devido a danos irreversíveis causados pelo Cd, como ausência de células germinativas nos túbulos seminíferos, os quais não apresentaram capacidade de recuperação, mesmo com o tratamento. No entanto, a recuperação nos parâmetros morfométricos tubulares, associados à redução no percentual de células com danos nos animais tratados com óleo de *E. oleracea* pode ser indicativo de sua atividade curativa. A ausência de alterações na histologia e viabilidade celular nos animais que receberam o Tween 20 evidencia a inocuidade do veículo, sendo possível atribuir os resultados à ação do óleo nos parâmetros testiculares recuperados.

Observa-se que após o tratamento com óleo de *E. oleracea* houve normalização dos parâmetros de Leydig, associado ao aumento na concentração sérica de testosterona, ambos alterados pelo Cd. Como as células de Leydig atuam na síntese de testosterona e fornecem suporte para as células de Sertoli na manutenção da espermatogênese, sugere-se que a recuperação nos parâmetros tubulares encontrados após o tratamento com óleo de *E. oleracea* ocorreu devido à recuperação na função das células de Leydig. Adaramoye e Akanni (2016) observaram redução no colesterol testicular e na concentração sérica de testosterona de ratos expostos ao Cd e recuperação destes parâmetros após o tratamento com extrato metanólico de *Artocarpus altilis*.

Sabe-se que os ácidos graxos fazem parte da composição dos lipídios de membrana, além de levarem à formação de Acetil-CoA por meio da β -oxidação, onde inicia a síntese de colesterol (Nelson e Cox, 2014). Dessa forma, a ingestão de ácidos graxos pode favorecer a produção endógena de colesterol e, conseqüentemente, aumento da concentração testicular deste esteroide e da testosterona. Além disso, o ácido linoleico é considerado um ácido graxo essencial, precursor na síntese de ácido araquidônico. Este último é importante no transporte do colesterol para a membrana mitocondrial. Assim, nas células de Leydig esse mecanismo também pode favorecer a síntese de testosterona (Manna et al., 2009). Deste modo, a recuperação na arquitetura tubular, nas células de Leydig e na concentração sérica de testosterona observadas nos animais tratados com óleo evidencia a ação antioxidante de caráter regenerativo frente às alterações causadas pelo Cd.

A recuperação na arquitetura tecidual testicular associada ao aumento da concentração sérica de testosterona em animais intoxicados com Cd e tratados com antioxidantes foi evidenciada em outros trabalhos. Destaca-se aqui o uso da suspensão de grãos de pólen de *Phoenix dactylifera* (El-Neweshy et al., 2013), bem como a administração oral de extrato aquoso das folhas de *Ocimum basilicum* (Sakr e Nooh, 2013). Predes et al. (2011) também verificaram recuperação nos parâmetros de células de Leydig em ratos tratados com *Ginkgo biloba*. No entanto, Predes et al. (2016) verificaram que o extrato das raízes de *Arctium lappa* foi ineficaz contra os danos testiculares e epididimários induzidos pelo Cd.

Acharya et al. (2008), ao intoxicarem camundongos Swiss com Cd e tratá-los com vitamina E, observaram redução da peroxidação lipídica e das anormalidades espermáticas, o que causou aumento na concentração espermática. Do mesmo modo, Mandil et al. (2016) relataram aumento na concentração de testosterona em ratos Wistar intoxicados com sulfato de cobre e tratados com α -tocoferol. Portanto, como na literatura é relatada a presença de vitamina E na composição do óleo, sugere-se que este componente também possa ter atuado nas células de Leydig reduzindo a peroxidação lipídica com consequente ação antioxidante, provavelmente contribuindo para o aumento na síntese de testosterona.

A elevação na concentração de Mg nos animais que receberam óleo de *E. oleracea* evidencia a ausência de genotoxicidade do produto, assim como relatado por Marques et al. (2016), uma vez que este elemento é conhecido por ter ação na estabilização da estrutura de ácidos nucleicos (Romani, 2013).

A competição do Cd com minerais essenciais e a consequente redução destes já é conhecida na literatura (Cupertino et al., 2017). Sabe-se que Zn, Cu e Mn são importantes cofatores de SOD (Djuric et al., 2015). Portanto, a redução na concentração de Mn e Zn dos animais que receberam somente Cd, pode estar relacionada à menor atividade de SOD nestes animais. O aumento na atividade desta enzima nos camundongos tratados com 150 mg/Kg de óleo de *E. oleracea* pode ser devido à maior atividade antioxidante do óleo nesta concentração, atuando na eliminação de radicais superóxidos.

A redução na atividade de CAT encontrada nos animais que receberam Cd e não tratados com óleo evidencia a indução do estresse oxidativo nestes animais causado pelo metal. O mesmo foi observado por Acharya et al. (2008), em camundongos que receberam 1 mg/Kg de CdCl₂ intraperitoneal dose única e avaliados após oito semanas. Os mesmo autores verificaram que o tratamento com vitamina C ou E elevou a atividade da enzima.

A peroxidação lipídica é uma das vias de toxicidade do Cd (Erboga et al., 2015), entretanto, neste estudo não foi observado aumento de lipídios peroxidados após intoxicação com o metal, assim como pela ingestão de óleo. A GST apresenta importante função na destoxificação de lipídios peroxidados (Aitken e Roman, 2008), como não foi observada peroxidação lipídica, a atividade da enzima não foi prejudicada pelos tratamentos. No entanto, animais intoxicados com Cd e

posteriormente tratados com 100 mg/Kg de óleo de *E. oleracea* apresentarem menor atividade desta enzima, o que pode estar relacionado a menor concentração de MDA nestes animais.

Aumento na concentração de NO pode estar relacionado à morte de células germinativas (Sonmez e Tascioglu, 2016). Assim, a maior concentração de NO encontrada nos animais intoxicados com Cd e tratados com 50 mg/Kg de óleo de *E. oleracea*, pode estar relacionada à maior proporção de células com danos nestes animais. Entretanto, túbulos patológicos também foram observados nos demais animais expostos ao Cd onde não houve aumento de NO. Dessa forma, a alteração na concentração de NO provavelmente não é o único fator relacionado aos danos teciduais encontrados, e o estresse oxidativo também pode ser uma das causas. Assim, a exposição ao Cd levou a alterações testiculares e o tratamento com óleo de *E. oleracea* reestabeleceu os parâmetros alterados pelo metal, demonstrando ação antioxidante (Figura 8).

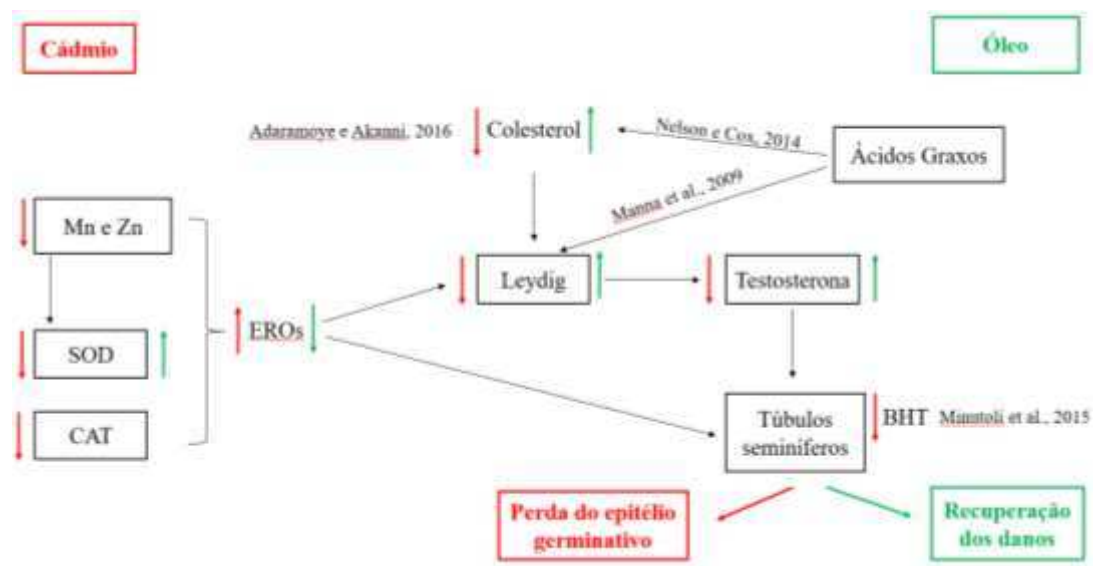


Figura 8. Vias de recuperação pelo tratamento com óleo de *Euterpe oleracea* nos parâmetros testiculares de camundongos alterados pelo cádmio.

Conclusões

O tratamento com óleo de *E. oleracea* apresenta atividade antioxidante testicular contra os danos induzidos pelo Cd. Redução do percentual de túbulos

patológicos e de células germinativas em processo de morte celular, associada à recuperação nos parâmetros de células de Leydig e ao aumento na concentração sérica de testosterona foram observados após o tratamento com óleo, principalmente na dose de 150 mg/Kg, assim como recuperação da concentração testicular de Mn e Zn e aumento na atividade de SOD e CAT. Dessa forma, conclui-se que o óleo de *E. oleracea* apresentou efeito regenerativo frente às alterações testiculares induzidas pelo Cd, sendo este observado em maior intensidade nos animais que receberam tratamento com 150 mg/Kg de óleo.

Referências

Acharya, U. R.; Mishra, M.; Patro, J.; Panda, M. K. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. **Reproductive Toxicology**, 25, 84–88, 2008.

Adaramoye, O. A.; Akanni, O. O. Protective effects of *Artocarpus altilis* (Moraceae) on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. **Andrologia**, 48(2), 152–163, 2016.

Amann, R. P. Sperm production rates. In: Johnson, A. D.; Gomes, W.R. The testis. New York: Academic Press, 1970.

Aitken, R. J.; Roman, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1, 15-24, 2008.

Arafa, M. H.; Mohammad, N. S.; Atteia, H. H. Fenugreek seed powder mitigates cadmium-induced testicular damage and hepatotoxicity in male rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 66, 293–300, 2014.

Attal, J.; Courot, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, 3, 219–241, 1963.

Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52, 302–310, 1978.

Cupertino, M. C.; Novaes, R. D.; Santos, E. C.; Bastos, D. S. S.; Santos, D. C. M.; Fialho, M. C, Q.; Matta, S. L. P. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. **Life Sciences**, 15, 23–30, 2017.

Cupertino, M. C.; Novaes, R. D.; Santos, E. C.; Neves, A. C.; Silva, E.; Oliveira, J. A.; Matta, S.L.P. Differential susceptibility of germ and Leydig cells to cadmium-mediated toxicity: Impact on testis structure, adiponectin levels and steroidogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1-11, 2018. DOI:.org/10.1155/2017/3405089

Dieterich, S.; Bielgk, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, 101(1), 33-39, 2000.

Djuric, A.; Begic, A.; Gobeljic, B.; Stanojevic, I.; Ninkovic, M.; Vojvodic, D.; Pantelic A.; Zebic, G.; Prokic, V.; Gejanovic, B.; Stojanovic, I.; Pavlica, M.; Djukic, D.; Saso, L.; Djurdjevic, D.; Pavlovic, M.; Topic, A.; Vujanovic, D.; Stevnovic, I.; Djukic, M. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. **Food and Chemical Toxicology**, 86, 25–33, 2015.

Erboga, M.; Kanter, M.; Aktas, C.; Bozdemir, Y. B.; Erboga, Z. F.; Aktas, E.; Gurel, A. Anti-apoptotic and anti-oxidant effects of caffeic acid phenethyl ester on cadmium-induced testicular toxicity in rats. **Biological Trace Element Research**, 171(1), 176-184, 2015.

El-Neweshy, M. S.; El-Maddawy, Z. K.; El-Sayed, Y. S. Therapeutic effects of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pollen extract on cadmium-induced testicular toxicity. **Andrologia**, 45, 369–378, 2013.

França, L. R.; Russell, L. D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J (Eds). Male reproduction - a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications. 1998. pp. 198-219.

Freitas, R. B.; Novaes, R. D.; Gonçalves, R. V.; Mendonça, B. G.; Santos, E. C.; Ribeiro, A. Q.; Lima, L. M.; Fietto, L. G.; Peluzio, M. C. G.; Leite, J. P. V. *Euterpe edulis* Extract but Not Oil Enhances Antioxidant Defenses and Protects against Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by a High-Fat Diet in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1-9, 2016. DOI: 10.1155/2016/8173876

Gao, P.; Liu, S.; Ye, W.; Lin, N.; Meng, P.; Feng, Y.; Zhang, Z.; Cui, F.; Lu, B.; Xing, B. Assessment on the occupational exposure of urban public bus drivers to bioaccessible trace metals through resuspended fraction of settled bus dust. **Science of The Total Environment**, 508C, 37–45, 2014.

Giri, B. R.; Roy, B. *Cysticercus fasciolaris* infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver: a strategy for host-parasite cross talk. **Parasitology Research**, 115(7), 2617-2624, 2016.

Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, 249, 7130–7139, 1974.

Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Andrews, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, 117, 285–297, 2004.

Johnsen, S. G. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 352 hypogonadal males. **Hormones**, 1, 1–24, 1970.

Johnson, L.; Petty, C. S.; Neaves, W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. **Biology of Reproduction**, 25(1), 217-226, 1981

Karnovsky, M. J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 27, 137A, 1965.

Kim, S. J.; Zhang, Z.; Saha A.;Sarkar, C.; Zhao, Z.; Xu ,Y.; Mukherjee, A. B. Omega-3 and Omega-6 fatty acids suppress ER- and oxidative-stress in cultured neurons and neuronal progenitor cells from mice lacking PPT1. **Neuroscience Letters**, 479: 292–296, 2010.

Lamas, C. A.; Gollücke, A. P. B.; Dolder, H. Grape juice concentrate (G8000®) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. **International Journal of Experimental Pathology**, 96(5), 301–310, 2015.

Leite, R. P.; Wada, R. S.; Monteiro, J. C.; Predes, F. S.; Dolder. H. Protective effect of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. **Biological Trace Element Research**, 141(1–3), 262–274, 2011.

Leite, R. P.; Predes, F. S.; Monteiro, J. C.; Freitas, K. M.; Wada, R. S.; Dolder. H. Advantage of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation on cadmium-induced damages in testis of adult Wistar rats. **Toxicologic Pathology**, 41(1), 73–79, 2013.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275, 1951.

Mandil, R.; Rahal, A.; Prakash, A.; Garg, S. K.; Gangwar, N. K.; Swain, D. K. Ameliorative potential of α -tocopherol against flubendiamide and copper-induced testicular-insult in Wistar rats. **Chemico-Biological Interactions**, 260, 91-101, 2016.

Manna, P. R.; Dyson, M. T.; Stocco, D. M. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. **Molecular Human Reproduction**, 15, 321-333, 2009.

Marques, E. S.; Froder, J. G.; Carvalho, J. C. T.; Rosa, P. C. P.; Perazzo, F. F.; Maistro, E. L. Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae) fruit oil (açaí), in mammalian cells in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, 93, 13-19, 2016.

Matta, S. L. P.; Vilela, D. A. R.; Godinho, H. P.; França, L. R. The Goitrogen 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) Givenduring Testis Development Increases Sertoli and GermCell Numbers per Cyst in Fish: The Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. **Endocrinology**, 143(3):970–978, 2002.

Melo, F. C.; Matta, S. L. P.; Paula, T. A.; Gomes, M. L.; Oliveira, L. C. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. **Biological Research**, 43(4), 445–450, 2010.

Menezes, E. M. S.; Torres, A. T.; Srur, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) liofilizada. **Acta Amazonica**, 38, 311–316, 2008.

Minutoli, L.; Micali, A.; Pisani, A.; Puzzolo, D.; Bitto, A.; Rinaldi, M.; Pizzino, G.; Irrera, N.; Galfo, F.; Arena, S.; Pallio, G.; Mecchio, A.; Germana, A.; Bruschetta, D.; Laura, R.; Magno, C.; Marini, H.; Squadrito, F.; Altavilla, D. Research Article Flavocoxid Protects Against Cadmium-Induced Disruption of the Blood-Testis Barrier and Improves Testicular Damage and Germ Cell Impairment in Mice. **Toxicological Sciences**, 148(1), 311–329, 2015.

Mouro, V. G. S.; Menezes, T. P.; Lima, G. D. A.; Domingues, R. R.; Souza, A. C. F.; Oliveira, J. A.; Matta, S. L. P.; Machado-Neves, M. How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? **Biological Trace Element Research**, 1-11, 2017. DOI: 10.1007/s12011-017-1139-3.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6 st. Ed. Porto Alegre: Arthmed, 2014, 1220 pp.

Oberholzer, M.; Östreicher, M.; Christen, H.; Brühlmann, M. Methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and Cell Biology**, 105, 333-355, 1996.

Ognjanovi´c, B. I.; Markovi´c, S. D.; Dordevi´c, N. Z.; Trbojevi´c, I. S.; Stajn, A. S.; Saici´c, Z. S. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. **Reproductive Toxicology**, 29(2), 191–197, 2010.

Pires, V. C.; Gollucke, A. P. B.; Ribeiro, D. A.; Lungato, L.; D’Almeida, V.; Aguiar Jr, O. Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats

against cadmium-induced damage: a chronic assay. **British Journal of Nutrition**, 110, 2020–2029, 2013.

Predes, F. S.; Diamante, M. A. S.; Dolder, H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **International Journal of Experimental Pathology**, 91(2), 125–131, 2010.

Predes, F. S.; Monteiro, J. C.; Matta, S. L. P.; Garcia, M. C.; Dolder, H. Testicular Histomorphometry and Ultrastructure of Rats Treated with Cadmium and *Ginkgo biloba*. **Biological Trace Element Research**, 140, 330–341, 2011.

Predes, F. S.; Diamante, M. A. S.; Foglio, M. A.; Dolder, H. Effects of *Arctium lappa* on cadmium-induced damage to the testis and epididymis of adult Wistar rats. **Biological Trace Element Research**, 173(2), 362–371, 2016.

Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide**, 6, 178–185, 2002.

Romani, A. M. P. Magnesium in Health and Disease. In: Sigel et al. Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences. Springer, 2013. pp. 49 -79.

Russell, L. D.; Ettlin, R. A.; Hikim, A. P. S.; Clegg, E. D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. 1st. ed. Florida: Cache River Press, 1990, p. 1-40.

Ryu, D. Y.; Lee, S. J.; Park, D. W.; Choi, B. S.; Klaassen, C. D.; Park, J. D. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats, **Toxicology Letters**, 152, 19–25, 2004.

Sakr, S. A.; Nooh, H. Z. Effect of *Ocimum basilicum* extract on cadmium-induced testicular histomorphometric and immunohistochemical alterations in albino rats. **Anatomy and Cell Biology**, 46(2), 122-130, 2013.

Sarban, S.; Kocyigit, A.; Yazar, M.; Isikan, U. E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**, 38, 981–986, 2005.

Satarug, S.; Garrett, S. H.; Sens, M. A.; Sens, D. A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Environmental Health Perspectives**, 118, 182–190, 2010.

Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D.; Kababick, J. P. Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 8598-8603, 2006.

Sonmez, M. F.; Tascioglu, S. Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. **Toxicology and Industrial Health**, 32(8), 1486–1494, 2016.

Souza, M. O.; Silva, L. S.; Magalhães, C. L. B.; Figueiredo, B. B.; Costa, D. C.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L. The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition Research**, 32(12), 976–984, 2012.

Souza, B. F. F.; Carvalho, H. O.; Ferreira, I. M.; Cunha, E. L.; Barros, A. S.; Taglialegna, T.; Carvalho, J. C. T. Effect of the treatment with *Euterpe oleracea* Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 90, 542–547, 2017.

Turner, T. T.; Lysiak, J. J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. **Journal of Andrology**, 29(5), 488–498, 2008.

WHO - Exposure to cadmium: A major public health concern. WHO, 2010. <http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf?ua=1>

Wu, X.; Guo, X.; Wang, H.; Zhou, S.; Li, L.; Chen, X.; Wang, G.; Liu, J.; Ge, H-S.; Ge, R-S. A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. **Scientific Reports**, 7(1), 6337. 2017.

Artigo 3

Compostos fenólicos de *Euterpe oleracea* MARTIUS (Açaí) reduzem efeitos tóxicos do cádmio em parâmetros testiculares de camundongos adultos

Resumo

Sabe-se que um dos mecanismos da toxicidade reprodutiva atribuída ao cádmio (Cd) se dá pela geração de espécies reativas de oxigênio. Assim, estudos têm sido realizados buscando antioxidantes naturais que possam atuar contra os efeitos danosos do Cd. Dentre estes tem sido utilizado o fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) que é rico em compostos fenólicos, destacando-se as antocianinas. Dessa forma, objetivou-se verificar se a polpa desengordurada de *E. oleracea* rica em antocianinas (PDRA) apresenta atividade antioxidante frente aos efeitos tóxicos do Cd. Quarenta e dois camundongos Swiss foram obtidos para os ensaios *in vivo*, sendo divididos em 6 grupos: 3 controles e 3 tratados. Para os grupos com Cd, foi ofertada solução aquosa de CdCl₂ na concentração de 4,28 mg/Kg por via oral durante 7 dias. Após este tratamento, os animais foram separados em grupos e tratados com PDRA de *E. oleracea* nas doses de 100, 200 e 300 mg/Kg durante 42 dias. Parâmetros morfométricos tubulares e de Leydig apresentaram melhoria após o tratamento com PDRA de *E. oleracea*, a concentração sérica de testosterona aumentou nos animais tratados com 200 mg/Kg de PDRA. O percentual de células com danos reduziu no tratamento com 300 mg/Kg associado a aumento da concentração de zinco e manganês. A redução de cobre foi observada em todos os tratamentos, à medida que o ferro reduziu apenas naqueles que receberam 100 mg/Kg de PDRA. O tratamento com PDRA aumentou a atividade de SOD e a concentração de 300 mg/Kg reduziu a peroxidação lipídica. Dessa forma, sugere-se que o tratamento com PDRA após intoxicação por Cd apresenta potencial atividade antioxidante.

Introdução

A contaminação ambiental pelo Cádmio (Cd) é amplamente conhecida podendo ocorrer pelas atividades agrícola, industrial, mineradora, e pela ingestão de água e alimentos contaminados (Satarug et al., 2010; Gao et al., 2014). Além de ser carcinogênico (WHO, 2010), este metal leva a prejuízos à fertilidade humana (Benoff et al., 2009).

Em animais, são relatadas alterações reprodutivas como rompimento da barreira de células de Sertoli (Minutoli et al., 2015), culminado em desorganização da estrutura testicular com prejuízos na atividade espermatogênica e morte celular, além da redução na concentração sérica de testosterona e desbalanço na concentração de minerais essenciais testiculares (Predes et al., 2010; Cupertino et al., 2017;

Cupertino et al., 2018). O estresse oxidativo também é uma forma de toxicidade do Cd (Turner e Lysiak, 2008; Arafa et al., 2014). Por este motivo, tem-se observado o crescente número de estudos voltados para investigação de produtos de origem natural que possam atuar como antioxidantes contra alterações testiculares provocadas pelo Cd (Predes et al., 2011; Leite et al., 2013; Pires et al., 2013; Adaramoye e Akanni, 2016; Predes et al., 2016).

Dentre os vegetais com atividade antioxidante destaca-se o fruto do açaí (*Euterpe oleracea*). Seu fruto é rico em antocianinas, sendo encontradas a cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo, além de ácidos fenólicos como o vanílico, cafeico e siríngico, sendo estes relacionados à sua atividade antioxidante (Pacheco-Palencia et al., 2008; Carvalho et al., 2017; Petruk et al., 2017). Além disso, é fonte de minerais como cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (Coutinho et al., 2017).

É conhecido que a suplementação com polpa de *E. oleracea* reduz o colesterol total, além do percentual de gordura hepática em animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica (Waughon, 2015). O extrato rico em antocianinas, obtido após a extração do óleo, apresenta atividade antiproliferativa contra células de carcinoma cerebral, com potencial ação antioxidante (Hogan et al., 2010). Adicionalmente, a fração polifenólica da polpa apresenta atividade antiproliferativa contra células de carcinoma de cólon HT-29 (Pacheco-Palencia et al., 2008).

No entanto, não foram encontrados estudos em que se avalia os efeitos benéficos da polpa de *E. oleracea* na reprodução masculina. Em função das propriedades apresentadas, sugere-se que a polpa de *E. oleracea* rica em antocianinas possa apresentar atividade antioxidante contra alterações testiculares causadas pela intoxicação por Cd.

Material e Métodos

Obtenção da polpa desengordurada rica em antocianinas e fenólicos de *E. oleracea*

Os frutos de *E. oleracea* foram coletados nas Ilhas das Onças, latitude -1,42679 e longitude -48,55906, Município de Barcarena, Pará (Waughon, 2015), Frutos maduros foram selecionados, lavados, pesados e desinfetados com água clorada. A polpa congelada a -18°C contendo de 11 a 14% de sólidos enviada para a Universidade Federal de Viçosa (UFV). A polpa dos frutos de *E. oleracea* foi

liofilizada (Liotoplyophilizer, Brazil) e acondicionada em potes de polietileno revestido com folha de alumínio para impedir a passagem da luz à temperatura de -20°C. O óleo foi obtido através da extração da polpa liofilizada (20g) com éter de petróleo (670 mL) no Soxhlet por 8 horas. O solvente foi removido em rotaevaporador obtendo ao final o óleo de *E. oleracea*. A polpa remanescente, com rendimento final de 48%, chamada de polpa desengordurada rica em antocianinas sofreu evaporação do solvente em capela de exaustão, protegida da luz, para posteriormente ser administrada aos animais por gavagem (Freitas et al., 2016).

