

DIANE COSTA ARAUJO

**AÇÃO DA POLPA E DO ÓLEO DE JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius) NOS
TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS SWISS EXPOSTOS AO CÁDMIO**

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*.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta

Coorientadora: Janaina da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A663a
2023
Araujo, Diane Costa, 1991-
Ação da polpa e do óleo de juçara (*Euterpe edulis* Martius)
nos testículos de camundongos Swiss expostos ao cádmio /
Diane Costa Araujo. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (93 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.102>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Testículos - Histologia. 2. Reprodução. 3. Morfometria.
4. *Euterpe edulis*. 5. Toxicologia. 6. Metais pesados.
7. Espermatogênese em animais. I. Matta, Sérgio Luis Pinto da,
1950-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 573.655

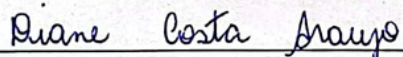
DIANE COSTA ARAUJO

**AÇÃO DA POLPA E DO ÓLEO DE JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius) NOS
TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS SWISS EXPOSTOS AO CÁDMIO**

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*.

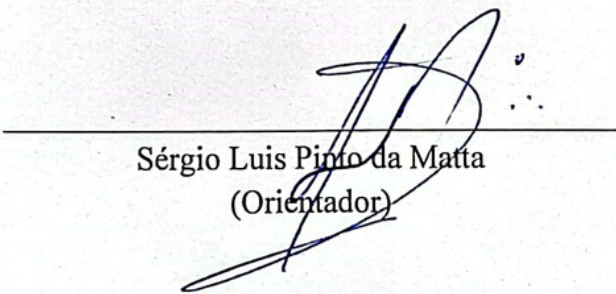
APROVADA: 11 de dezembro de 2023.

Assentimento:



Diane Costa Araujo

(Autor)



Sérgio Luis Pinto da Matta

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus pela minha vida e pela oportunidade de realizar esse sonho.

Aos meus pais, Manoel e Lucinéia, por todo apoio e incentivo durante o doutorado. Obrigada por me encorajarem a buscar um curso superior e por todo esforço que fizeram para que isso fosse possível. Aos meus irmãos, Aline, Bruno e Ronan e ao meu sobrinho Arthur por todo companheirismo. Ao meu namorado Victor, por todo apoio, incentivo e companheirismo durante nossa jornada.

Ao meu querido orientador Sérgio, pela orientação e ensinamentos que levarei pra vida. Pelo cafezinho de sempre e pelas conversas e aprendizados. A realização desse sonho foi possível porque você esteve presente nessa caminhada. Obrigada por tudo!

Aos amigos e companheiros de laboratório, Fran, Jana e João, por toda ajuda durante o experimento, mas acima de tudo, pela nossa amizade. Obrigada por fazerem essa jornada mais alegre e divertida.

À Amanda, minha amiga e parceira da vida, com quem tive o prazer de compartilhar a graduação e depois a pós-graduação. Obrigada por nunca medir esforços para me ajudar e pela parceria durante essa jornada. Tenho muito orgulho da pessoa e da profissional que você se tornou.

À Janaina, por ter aceitado ser minha coorientadora. Você é uma pessoa incrível. Obrigada por todo ensinamento e pelas contribuições para a realização deste trabalho. E por sempre estar disponível para me auxiliar.

À Vivi, por ter acreditado em mim para a realização deste trabalho e por todas as contribuições durante todo o processo. Serei eternamente grata!

À professora Kyvia, pela orientação durante a graduação e por ter me apresentado a pós-graduação. E também por ter fornecido a juçara utilizada nesse experimento.

Agradeço também as parcerias que foram feitas para a realização deste trabalho. Em especial ao Roberto e a Isabela do laboratório do professor Sérgio de Paula. Ao professor João Paulo Leite e sua aluna Nivea do Departamento de Bioquímica. Aos professores Juraci Alves de Oliveira, Mariana Machado Neves e Leandro Licursi de Oliveira do Departamento de Biologia Geral. A professora Reggiani Vilela Gonçalves e ao professor Jorge Dergan do Departamento de Biologia Animal. Ao professor Antônio Jacinto Demuner do Departamento de Química. Obrigada por cederem os laboratórios, reagentes e equipamentos para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições na correção deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Biologia Geral e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral.

Aos funcionários do Biotério Central da UFV, Juliano e Adão. Aos animais utilizados no experimento, fundamentais para a realização deste trabalho. Ao Biotério Setorial do Departamento de Biologia Geral e Estrutural.

Agradeço também a todos que tive a oportunidade de conviver durante esses seis anos em Viçosa e que de alguma forma foram importantes para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. A bolsa concedida pela CAPES tornou possível minha estadia em Viçosa durante o doutorado.