Determinação da atividade antioxidante da PDRA *in vitro*

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, segundo Kim et al. (2002), com modificações. Para o ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazina) preparou-se uma solução 0,1 mmol/L de DPPH dissolvido em etanol 80%. Esta solução foi preparada para utilização no dia da análise. Utilizou-se o trolox como padrão, através de curva padrão. Para amostra, foi construída uma curva, com cinco diluições sequenciais (de modo a obter, após reação, absorvância na faixa da curva padrão). A leitura foi realizada a 517 nm em espectrofotômetro, UV-VIS 1601Pc marca Shimadzu (Kyoto, Japão), após 1 hora de reação. A partir desse dado, construiu-se um gráfico de amostra: concentração (mL de extrato/L) vs absorvância.

Para determinação da capacidade antioxidante, foi obtida a absorvância equivalente a 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da equação da curva padrão de trolox. Esse valor foi substituído na equação da reta da curva de amostra, sendo encontrado o volume de extrato obtido (mL) equivalente a 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Esse dado foi corrigido em μmol equivalente de trolox por grama de PDRA e o resultado expresso em capacidade antioxidante equivalente ao trolox.

Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais na PDRA

A determinação de compostos fenólicos totais dos extratos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando o ácido gálico como padrão de referência. Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,3 mL de cada amostra, 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1/10 e Na_2CO_3 7,5%, sob agitação. A mistura foi armazenada ao abrigo de

luz por 1 hora. O tubo controle continha 0,6 mL do solvente de extração (etanol 70% acidificado até pH 2,0). A absorvância foi medida a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-VIS 1601Pc marca Shimadzu (Kyoto, Japão). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de PDRA (mg EAG/g).

Dosagem das antocianinas totais por espectrofotometria da PDRA

O conteúdo de antocianinas foi determinado pelo método de absorvância de pH diferencial (Cheng e Breen, 1991). As absorvâncias das amostras foram mensuradas a 520 e 700 nm em tampões em pH 1,0 (ácido hidrocloreídrico-cloreto de potássio, 0,025M) e 4,5 (acetato de sódio, 1M). Os valores expressos em mg de antocianina por 100 g de PDRA.

Total de antocianinas = $A \times MM \times D \times V \times 100\% / \epsilon \times 1 \times M$, onde $A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5}$, MW (massa molecular da cianidina-3-glicosídeo) = 449.2 g/mol, D (diluição utilizada), ϵ (absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo) = 26.900 mol/L, M massa da amostra (mg).

Determinação do conteúdo mineral de PDRA

Amostras de PDRA (n = 5) foram pesadas (0,1 g) em balança digital analítica (precisão 0.0001g – BEL Mark 210A). As amostras secas foram colocadas em Erlenmeyers de 25 mL juntamente com 1.5 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado e 0.5 mL de ácido perclórico (HClO₄) (70%) e transferidas para chapa aquecedora. A temperatura foi aumentada gradualmente, até 200°C, de modo que a digestão do material fosse completa. A seguir, as amostras foram diluídas em água desionizada e filtradas em papel de filtro. A determinação das concentrações de cádmio, zinco, cálcio, magnésio, manganês, cobre e ferro, foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

Animais

Quarenta e dois camundongos Swiss machos adultos, com 56 dias de idade, foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, e mantidos sob controle de iluminação (12h claro/12h escuro) e temperatura (21°C ± 1). Os animais receberam água e ração *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), protocolo 058/2016.

Grupos experimentais e coleta do material biológico

Após 30 dias de adaptação os animais foram divididos, aleatoriamente, em seis grupos experimentais ($n = 7$ animais/grupo), sendo três grupos controle e três grupos tratados com PDRA de *E. oleracea*. Os animais do grupo controle negativo receberam água destilada por gavagem; o grupo controle positivo recebeu 4,28 mg/Kg de cloreto de cádmio (CdCl_2 / Sigma, St Louis, MO, USA) por gavagem durante sete dias consecutivos; o controle PDRA recebeu 300 mg/Kg de polpa na solução de ácido cítrico 0,3% pH 4 (Novello et al., 2015) durante 42 dias a partir do oitavo dia de experimento. Os demais animais receberam 4,28 mg/Kg de CdCl_2 por gavagem durante sete dias e a partir do oitavo dia receberam tratamento com 100, 200 ou 300 mg/Kg de PDRA durante 42 dias.

No 50º dia os animais foram eutanasiados. O período de 42 dias foi escolhido de acordo com o tempo do ciclo do epitélio seminífero em camundongos (Russell et al., 1990). Os animais foram sedados e anestesiados com tiopental 30 mg/Kg *i.p.* e eutanasiados por aprofundamento anestésico. Os testículos foram removidos, dissecados e pesados, sendo o testículo esquerdo fixado em Karnovsky e destinado para avaliação histológica, e o direito congelado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para análises bioquímicas.

Determinação do bioacúmulo de cádmio e dosagem de microminerais

Amostras do testículo esquerdo foram pesadas em balança analítica de precisão (0.0001 g – BEL Mark 210A) e, posteriormente, secas em estufa a $70\text{ }^\circ\text{C}$ até atingirem peso seco constante. As amostras secas foram colocadas em Erlenmeyers de 25 mL juntamente com 1,5 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado e 0,5 mL de ácido perclórico (HClO_4) (70%) e transferidas para chapa aquecedora. A temperatura foi aumentada gradualmente, até $90\text{ }^\circ\text{C}$, de modo que a digestão do material fosse completa. A seguir, as amostras foram diluídas em água deionizada e filtradas em papel de filtro. A determinação das concentrações de cádmio, zinco, cálcio, magnésio, manganês, cobre e ferro, foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

Avaliação do estresse oxidativo

O testículo direito foi congelado em freezer -80 °C e posteriormente homogeneizado com tampão fosfato (pH 7,4, 0,2 M com EDTA 1M), na proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de tampão, em homogeneizador de tecido portátil (YO-04727-09; LabGEN) e centrifugado a 3000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises, que foram realizadas em duplicata. A concentração de proteína total no tecido testicular foi determinada usando o método de Lowry et al. (1951).

A atividade de SOD foi estimada pelo método do pirogalol, com base na capacidade desta enzima para catalisar a reação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio, monitorada a 570 nm, em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X) (Sarban et al., 2005). A atividade da CAT foi avaliada de acordo com o método descrito por Dieterich et al. (2000), medindo a cinética da decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 60s, em espectrofotômetro a 240 nm. Para a análise de malondialdeído (MDA), o homogenato reagiu com solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e HCl 0,25 N), durante 40 minutos, em banho-maria a 90°C. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535 nm, em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X), (Buege e Aust, 1978). Os resultados foram expressos por mg de proteína.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida por leitura em espectrofotômetro a 340 nm (Habig et al., 1974) e calculada a partir da taxa de formação do conjugado 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB).

A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito no sobrenadante do homogenato do testículo, pela reação de Griess padrão. Incubou-se 50 µL de sobrenadante do homogenato testicular com um volume igual de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de hidrocloreto de naftilenodiamina e 2,5% de H_3PO_4) à temperatura ambiente durante 10 min. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro de exploração de microplacas (Power Wave X). A concentração de nitrito foi calculada com referência à curva padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$) (Ricart-Jané et al., 2002).

Processamento histológico

O testículo esquerdo foi imerso em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e transferido para etanol 70%. Posteriormente, fragmentos testiculares foram desidratados em solução crescente de etanol e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de 3µm foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), respeitando-se o intervalo de, no mínimo, 40 µm entre os cortes e as preparações histológicas coradas com azul de toluidina + borato de sódio (1%). Para realização das análises morfométricas foram utilizadas imagens capturadas em fotomicroscópio (Olympus BX -53, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão). As análises morfométricas se deram pelo programa Image J[®].

Histopatologia testicular

Para a avaliação histopatológica do testículo contou-se 200 túbulos por animal, os quais receberam classificação como túbulos normais e patológicos. Os túbulos com patologias foram divididos em patologias leves (vacuolização e desprendimento do epitélio germinativo) e patologias graves (ausência de células germinativas e/ou células de Sertoli), sendo os resultados expressos em valores percentuais.

Viabilidade celular

Secções histológicas testiculares foram coradas com laranja de acridina e iodeto de propídio para avaliação de alterações morfológicas celulares (Giri e Roy, 2016). Laranja de Acridina (LA, verde) é um corante vital que marca tanto células viáveis quanto células mortas (ou apoptóticas), enquanto o iodeto de propídio (IP, vermelho) marca apenas células que perderam a integridade da membrana. A classificação celular, portanto, é baseada em condensação nuclear e fragmentação, bem como a integridade da membrana (Giri e Roy, 2016). As células viáveis apresentam núcleo verde com estrutura intacta, enquanto que as células apoptóticas exibem denso núcleo amarelo/laranja/vermelho devido à condensação de cromatina e o grau de perda de integridade da membrana, caracterizado pela co-coloração com IP (Lowry et al., 1951). As imagens digitais foram capturadas pelo fotomicroscópio EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canadá) e analisadas utilizando o software de

análise de imagens Image J® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) de acordo com Oberholzer et al. (Oberholzer, et al., 1956). Para isso, foi utilizada uma área total de $30 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ para calcular o percentual de células germinativas apoptóticas nos túbulos seminíferos por grupo.

Histomorfometria testicular

A determinação do índice gonadossomático (IGS) se deu pela seguinte fórmula: $\text{IGS} = \text{PG}/\text{PC} \times 100$, sendo PG = peso gonadal e PC = peso corporal (Amann, 1970). O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se o peso da albugínea do peso total dos testículos. O índice parenquimossomático (IPS) determinado pela fórmula: $\text{PP}/\text{PC} \times 100$ (PP = peso do parênquima testicular e PC = Peso corporal).

Morfometria tubular. Uma vez que o testículo é dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular, as proporções volumétricas destes foram obtidas por contagem de 2.660 pontos projetados em 10 imagens capturadas das laminais histológicas, com ampliação de $100\times$. Foram contados pontos coincidentes sobre a túnica própria, epitélio seminífero e lúmen (compartimento tubular) e pontos no compartimento intertubular. A determinação do percentual de cada componente se deu pela seguinte fórmula: proporção volumétrica (%) = (número de pontos no túbulo ou intertúbulo / 2.660 pontos no total) $\times 100$. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado a partir da fórmula: % túbulo/intertúbulo (ou seus constituintes) / 100 \times volume total do parênquima testicular (Melo et al., 2010). Como a densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 (Johnson et al., 1981), considera-se a massa do testículo igual ao seu volume. O índice tubulossomático (ITS) foi calculado a partir da fórmula $\text{ITS} (\%) = \text{VT}/\text{PC} \times 100$ (VT = Volume de túbulo seminífero e PC = Peso corporal) (Amann, 1970). O índice epiteliossomático (IES) obtido pela seguinte fórmula: $\text{IES} = \text{VE}/\text{PC} \times 100$ (VE = Volume de epitélio seminífero e PC = Peso corporal).

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir da mensuração de 20 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Uma vez que o diâmetro tubular permanece constante em camundongos machos adultos, em todo o ciclo do epitélio seminífero, não é necessário considerar a fase do epitélio dentro do ciclo (França e Russell, 1998). Estas secções também foram utilizadas para medir a altura

do epitélio seminífero, a partir da túnica própria até o lúmen tubular, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal. Para determinar o diâmetro do lúmen subtraiu-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero (Mouro et al., 2017).

A área de túbulo seminífero foi calculada pela seguinte fórmula: $ArTS = \pi \cdot (RT)^2$, em que $ArTS$ = área de túbulo seminífero, RT = raio tubular, enquanto que a área de lúmen calculada pela fórmula: $ArL = \pi \cdot (RL)^2$, onde ArL = área de lúmen, RL = raio luminal. A área de epitélio foi obtida subtraindo-se da área do túbulo seminífero a área do lúmen. Os resultados de área foram expressos em milímetro (mm^2). A relação túbulo epitélio foi determinada dividindo-se a área tubular pela área de epitélio.

O comprimento total (metros) dos túbulos seminíferos (CT) foi estimado a partir do conhecimento prévio do volume ocupado por estas estruturas dentro do parênquima, bem como a partir do diâmetro tubular médio: $VTS/\pi r^2$ (VTS = volume do túbulo seminífero; πr^2 = área da secção transversal do túbulo; r = diâmetro/2) (Attal e Courot, 1963). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o comprimento total pelo peso bruto dos testículos.

Morfometria intertubular. A proporção volumétrica dos componentes intertubulares se deu pela contagem de 1.000 pontos, por animal, projetados em imagens do compartimento intertubular dos testículos. Foram registrados pontos coincidentes sobre os seguintes componentes intertubulares: núcleo e citoplasma da célula de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático, macrófagos e tecido conjuntivo. Para calcular as proporções volumétricas destes componentes utilizou-se a fórmula: proporção volumétrica de cada componente intertubular (%) = número de pontos do componente intertubular x 100/1000 (total de pontos). Para calcular o volume (ml) de cada componente intertubular aplicou-se a seguinte fórmula: proporção do elemento nos testículos x peso do parênquima testicular/100.

O diâmetro médio do núcleo da célula de Leydig foi obtido a partir de imagens capturadas com ampliação de 400x, sendo medidos 30 núcleos por animal, escolhendo-se aqueles mais esféricos, com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear ($VN = 4/3 \pi R^3$, onde R = raio

nuclear) e citoplasmático ($VC = \% \text{ citoplasma} \times VN/\% \text{ núcleo}$) e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig, somando-se VN e VC, sendo os valores expressos em μm^3 .

O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam nos testículos foi realizado a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular x peso do parênquima de um testículo/100. Obteve-se o volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo a partir o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig por testículo foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam nos testículos (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3). Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo foi utilizada a fórmula: volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3). O índice Leydigossomático (ILS) calculado pela fórmula: $ILS = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular}/PC \times 100$, onde PC= peso corporal (Mouro et al., 2017).

Determinação da concentração sérica de testosterona

Realizou-se a coleta de sangue durante a anestesia, por punção cardíaca, e este foi em seguida centrifugado a 419 g durante 15 min. O soro foi armazenado em microtubos e congelado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. A quantificação da testosterona sérica se deu por ensaio de quimioluminescência utilizando o kit de reagente de testosterona do Access, adequado para o Sistema de Imunoensaio Access 2 (Beckman Coulter, Brea, CA).

Análises estatísticas

A análise estatística se deu pela comparação da exposição ao Cd com o controle e com os tratamentos com PDRA. Os valores percentuais foram convertidos para arco seno, com finalidade de torná-los mais exatos, para posteriormente ser realizada a estatística (Matta et al., 2002). Os resultados obtidos a partir das avaliações quantitativas foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo método de post-hoc de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

Resultados

Capacidade antioxidante *in vitro*, conteúdo de compostos fenólicos totais e de antocianinas da PDRA

Os valores obtidos na avaliação da capacidade antioxidante, dosagem de fenólicos totais e total de antocianinas na PDRA são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Conteúdo de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e capacidade antioxidante *in vitro* da PDRA de *E. oleracea*

| Parâmetros | PDRA |
|--|------------------|
| Compostos fenólicos totais (mg EAG/100 g) | 4789,50 ± 303,00 |
| Antocianinas totais (mg/100 g) | 567,53 ± 80,62 |
| Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> (µM trolox/ g) | 236,21 ± 59,82 |

Média ± desvio-padrão. EAG = ácido gálico; PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas

Conteúdo mineral da PDRA

Foi encontrada alta concentração de Ca na PDRA, seguido de Mg e Mn. A presença de Zn e Fe também foi observada em menores concentrações, seguido de Cu. A polpa em estudo apresentou resultado negativo para a presença de Cd (Tabela 2).

Tabela 2. Conteúdo mineral da PDRA de *E. oleracea*

| Mineral | mg/100g de PDRA liofilizada |
|----------|-----------------------------|
| Cálcio | 423,4 ± 24,2 |
| Magnésio | 222,6 ± 17,1 |
| Manganês | 8,4 ± 2,5 |
| Zinco | 6,2 ± 4,8 |
| Ferro | 3,0 ± 0,7 |
| Cobre | 2,3 ± 0,2 |
| Cádmio | 0 |

Média ± desvio-padrão. PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas.

Bioacúmulo de cádmio e dosagem de minerais essenciais testiculares

O tratamento com 300mg/Kg de PDRA após intoxicação com Cd elevou as concentração de CA, Mg e Mn, enquanto que a concentração de Mn apresentou-se reduzida pelo Cd. A concentração de Cu reduziu nos animais que receberam somente PDRA e tratamento com 100 e 200 mg/Kg em relação ao controle. Já a concentração de Fe apresentou-se reduzida nos animais tratados com 100 mg/Kg de PDRA em relação aqueles que receberam tratamento com as demais concentrações da polpa, enquanto que nos animais que receberam somente Cd a concentração deste mineral apresentou-se elevada em relação a todos os aniamis tratados com PDRA (Figura 1).

Estresse oxidativo

Todos os animais que receberam PDRA apresentaram maior atividade de SOD comparados àqueles que receberam somente Cd, sendo que os animais tratados com 100 mg/Kg de PDRA apresentaram maior atividade da enzima em comparação aos que receberam somente PDRA. A atividade de CAT reduziu nos animais expostos ao metal e não tratados e nos que receberam tratamento com 300 mg/Kg de PDRA. Os animais intoxicados e que receberam tratamento na dose de 300 mg/Kg apresentaram menor concentração de MDA em relação demais, intoxicados tratados ou não com PDRA, e aqueles que receberam somente PDRA. GST aumentou nos animais que receberam somente PDRA. O NO aumentou nos animais tratados com 100 mg/Kg de PDRA em relação ao demais animais. Este parâmetro também se mostrou elevado naqueles animais que receberam somente PDRA em relação ao controle (Figura 2).

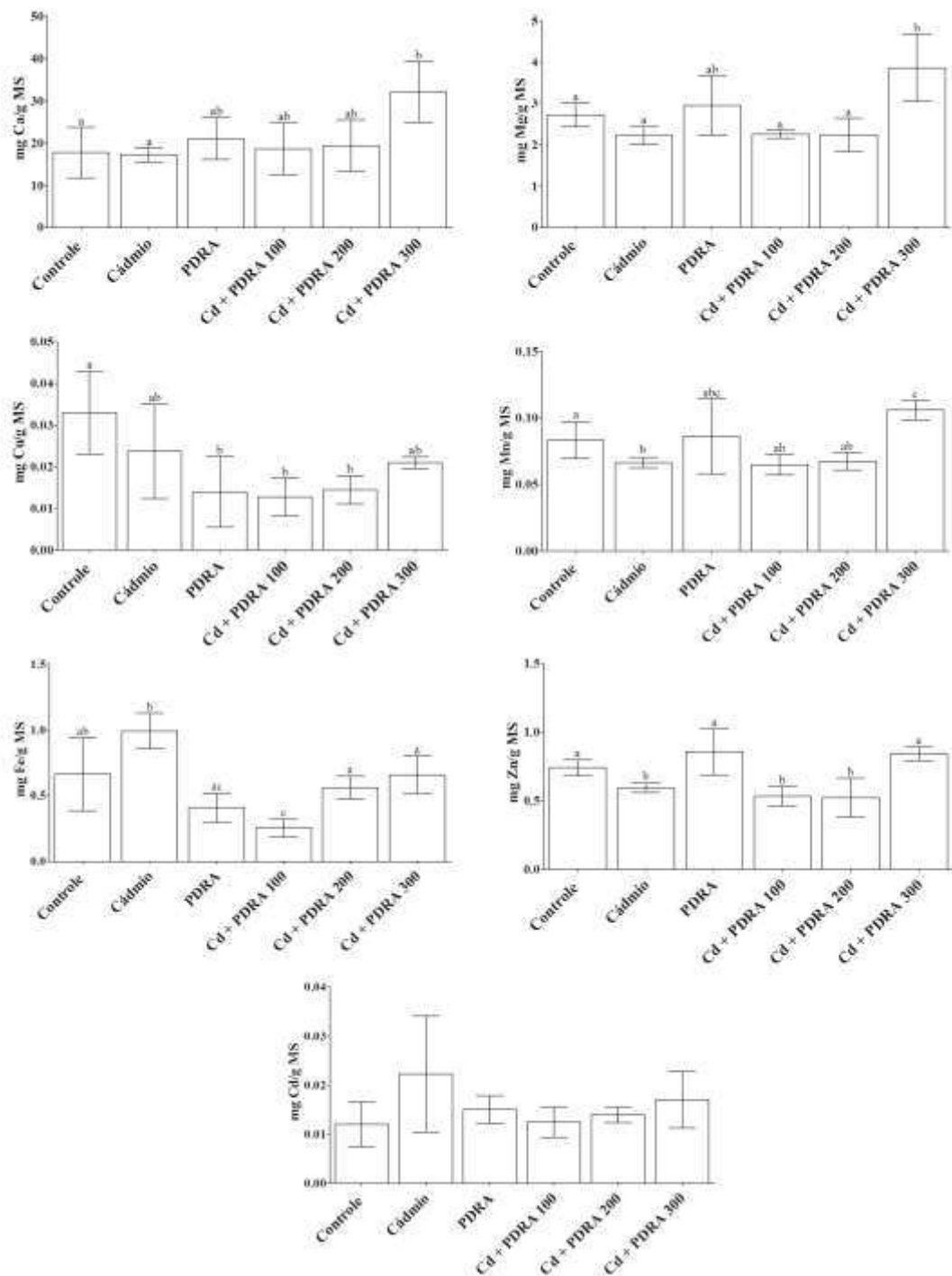


Figura 1. Concentração de cádmio e minerais essenciais testiculares de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*. PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas, Cd = Cádmio; Zn = Zinco; Cu = Cobre; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; Fe = Ferro; Mn = Manganês. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

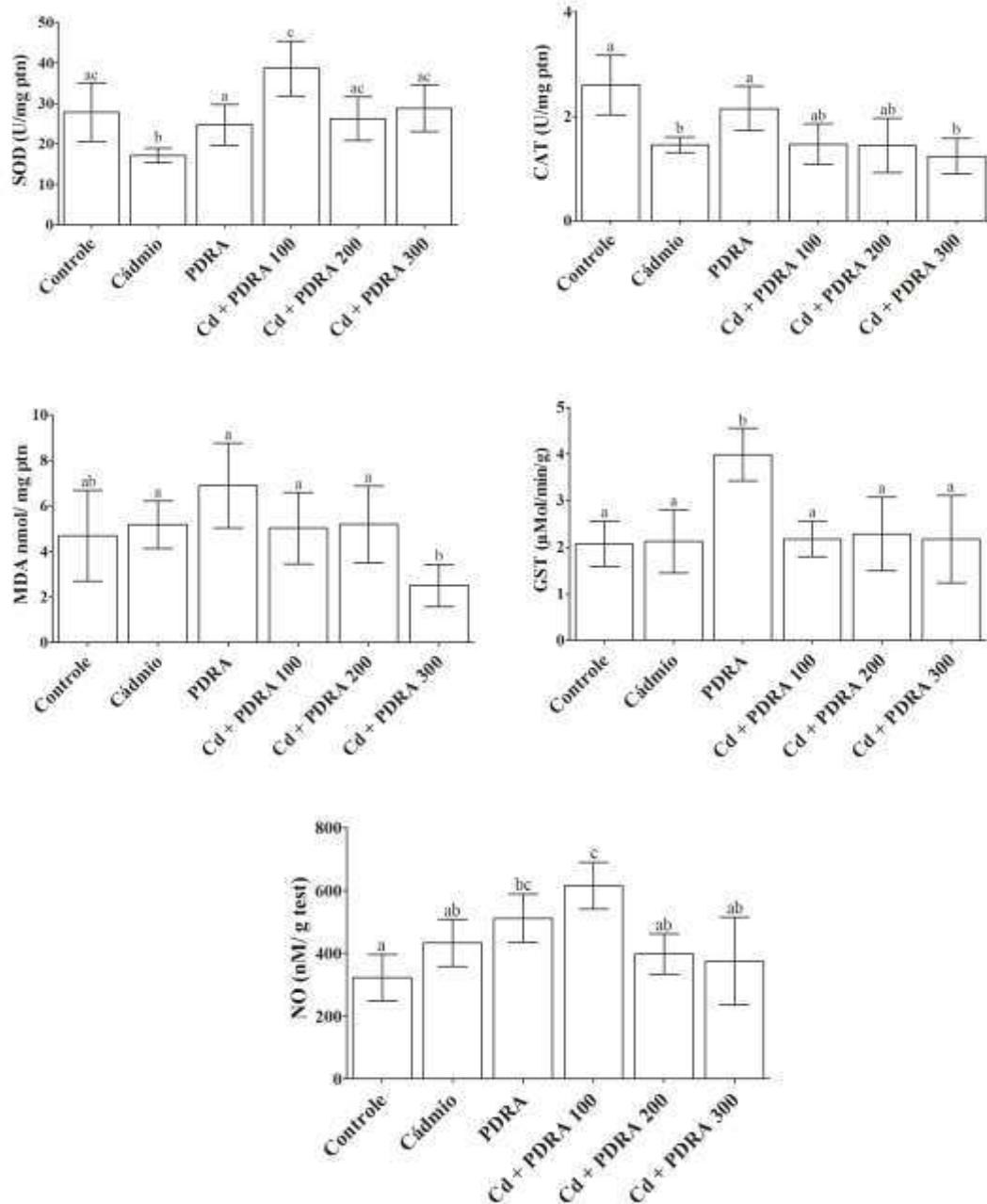


Figura 2. Atividade de enzimas antioxidantes, concentração de malondialdeído e de óxido nítrico de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*. PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas; SOD = Superóxido dismutase; CAT = Catalase; MDA = Malondialdeído; NO = Óxido nítrico. ^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Parâmetros Biométricos

Não foram observadas alterações nos parâmetros biométricos corporais e testiculares (Tabela 3).

Histopatologia testicular

Alterações na arquitetura tecidual observadas após a intoxicação pelo Cd incluem: vacuolização, desprendimento de células do epitélio e desorganização do epitélio germinativo, assim como ausência de células germinativas e/ou células de Sertoli. As mesmas alterações foram encontradas nos animais que receberam tratamento com PDRA, inclusive no controle PDRA, entretanto em menor proporção (Figura 3). O percentual de túbulos seminíferos com patologias classificadas como leves reduziu após tratamento com PDRA comparado ao grupo que recebeu somente Cd, embora não tenha normalizado totalmente. O percentual de patologias graves foi maior em todos os animais expostos ao metal, tratados ou não com PDRA, e mesmo naqueles que receberam somente a polpa (Figura 4).

Viabilidade celular

O tratamento com 300 mg/Kg de PDRA reduziu o percentual de células com danos, que apresentou-se aumentado pelo Cd. Os animais que receberam somente PDRA apresentaram aumentos deste percentual em relação ao grupo controle (Figura 5).

Histomorfometria testicular

Na histomorfometria tubular o percentual de túnica reduziu naqueles animais que receberam somente Cd comparados ao controle e nos animais tratados com PDRA este parâmetro regularizou. Animais que receberam somente PDRA também apresentaram redução deste parâmetro em relação ao controle e ao tratamento com 200 mg/Kg de PDRA (Tabela 4).

Tabela 3. Biometria de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*.

| | Controle | Cd | PDRA | Cd + PDRA 100 | Cd + PDRA 200 | Cd + PDRA 300 |
|------------------------|-----------------|---------------|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Peso corporal (g) | 39,98 ± 2,45 | 41,48 ± 3,44 | 42,43 ± 1,69 | 42,55 ± 4,18 | 39,88 ± 3,73 | 39,19 ± 4,33 |
| Peso testicular (g) | 0,20 ± 0,02 | 0,20 ± 0,02 | 0,18 ± 0,03 | 0,21 ± 0,02 | 0,20 ± 0,02 | 0,21 ± 0,04 |
| Peso do parênquima (g) | 0,18 ± 0,02 | 0,19 ± 0,02 | 0,17 ± 0,03 | 0,19 ± 0,03 | 0,19 ± 0,02 | 0,20 ± 0,04 |
| Peso da albugínea (g) | 0,012 ± 0,003 | 0,011 ± 0,001 | 0,012 ± 0,003 | 0,011 ± 0,003 | 0,012 ± 0,002 | 0,011 ± 0,003 |
| IGS (%) | 0,50 ± 0,08 | 0,49 ± 0,05 | 0,43 ± 0,07 | 0,48 ± 0,05 | 0,51 ± 0,04 | 0,53 ± 0,09 |
| IPS (%) | 0,46 ± 0,08 | 0,45 ± 0,05 | 0,40 ± 0,07 | 0,46 ± 0,05 | 0,48 ± 0,04 | 0,50 ± 0,09 |

Média ± desvio-padrão. PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas, IGS = Índice gonadossomático, IPS = Índice parenquimossomático. (p>0,05).

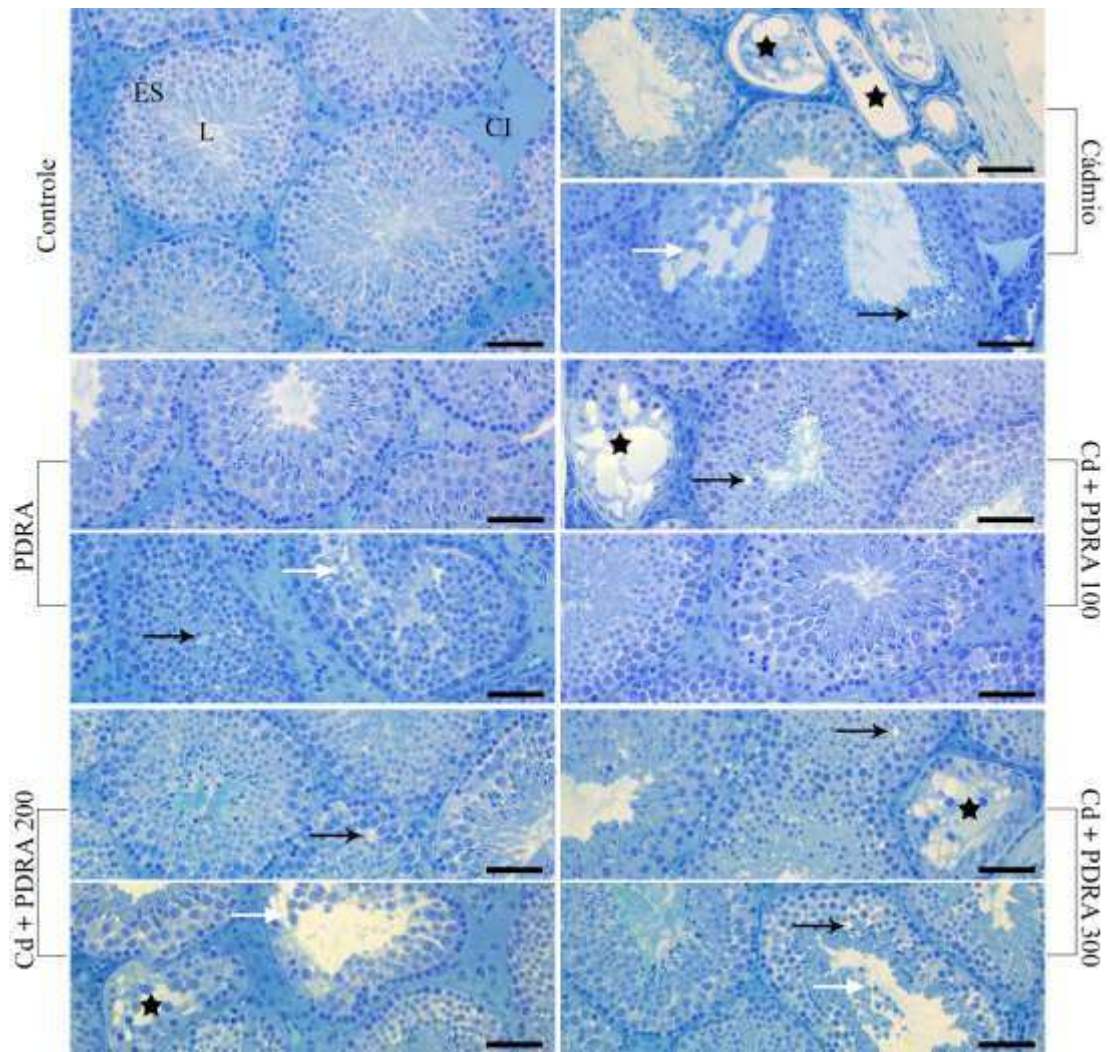


Figura 3. Fotomicrografias testiculares de camundongos expostos ao cloreto de e tratados com PDRA de *E. oleracea*. Ctr = Controle; Cd = Cádmio; PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas; ES = Epitélio Seminífero; L = Lúmen; CI = Compartimento Intertubular; Setas pretas = Vacuolização; Seta Branca = Desprendimento de epitélio; Estrela = Túbulos seminíferos com degeneração de epitélio. Azul de Toluidina. Barras = 50 μ m.

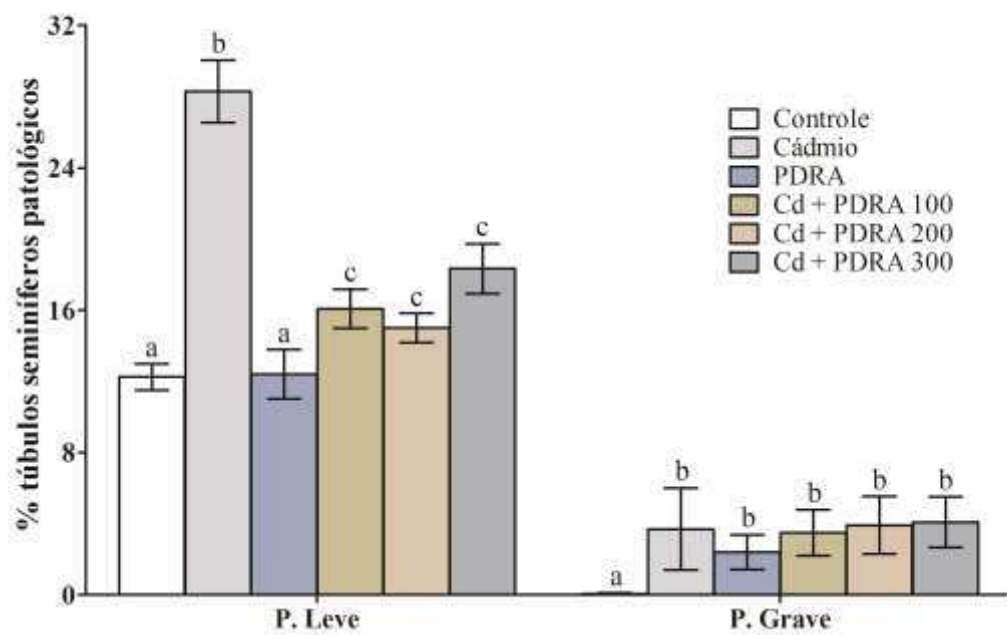


Figura 4. Quantificação de túbulos normais e anormais de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*. PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas.^{ab} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

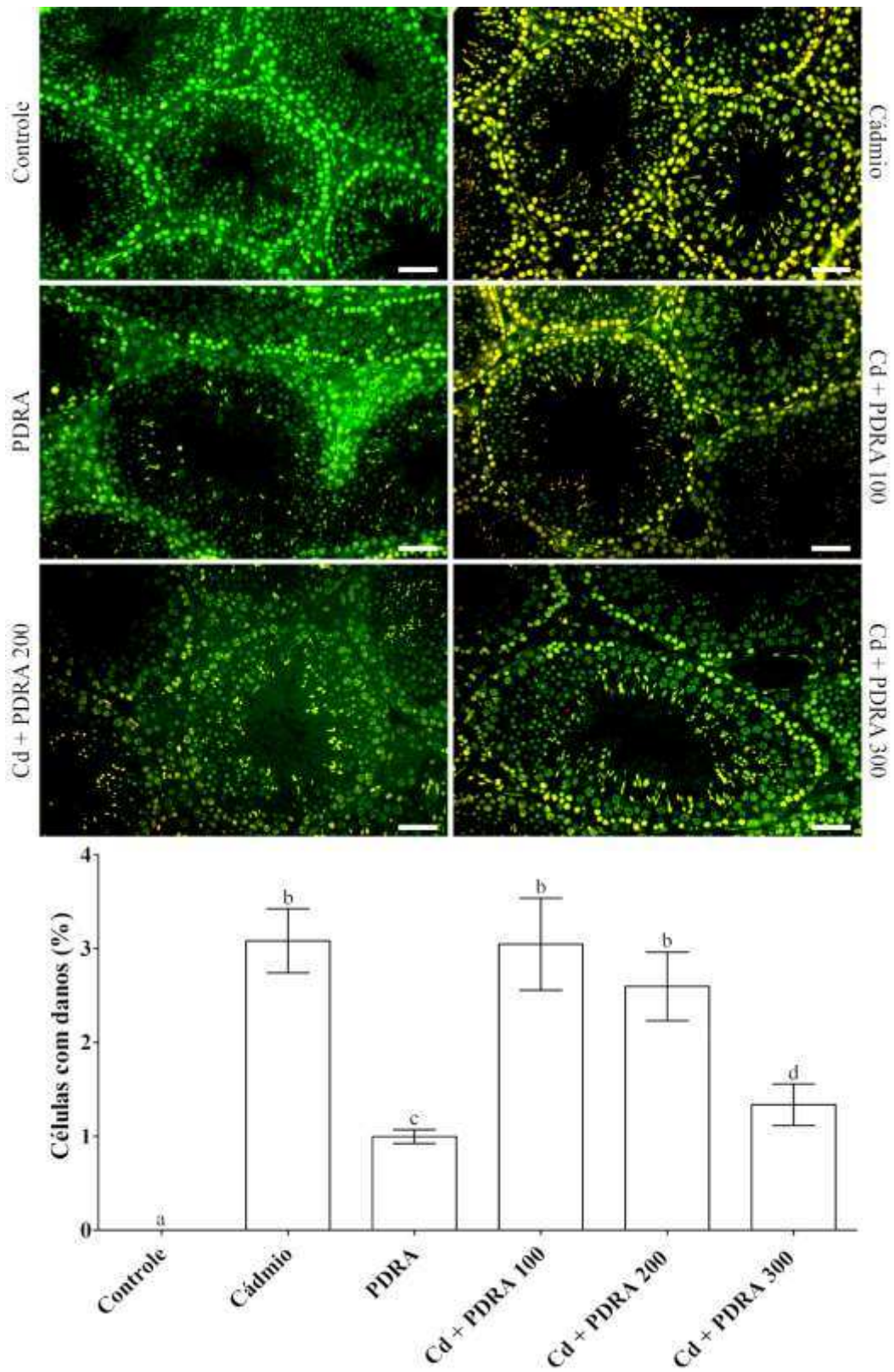


Figura 5. Viabilidade celular testicular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *E. oleracea*. Cd = Cádmio; PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas. ^{ab}Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$). Barras = 50 μ m

Tanto o diâmetro luminal quanto a área de lúmen aumentaram em animais que receberam somente Cd, regularizando nos animais tratados com PDRA. A altura de epitélio reduziu nestes animais, naqueles que receberam somente PDRA e nos tratados com 200 mg/Kg de PDRA em comparação aos demais grupos experimentais, com regularização deste parâmetro nos tratados com 100 e 200 mg/Kg de PDRA. O tratamento com 100 e 200 mg/Kg de PDRA reduziu a RTE que apresentou-se aumentada pela exposição ao Cd. O percentual de citoplasma de Leydig reduziu nos animais expostos somente ao Cd e naqueles tratados com 100 mg/Kg de PDRA, porém o percentual de células de Leydig reduziu em todos os grupos experimentais em relação ao controle (Tabela 6).

O tratamento com PDRA reestabeleceu os parâmetros de diâmetro nuclear, volume nuclear e volume das células de Leydig, reduzidos pelo Cd. O volume citoplasmático também reduziu nos animais que receberam Cd em relação ao grupo controle, animais que receberam somente PDRA e naqueles tratados com 300 mg/Kg de PDRA, enquanto o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo aumentou em relação aos animais que receberam tratamento com 300 mg/Kg de PDRA (Tabela 7).

Concentração sérica de testosterona

O tratamento com 200 mg/Kg de PDRA aumentou a concentração sérica de testosterona que foi reduzida pela exposição ao Cd. As demais doses não foram eficazes no reestabelecimento da concentração hormonal. No entanto, os animais que receberam somente PDRA apresentaram redução neste parâmetro comparados ao grupo controle e tratamento com 200 mg/Kg de PDRA (Figura 6).

Tabela 4. Proporção volumétrica tubular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*.

| | Controle | Cd | PDRA | Cd + PDRA 100 | Cd + PDRA 200 | Cd + PDRA 300 |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Túbulo (%) | 86,48 ± 1,02 | 88,38 ± 1,66 | 88,18 ± 1,04 | 88,00 ± 1,41 | 88,10 ± 1,06 | 88,45 ± 1,72 |
| Intertúbulo (%) | 13,56 ± 1,02 | 11,62 ± 1,66 | 11,82 ± 1,04 | 12,00 ± 1,41 | 11,90 ± 1,06 | 11,55 ± 1,72 |
| Epitélio (%) | 59,83 ± 1,59 | 63,29 ± 2,83 | 63,33 ± 1,93 | 61,74 ± 2,86 | 60,63 ± 1,87 | 62,83 ± 2,48 |
| Túnica (%) | 11,47 ± 0,74 ^a | 9,84 ± 0,32 ^b | 10,44 ± 0,84 ^{bc} | 10,91 ± 0,79 ^{ac} | 11,70 ± 0,42 ^a | 10,93 ± 0,63 ^{ac} |
| Lúmen (%) | 15,14 ± 0,60 | 15,25 ± 2,17 | 14,41 ± 0,52 | 15,35 ± 1,30 | 15,77 ± 1,63 | 14,70 ± 1,02 |
| ITS (%) | 0,40 ± 0,07 | 0,41 ± 0,03 | 0,35 ± 0,06 | 0,40 ± 0,05 | 0,42 ± 0,03 | 0,44 ± 0,08 |
| IES (%) | 0,28 ± 0,05 | 0,29 ± 0,02 | 0,25 ± 0,04 | 0,28 ± 0,03 | 0,29 ± 0,02 | 0,31 ± 0,06 |

Média ± desvio-padrão. Cd = Cádmio; PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas; ITS = Índice tubulossomático; IES = Índice epiteliossomático. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Tabela 5. Morfometria e estereologia tubular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*.

| | Controle | Cd | PDRA | Cd + PDRA 100 | Cd + PDRA 200 | Cd + PDRA 300 |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Túbulo (mL) | 0,16 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 0,15 ± 0,03 | 0,17 ± 0,03 | 0,17 ± 0,02 | 0,17 ± 0,04 |
| Intertúbulo (mL) | 0,025 ± 0,002 | 0,022 ± 0,005 | 0,022 ± 0,004 | 0,024 ± 0,004 | 0,024 ± 0,002 | 0,021 ± 0,005 |
| Epitélio (mL) | 0,11 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 0,11 ± 0,02 | 0,12 ± 0,02 | 0,12 ± 0,01 | 0,12 ± 0,03 |
| Túnica (mL) | 0,021 ± 0,0002 | 0,019 ± 0,003 | 0,018 ± 0,003 | 0,021 ± 0,002 | 0,022 ± 0,002 | 0,021 ± 0,005 |
| Lúmen (mL) | 0,028 ± 0,03 | 0,029 ± 0,006 | 0,024 ± 0,004 | 0,030 ± 0,005 | 0,030 ± 0,002 | 0,029 ± 0,006 |
| DT (µm) | 233,92 ± 6,55 | 226,88 ± 10,66 | 216,69 ± 9,60 | 225,04 ± 11,89 | 218,75 ± 23,62 | 228,25 ± 12,06 |
| DL (µm) | 60,76 ± 7,03 ^a | 76,94 ± 4,96 ^b | 64,18 ± 8,15 ^a | 61,15 ± 4,95 ^a | 66,73 ± 12,75 ^{ab} | 67,09 ± 4,35 ^a |
| AE (µm) | 173,17 ± 5,95 ^a | 149,94 ± 9,38 ^b | 152,50 ± 4,62 ^b | 163,89 ± 8,92 ^a | 152,02 ± 13,63 ^b | 161,16 ± 11,13 ^a |
| ÁrT (mm) | 0,0430 ± 0,0024 | 0,0405 ± 0,0039 | 0,0369 ± 0,0033 | 0,0398 ± 0,0043 | 0,0379 ± 0,0082 | 0,0410 ± 0,0044 |
| ÁrL (mm) | 0,0029 ± 0,0007 ^a | 0,0047 ± 0,0006 ^b | 0,0033 ± 0,0008 ^a | 0,0030 ± 0,0005 ^a | 0,0036 ± 0,0013 ^a | 0,0035 ± 0,0005 ^a |
| ÁrE (mm) | 0,0401 ± 0,0021 | 0,0358 ± 0,0036 | 0,0336 ± 0,0026 | 0,0369 ± 0,0039 | 0,0343 ± 0,0071 | 0,0374 ± 0,0042 |
| RTE | 1,07 ± 0,02 ^a | 1,13 ± 0,02 ^b | 1,09 ± 0,02 ^{ab} | 1,07 ± 0,01 ^a | 1,10 ± 0,02 ^{ab} | 1,09 ± 0,01 ^a |
| CTT/T (m) | 3,72 ± 0,44 | 4,22 ± 0,79 | 4,03 ± 0,52 | 4,33 ± 0,77 | 4,54 ± 0,81 | 4,27 ± 1,00 |
| CTT/gT (m/g) | 18,98 ± 1,37 | 20,78 ± 2,07 | 22,39 ± 1,89 | 21,00 ± 2,21 | 22,62 ± 4,51 | 20,55 ± 2,14 |

Média ± desvio-padrão. Cd = Cádmio; PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas; DT = Diâmetro tubular; DL = Diâmetro luminal; AE = Altura de epitélio; ÁrT = Área de túbulo; ÁrL = Área de lúmen; ÁrE = Área de epitélio; RTE = Relação Túbulo epitélio; ITS = Índice tubulossomático; IES = Índice epiteliossomático; CTT/T = Comprimento de túbulo seminífero nos testículos; CTT/gT = Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Tabela 6. Proporção volumétrica e volume dos elementos do compartimento intertubular de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*.

| | Controle | Cd | PDRA | Cd + PDRA 100 | Cd + PDRA 200 | Cd + PDRA 300 |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Percentual no testículo (%)</i> | | | | | | |
| Tecido conjuntivo | 1,00 ± 0,26 | 1,00 ± 0,30 | 0,97 ± 0,24 | 1,12 ± 0,49 | 0,88 ± 0,30 | 0,62 ± 0,16 |
| Espaço linfático | 1,27 ± 0,45 | 1,13 ± 0,39 | 1,45 ± 0,57 | 1,34 ± 0,62 | 1,68 ± 0,68 | 1,27 ± 0,81 |
| Vaso sanguíneo | 1,74 ± 0,28 | 1,59 ± 0,43 | 1,46 ± 0,30 | 1,42 ± 0,46 | 1,65 ± 0,69 | 1,78 ± 0,63 |
| Macrófago | 0,32 ± 0,27 | 0,41 ± 0,18 | 0,25 ± 0,10 | 0,27 ± 0,13 | 0,24 ± 0,13 | 0,33 ± 0,14 |
| Citoplasma de Leydig | 7,62 ± 0,51 ^a | 6,09 ± 1,15 ^b | 6,27 ± 1,02 ^{ab} | 6,31 ± 0,87 ^b | 5,87 ± 0,57 ^{ab} | 6,26 ± 1,66 ^{ab} |
| Núcleo de Leydig | 1,62 ± 0,16 | 1,40 ± 0,26 | 1,41 ± 0,39 | 1,54 ± 0,18 | 1,55 ± 0,27 | 1,28 ± 0,31 |
| Leydig | 9,23 ± 0,63 ^a | 7,49 ± 1,38 ^b | 7,68 ± 1,39 ^b | 7,85 ± 1,02 ^b | 7,45 ± 0,48 ^b | 7,54 ± 1,95 ^b |
| <i>Volume por testículo (mL)</i> | | | | | | |
| Tecido conjuntivo | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 |
| Espaço linfático | 0,002 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 | 0,003 ± 0,002 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,002 ± 0,002 |
| Vaso sanguíneo | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 |
| Macrófago | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 | 0,001 ± 0,001 |
| Citoplasma de Leydig | 0,014 ± 0,001 | 0,012 ± 0,003 | 0,012 ± 0,002 | 0,013 ± 0,003 | 0,012 ± 0,001 | 0,011 ± 0,003 |
| Núcleo de Leydig | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,003 ± 0,001 | 0,002 ± 0,001 |
| Leydig | 0,017 ± 0,001 | 0,014 ± 0,004 | 0,014 ± 0,002 | 0,016 ± 0,003 | 0,015 ± 0,001 | 0,013 ± 0,001 |

Média ± desvio-padrão. PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas. ^{a,b}Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls (p≤0,05).

Tabela 7. Morfometria das células de Leydig em camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*.

| | Controle | Cd | PDRA | Cd + PDRA 100 | Cd + PDRA 200 | Cd + PDRA 300 |
|---|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Diâmetro nuclear (μm) | 4,87 \pm 0,15 ^a | 4,47 \pm 0,14 ^b | 5,09 \pm 0,17 ^a | 5,31 \pm 0,26 ^a | 4,98 \pm 0,31 ^a | 5,09 \pm 0,20 ^a |
| ILS (%) | 0,04 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 |
| Volume nuclear (μm^3) | 60,71 \pm 5,59 ^a | 46,99 \pm 4,67 ^b | 69,27 \pm 7,07 ^a | 71,21 \pm 10,83 ^a | 65,34 \pm 11,63 ^a | 69,13 \pm 8,28 ^a |
| Vol. citoplasmático (μm^3) | 288,85 \pm 43,98 ^a | 206,21 \pm 32,40 ^b | 318,47 \pm 58,30 ^a | 291,22 \pm 35,04 ^{ab} | 263,45 \pm 95,89 ^{ab} | 340,30 \pm 63,19 ^a |
| Volume celular (μm^3) | 349,56 \pm 49,18 ^a | 253,20 \pm 36,27 ^b | 387,74 \pm 61,50 ^a | 362,43 \pm 44,76 ^a | 328,79 \pm 107,23 ^a | 409,43 \pm 70,35 ^a |
| Volume Leydig/T (mL) | 0,017 \pm 0,001 | 0,014 \pm 0,004 | 0,013 \pm 0,003 | 0,015 \pm 0,002 | 0,014 \pm 0,001 | 0,014 \pm 0,004 |
| Volume Leydig/g T (mL) | 0,09 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,02 |
| N células Leydig/T ($\times 10^6$) | 49,26 \pm 7,23 ^{ab} | 56,15 \pm 8,06 ^b | 34,44 \pm 11,40 ^a | 41,78 \pm 3,73 ^{ab} | 47,15 \pm 16,24 ^{ab} | 35,88 \pm 9,16 ^a |
| N células Leydig/gT ($\times 10^6$) | 253,12 \pm 38,02 ^{ab} | 279,82 \pm 37,23 ^b | 191,10 \pm 58,89 ^a | 204,17 \pm 14,23 ^{ab} | 235,04 \pm 84,08 ^{ab} | 174,33 \pm 31,57 ^a |

Média \pm desvio-padrão. PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas; Vol. Citoplasmático = Volume citoplasmático; Volume Leydig/T = Volume de células de Leydig por testículo; Volume Leydig/g T = Volume de células de Leydig por grama de testículo; N células Leydig/T = Número de células de Leydig por testículo; N células Leydig/g T = Número de células de Leydig por grama de testículo; ILS = Índice Leydigossomático.

^{a,b}Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

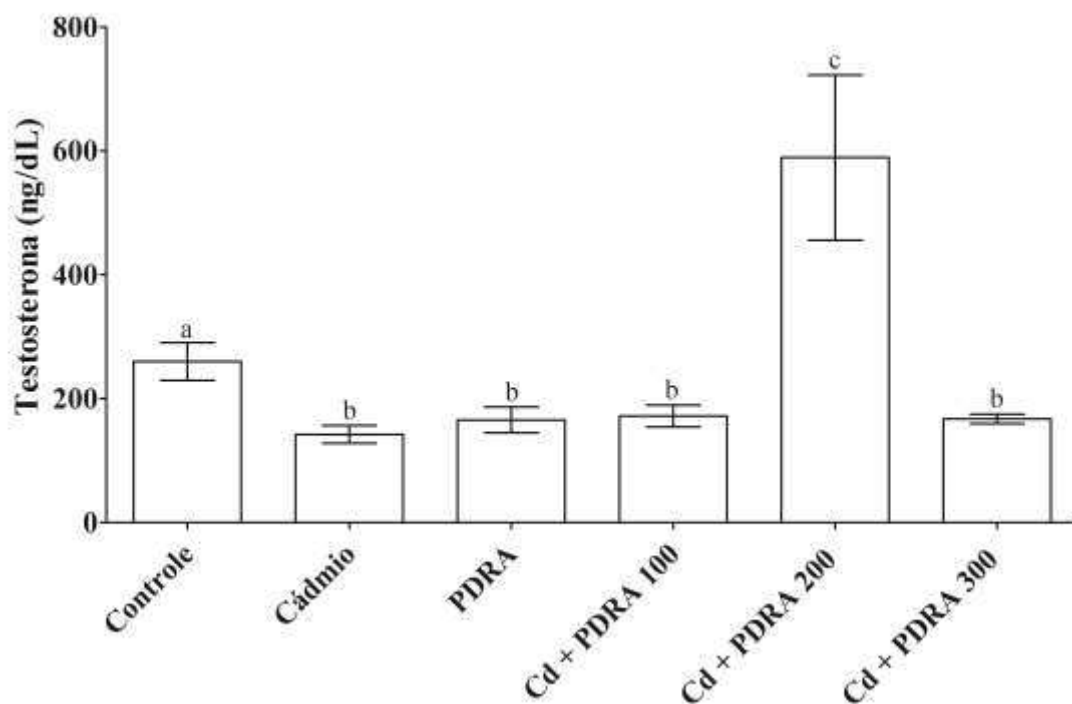


Figura 6. Concentração sérica de testosterona de camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com PDRA de *E. oleracea*. PDRA = Polpa desengordurada rica em antocianinas. ^{ab}Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

Discussão

A baixa concentração de Cd definida para este deveu-se ao fato de que a contaminação ambiental geralmente ocorre em baixas dosagens (Predes et al., 2011). Se a dose de Cd administrada fosse elevada provavelmente o tratamento com PDRA não teria efeito regenerativo nas concentrações avaliadas.

Os valores encontrados para polifenóis e antocianinas totais e atividade antioxidante apresentaram-se inferiores aos relatados por Hogan et al. (2010) no extrato rico em antocianinas. Por outro lado, a concentração de polifenóis e antocianinas e a atividade antioxidante foi maior que a encontrada por Coutinho et al. (2017) em pasta comercial de *E. oleracea*, assim como para o conteúdo de polifenóis encontrado por Petruk et al. (2017). As divergências encontradas com os resultados da literatura podem ser justificadas pelo fato de que a quantidade de compostos fenólicos sofrerem variação de acordo com o estágio de maturação do fruto, as

condições de colheita e o processamento da polpa. Além disso, a adoção de diferentes métodos para as análises dificulta a comparação entre os estudos.

A PDRA apresentou-se como fonte de minerais essenciais, assim como observado por Santos et al. (2014) e Coutinho et al. (2017), com predominância de Ca, seguido de Mg e Mn e com menores concentrações de Cu. Assim, nos animais intoxicados com Cd e tratados com 300 mg/Kg de PDRA, observou-se maior concentração de Ca, Mg e Mn testiculares. Entretanto, o aumento na concentração destes minerais não foi observado nos animais que receberam somente PDRA. Dessa forma, sugere-se que a concentração de minerais testiculares não apresenta alteração em animais sadios quando há suplementação com a polpa. No entanto, em caso de indução de danos teciduais pelo Cd, a concentração dos minerais testiculares eleva-se pela ingestão de 300 mg/Kg de PDRA.

Como o Cd apresenta capacidade de competir com os minerais pelo seu sítio de absorção no duodeno pode levar à redução na concentração testicular destes (Cupertino et al., 2017). A presença de Zn, mesmo em baixa concentração, na PDRA pode estar relacionada à normalização deste metal nos animais que receberam tratamento com 300 mg/Kg de PDRA, anteriormente reduzida pelo Cd. Como o Zn é um mineral essencial para a ocorrência da espermatogênese (Yamaguchi et al., 2009), sugere-se que o consumo de 300 mg/Kg de PDRA, pode ser uma alternativa para reestabelecer o conteúdo de Zn testicular alterado pelo Cd.

O aumento na atividade de SOD, anteriormente reduzida pelo Cd, nos animais que receberam tratamento com PDRA, demonstra a potencial atividade antioxidante da polpa, contra o estresse oxidativo induzido pelo metal. Sabe-se que Zn, Cu e Mn são cofatores de SOD (Djuric et al., 2015) e, assim, a redução na concentração de Zn e Mn testicular causada pelo Cd, pode estar relacionada à redução na atividade da enzima. Entretanto, estes metais também reduziram nos animais tratados com 100 e 200 mg/Kg de PDRA. Assim, o aumento da atividade de SOD nestes animais não está relacionado somente aos minerais, mas provavelmente à redução na geração de EROs após ingestão da PDRA. A redução de Cu nestes mesmos animais e naqueles que receberam somente PDRA, não influenciou na atividade de SOD.

A redução na atividade de CAT após intoxicação pelo Cd também é indicativa de estresse oxidativo, o que pode estar relacionado à saturação enzimática (Aitken e Roman, 2008). Como no tratamento com PDRA observou-se pequena melhoria na

atividade desta enzima, sugere-se que as doses de PDRA testadas não foram capazes de reverter totalmente esta alteração.

A peroxidação lipídica também é um das formas de toxicidade do Cd (Erboga et al., 2015). Entretanto, como a exposição ao Cd e o tratamento com PDRA não aumentaram a concentração de MDA, entende-se que não houve peroxidação lipídica. A eliminação dos lipídios peroxidados se dá através da GST (Aitken e Roman, 2008). Esta enzima também apresenta capacidade de desintoxicação de substâncias nocivas ao organismo (Casalino et al., 2004). Como GST aumentou nos animais que receberam somente PDRA, a suplementação com a polpa demonstra potencial ação contra o estresse oxidativo, na sua segunda linha de defesa, pela estimulação da referida enzima.

Assim, os resultados do presente estudo encontram-se semelhantes aos relatados na literatura. Erboga et al. (2015) observaram que o ácido cafeico (100 mg/Kg *i.p.* por 30 dias) leva ao aumento da atividade de SOD em ratos expostos ao Cd (1mg/Kg subcutâneo por 30 dias). Estes autores também descreveram aumento da atividade de CAT e redução da peroxidação lipídica, associando a ação antioxidante do ácido cafeico com papel protetor frente ao estresse oxidativo induzido pelo Cd.

Adaramoye e Akanni (2016) observaram aumento na atividade de SOD, CAT e GST em ratos tratados com 200 mg/Kg de extrato metanólico da casca de *Artocarpus altilis* por 3 semanas e posteriormente intoxicados com 1,5 mg/Kg de CdCl₂ *i.p.* em duas doses.

Altas concentrações de NO podem estar relacionadas à morte de células germinativas (Sonmez e Tascioglu, 2016). Assim, o aumento de NO nos animais que receberam somente PDRA e naqueles intoxicados com Cd e tratados com 100 mg/Kg de polpa pode apresentar relação ao aumento no percentual de túbulos patológicos nestes animais. Entretanto, túbulos patológicos também foram observados nos demais animais expostos ao Cd nos quais não houve aumento de NO. Dessa forma, a alteração na concentração de NO provavelmente não é o único fator relacionado aos danos teciduais encontrados. Assim, o estresse oxidativo também pode ser uma das causas.

O Cd apresenta capacidade de romper a barreira hematotesticular e com isso causar alterações no epitélio germinativo (Minutoli et al., 2015). Dessa forma, os danos encontrados nos túbulos seminíferos nos animais intoxicados com Cd podem

ser decorrentes da ação do metal na barreira hematotesticular, associado ao menor percentual de túnica própria. Apesar do tratamento com PDRA ter aumentado o percentual de túnica, parâmetro ser importante na proteção do epitélio seminífero, e reduzido o de túbulos com patologias leves, as patologias ainda persistiram. Além disso, o tratamento não evitou a agravação das alterações tubulares. Associado a isto, tem-se também a não redução no percentual de células classificadas com danos nos animais tratados com 100 e 200 mg/Kg de PDRA. Nos animais que receberam somente PDRA observou-se aumento de células com danos o que pode estar relacionado ao excesso de antioxidante. De acordo com Nascimento (2017), a alta concentração de antioxidantes pode levar a atividade pró-oxidante e, conseqüentemente, a alterações testiculares, sendo estas em menor intensidade que aquelas observadas quando os animais são expostos ao Cd.

Em estudo, Leite et al. (2013), foi observado que o tratamento com o pó da semente de *Paullinia cupana* (guaraná), durante 56 dias, levou à redução das alterações em parâmetros morfométricos tubulares causados pelo Cd. Assim, os autores sugerem atividade antioxidante da *Paullinia cupana* frente ao metal. Sonmez e Tascioglu (2016) relatam atividade antioxidante protetora do extrato de semente de uva, rico em proantocianidinas, no testículo de ratos expostos ao Cd. Neste caso, houve atenuação da apoptose induzida pelo metal e os túbulos seminíferos apresentavam morfologia em grande parte normal. Por outro lado, Predes et al. (2016) verificaram que o extrato hidroetanólico de *Arctium lappa* (300 mg/Kg por 56 dias) foi ineficaz frente a lesões testiculares em ratos induzidas pelo Cd (1,2 mg/Kg *i.p.* dose única).

A ação do Cd nas células de Leydig já é conhecida na literatura, com decorrente prejuízo na espermatogênese (Pires et al., 2013). Dessa forma, as alterações nos parâmetros de Leydig após exposição ao Cd, demonstram a sensibilidade destas células ao metal. Após tratamento com PDRA, os parâmetros foram normalizados, o que evidencia atividade curativa da polpa frente a alterações causadas nas células de Leydig. Apesar disso, verifica-se que a função celular não foi reestabelecida nos animais tratados com 100 e 300 de PDRA, visto que a concentração sérica de testosterona manteve-se baixa. O aumento da concentração hormonal nos animais que receberam 200 mg/Kg de PDRA, refletiu na maior

recuperação das células de Leydig, visto que os danos testiculares encontrados são os mesmo que nas demais concentrações de PDRA.

Predes et al. (2011), observaram que o tratamento com extrato de *Ginkgo biloba* (100 mg/Kg por 56 dias) levou à normalização dos parâmetros de Leydig em ratos intoxicados com Cd. Assim, os autores sugerem que o *Ginkgo biloba* apresenta ação antioxidante frente a danos induzidos pelo Cd. Apesar dos danos teciduais, a concentração sérica de testosterona não foi alterada pelo metal. Erboga et al. (2015) observaram aumento na concentração sérica de testosterona e redução da apoptose de células de Leydig após tratamento com ácido cafeico, em animais intoxicados com cádmio.

Conclusões

O tratamento com a PDRA de *E. oleracea*, principalmente na concentração de 300 mg/Kg, apresentou atividade antioxidante de forma a reduzir as alterações tubulares e de células de Leydig provocados pelo metal. Por apresentar-se como fonte de minerais a PDRA elevou a concentração de Ca e Mg, além da atividade de SOD. Portanto, verifica-se que a PDRA apresentou atividade antioxidante diminuindo os danos provocados pelo Cd.

Referências

Adaramoye, O. A.; Akanni, O. O. Protective effects of *Artocarpus altilis* (Moraceae) on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. **Andrologia** 48(2), 152–163, 2016.

Amann, R. P. Sperm production rates. In: Johnson, A. D.; Gomes, W.R. The testis. New York: Academic Press, 1970.

Attal, J.; Courot, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, 3, 219–241, 1963.

Aitken, R. J.; Roman, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1, 15-24, 2008.

Arafa, M. H.; Mohammad, N. S.; Atteia, H. H. Fenugreek seed powder mitigates cadmium-induced testicular damage and hepatotoxicity in male rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 66, 293–300, 2014.

Benoff, S.; Hauser, R.; Marmar, J. L.; Hurley, I. L.; Napolitano, B.; Centola, G. M. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlation with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial inseminations donors, and unselect volunteers). **Molecular Medicine**, 15(7-8), 248-262, 2009.

Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52, 302–310, 1978.

Carvalho, A. V.; Silveira, T. F. F.; Mattietto, R. A.; Oliveira, M. S. P.; Godoy, H. T. Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97, 1467–1474, 2017.

Casalino, E.; Calzaretti, G.; Sablano, C.; Landriscina, C. Molecular inhibitory mechanism of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. **Toxicology**, 179, 37–50, 2002.

Cheng, G. W.; Breen, P. J. Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (Pal) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 116(5), 865–869, 1991.

Coutinho, R. M. P.; Fontes, E. A. F.; Vieira, L. M.; Barros, F. A. R.; Carvalho, A. F. C.; Stringheta, P. C. Physicochemical and microbiological characterization and antioxidant capacity of açai pulps marketed in the states of Minas Gerais and Pará, Brazil. **Ciência Rural**, 47 (1), 1-6, 2017.

Cupertino, M. C.; Novaes, R. D.; Santos, E. C.; Bastos, D. S. S.; Santos, D. C. M.; Fialho, M. C. Q.; Matta, S. L. P. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. **Life Sciences**, 15, 23–30, 2017.

Cupertino, M. C.; Novaes, R. D.; Santos, E. C.; Neves, A. C.; Silva, E.; Oliveira, J. A.; Matta, S. L. P. Differential susceptibility of germ and Leydig cells to cadmium-mediated toxicity: Impact on testis structure, adiponectin levels and steroidogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

Dieterich, S.; Bieligg, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, 101 (1), 33-39, 2000.

Djuric, A.; Begic, A.; Gobeljic, B.; Stanojevic, I.; Ninkovic, M.; Vojvodic, D.; Pantelic A.; Zebic, G.; Prokic, V.; Gejanovic, B.; Stojanovic, I.; Pavlica, M.; Djukic, D.; Saso, L.; Djurdjevic, D.; Pavlovic, M.; Topic, A.; Vujanovic, D.; Stevnovic, I.; Djukic, M. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. **Food and Chemical Toxicology**, 86, 25–33, 2015.

Erboga, M.; Kanter, M.; Aktas, C.; Bozdemir, Y. B.; Erboga, Z. F.; Aktas, E.; Gurel, A. Anti-apoptotic and anti-oxidant effects of caffeic acid phenethyl ester on cadmium-induced testicular toxicity in rats. **Biological Trace Element Research**, 171 (1), 176-184, 2015.

França, L. R.; Russell, L. D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J (Eds). Male reproduction - a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications. 1998. pp. 198-219.

Freitas, R. B.; Novaes, R. D.; Gonçalves, R. V.; Mendonça, B. G.; Santos, E. C.; Ribeiro, A. Q.; Lima, L. M.; Fietto, L. G.; Peluzio, M. C. G.; Leite, J. P. V. *Euterpeedulis* Extract but Not Oil Enhances Antioxidant Defenses and Protects against Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by a High-Fat Diet in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016. DOI: 10.1155/2016/8173876

Gao, P.; Liu, S.; Ye, W.; Lin, N.; Meng, P.; Feng, Y.; Zhang, Z.; Cui, F.; Lu, B.; Xing, B. Assessment on the occupational exposure of urban public bus drivers to bioaccessible trace metals through resuspended fraction of settled bus dust. **Science of The Total Environment**, 508C, 37–45, 2014.

Giri, B. R.; Roy, B. Cysticercus fasciolaris infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver: a strategy for host-parasite cross talk. **Parasitology Research**, 115 (7), 2617-2624, 2016.

Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, 249, 7130–7139, 1974.

Hogan, S.; Chung, H.; Zhang, L.; Li, J.; Lee, Y.; Dai, Y.; Zhou, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from acai. **Food Chemistry**, 118, 208–214, 2010.

Johnsen, S. G. Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 352 hypogonadal males. **Hormones**, 1, 1– 24, 1970.

Johnson, L.; Petty, C. S.; Neaves, W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. **Biology of Reproduction**, 25(1), 217-226, 1981

Karnovsky, M. J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 27, 137A, 1965.

Kim, D.O.; Lee, K. W.; Lee, H. J.; Lee, C. Y. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50 (13), 3713–3717, 2002.

Leite, R. P.; Predes, F. S.; Monteiro, J. C.; Freitas, K. M.; Wada, R. S.; Dolder, H. Advantage of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation on cadmium-induced damages in testis of adult Wistar rats. **Toxicologic Pathology**, 41 (1), 73–79, 2013.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275, 1951.

Matta, S. L. P.; Vilela, D. A. R.; Godinho, H. P.; França, L. R. The Goitrogen 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) Givenduring Testis Development Increases Sertoli

and GermCell Numbers per Cyst in Fish: The Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. **Endocrinology**, 143(3):970–978, 2002.

Melo, F. C.; Matta, S. L. P.; Paula, T. A.; Gomes, M. L.; Oliveira, L. C. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. **Biological Research**, 43 (4), 445–450, 2010.

Minutoli, L.; Micali, A.; Pisani, A.; Puzzolo, D.; Bitto, A.; Rinaldi, M.; Pizzino, G.; Irrera, N.; Galfo, F.; Arena, S.; Pallio, G.; Mecchio, A.; Germana, A.; Bruschetta, D.; Laura, R.; Magno, C.; Marini, H.; Squadrito, F.; Altavilla, D. Research Article Flavocoxid Protects Against Cadmium-Induced Disruption of the Blood-Testis Barrier and Improves Testicular Damage and Germ Cell Impairment in Mice. **Toxicological Sciences**, 148(1), 311–329, 2015.

Mouro, V. G. S.; Menezes, T. P.; Lima, G. D. A.; Domingues, R. R.; Souza, A. C. F.; Oliveira, J. A.; Matta, S. L. P.; Machado-Neves, M. How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? **Biological Trace Element Research**, 2017. DOI: 10.1007/s12011-017-1139-3.

Nascimento, L. S. Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) sobre a morfologia testicular de ratos adultos saudáveis e expostos ao cádmio. Tese (Doutorado)- Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2017.

Novello, A. A.; Conceição, L. L.; Dias, M. M. S.; Cardoso, L. M.; Castro, C. A.; Ricci-Silva, M. E.; Leite, J. P. V.; Peluzio, M. C. G. Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* Mart. in mice. **Journal of Food and Nutrition Research**, 54(2), 101–112, 2015.

Oberholzer, M.; Östreicher, M.; Christen, H.; Brühlmann, M. Methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and Cell Biology**, 105, 333-355, 1996.

Pacheco-Palencia, L. A.; Talcott, S. T.; Safe, S.; Mertens-Talcott, S. Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 3593–3600, 2008.

Petruk, G.; Illiano, A.; Giudice, R. D.; Raiola, A.; Amoresano, A.; Rigano, M. M.; Piccoli, R.; Monti, D. M. Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized

fibroblasts. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 172, 42–51, 2017.

Pires, V. C.; Gollucke, A. P. B.; Ribeiro, D. A.; Lungato, L.; D'Almeida, V.; Aguiar Jr, O. Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: a chronic assay. **British Journal of Nutrition**, 110, 2020–2029, 2013.

Predes, F. S.; Diamante, M. A. S.; Dolder, H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **International Journal of Experimental Pathology**, 91(2), 125–131, 2010.

Predes, F. S.; Monteiro, J. C.; Matta, S. L. P.; Garcia, M. C.; Dolder, H. Testicular Histomorphometry and Ultrastructure of Rats Treated with Cadmium and *Ginkgo biloba*. **Biological Trace Element Research**, 140, 330–341, 2011.

Predes, F. S.; Diamante, M. A. S.; Foglio, M. A.; Dolder, H. Effects of *Arctium lappa* on cadmium-induced damage to the testis and epididymis of adult Wistar rats. **Biological Trace Element Research**, 173 (2), 362-371, 2016.

Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide**, 6, 178–185, 2002.

Russell, L. D.; Ettlín, R. A.; Hikim, A. P. S.; Clegg, E. D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. 1st. ed. Florida: Cache River Press, 1990, p. 1-40.

Santos, V. S.; Teixeira, G. H. A.; Barbosa, F. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): a tropical fruit with high levels of essential minerals-especially manganese-and its contribution as a source of natural mineral supplementation. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, 77(1-3), 80-89, 2014.

Sarban, S.; Kocyigit, A.; Yazar, M.; Isikan, U. E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**, 38, 981–986, 2005.

Satarug, S.; Garrett, S. H.; Sens, M. A.; Sens, D. A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Environmental Health Perspectives**, 118, 182–190, 2010.

Singleton, V. L.; Rossi, J. A. J. Colorimetry of Total Phenolics with 55 Phosmolybdc-phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16, 144–158, 1965.

Sonmez, M. F.; Tascioglu, S. Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. **Toxicology and Industrial Health**, 32 (8), 1486–1494, 2016.

Turner, T. T.; Lysiak, J. J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. **Journal of Andrology**, 29(5), 488–498, 2008.

Yamaguchi, S.; Miura, C.; Kikuchi, K.; Celino, F. T.; Agusa, T.; Tanabe, S.; Miura, T. Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 106, 10859–10864, 2009.

Waughon, T. G. M. Morfometria do fígado e parâmetros bioquímicos sanguíneos de ratos Wistar alimentados com dietas contendo açaí. Tese (Doutorado) - Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

WHO - Exposure to cadmium: A major public health concern. WHO, 2010. <http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf?ua=1>

4. Considerações finais

Efeitos agudos do Cd após intoxicação por diferentes vias e formas de administração

- A exposição aguda ao Cd leva ao bioacúmulo deste metal independente da via pela qual foi administrado, entretanto na via oral fracionada a acumulação do metal é maior.
- A via de administração não interfere na redução de Ca e Cu testiculares, enquanto que a via *i.p.* dose única leva a redução na concentração de Mn e Zn.
- A via oral tanto dose única quanto fracionada levam a redução na atividade de SOD.
- O Cd causa alterações em parâmetros tubulares testicular e redução na concentração sérica de testosterona e na viabilidade celular sendo estes mais intensos quando o metal é administrado via oral fracionado.

Efeitos crônicos do Cd após exposição aguda e tratamento com óleo e PDRA de *E. oleracea*

- Os efeitos crônicos observados após intoxicação aguda via oral fracionada do Cd compreendem danos tubulares, com aumento no percentual de túbulos patológicos, alteração na estereologia das células de Leydig e redução na concentração sérica de testosterona.
- A concentração testicular de Mn e Zn reduzem após a exposição ao Cd, assim como a atividade de SOD e CAT.
- O tratamento com óleo de *E. oleracea* levou a aumento na concentração testicular de Mn e Zn e elevação na atividade de SOD e CAT. A PDRA apresenta-se como fonte de minerais, principalmente Ca, Mg e Mn. O tratamento com PDRA eleva a concentração destes minerais com aumento na atividade de SOD.
- Após o tratamento com óleo de *E. oleracea* há redução do percentual de túbulos patológicos e de células germinativas em processo de morte celular, associado a recuperação nos parâmetros de células de Leydig e aumento na concentração sérica de testosterona.

- O tratamento com PDRA reduz o percentual de túbulos com patologias leves, mas não de patologias graves.
- O óleo de *E. oleracea* reduz o percentual de células com danos, já o tratamento com PDRA reduz apenas na dose 300 mg/Kg.
- Parâmetros de células de Leydig são recuperados após tratamento com o óleo e a PDRA de *E. oleracea*. No entanto somente o óleo elevou a concentração sérica de testosterona em todas as doses testadas.
- O óleo de *E. oleracea* apresenta efeito curativo frente as alterações testiculares induzidas pelo Cd.
- A PDRA de *E. oleracea* apresenta ação antioxidante regenerativa diminuindo os danos testiculares provocados pela exposição ao Cd.
- Assim, verifica-se que o tratamento com óleo apresentou ser mais eficaz que a PDRA, na ação antioxidante frente a intoxicação testicular induzida pelo Cd.