RESUMO

ARAUJO, Diane Costa. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2023. **Ação da polpa e do óleo de juçara (*Euterpe edulis* Martius) nos testículos de camundongos Swiss expostos ao cádmio.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadora: Janaína da Silva.

A palmeira *Euterpe edulis*, popularmente conhecida como juçara ou açaí da Mata Atlântica, é uma planta originária do Brasil, seus frutos são ricos em compostos bioativos, como antocianinas, flavonoides e ácidos graxos essenciais. A ação antioxidante de *E. edulis* tem sido objeto de estudos em relação à proteção contra a toxicidade induzida por metais pesados, como o cádmio (Cd). O Cd induz estresse oxidativo, o que pode danificar lipídios, proteínas e DNA. Esses danos estão diretamente relacionados com alterações testiculares, incluindo alterações morfológicas e estruturais, comprometendo a espermatogênese. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação das polpas e do óleo de *E. edulis*, nos testículos de camundongos Swiss adultos. Os animais foram divididos em 15 grupos experimentais. O grupo controle negativo recebeu água destilada, o grupo controle positivo recebeu 4,28 mg/kg de cloreto de cádmio (CdCl) durante sete dias. O grupo controle polpa desengordurada (PD), polpa bruta (PB) e óleo receberam 300 mg/kg de PD, 300 mg/Kg de PB e 150 mg/kg de óleo de *E. edulis*, respectivamente. O grupo veículo recebeu Tween 20. Os demais grupos receberam 4,28 mg/kg de CdCl durante sete dias e a partir do oitavo dia foram tratados com 100, 200 ou 300 mg/kg de PD ou PB e 50,100 ou 150mg/kg de óleo de *E. edulis* durante 42 dias. Todo o tratamento foi via oral, por gavagem. Os testículos destinados a análises histomorfométricas e do estado de estresse oxidativo, foram coletados após eutanásia dos animais 49 dias depois do início do período experimental. Os parâmetros biométricos, corporal e testicular, não diferiram entre os tratamentos. Os tratamentos com a PD, a PB e o óleo de *E. edulis* foram capazes de normalizar o percentual de epitélio seminífero, de lúmen e de túnica própria bem com a altura de epitélio e diâmetro do lúmen que haviam sido previamente alterados pelo Cd. Verificou-se que o número de células germinativas, que havia diminuído pela exposição ao Cd, foi restabelecido após o tratamento com diferentes da PD, da PB e do óleo. Além disso, os tratamentos com a PD, PB e o óleo de *E. edulis* reverteram o aumento do diâmetro nuclear, volume nuclear, celular e da célula de Leydig observados após a intoxicação com o metal. Os resultados do estudo mostram que os tratamentos com a PD, PB e com o óleo de *E. edulis* apresentaram efeito terapêutico contra danos causados ao epitélio seminífero pela exposição ao Cd, além de diminuir o avanço de patologias graves após a intoxicação.

Palavras-chave: Reprodução; Toxicologia; Metal Pesado; Antioxidante

ABSTRACT

ARAÚJO, Diane Costa. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2023. **Action of jussara pulp and oil (*Euterpe edulis* Martius) on the testis of Swiss mice exposed to cadmium.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-adviser: Janaína da Silva.

The palm tree *Euterpe edulis*, popularly known as jussara or açai from the Atlantic Forest, is a plant native to Brazil. Its fruits are rich in bioactive compounds such as anthocyanins, flavonoids, and essential fatty acids. The antioxidant action of *E. edulis* has been the subject of studies regarding protection against toxicity induced by heavy metals such as cadmium (Cd). Cd induces oxidative stress, which can damage lipids, proteins, and DNA. These damages are directly related to testicular alterations, including morphological and structural changes, compromising spermatogenesis. In this context, the aim of this study was to evaluate the action of *E. edulis* pulp and oil on the testicles of adult Swiss mice. The animals were divided into 15 experimental groups. The negative control group received distilled water; the positive control group received 4.28 mg/kg of cadmium chloride (CdCl) for seven days. The pulp de-fatted control group (PD), raw pulp group (PB), and oil group received 300 mg/kg of PD, 300 mg/kg of PB, and 150 mg/kg of *E. edulis* oil, respectively. The vehicle group received Tween 20. The remaining groups received 4.28 mg/kg of CdCl for seven days, and from the eighth day onwards, they were treated with 100, 200, or 300 mg/kg of PD or PB, and 50, 100, or 150 mg/kg of *E. edulis* oil for 42 days. All treatments were administered orally via gavage. The testicles designated for histomorphometric and oxidative stress analyses were collected after euthanasia of the animals 49 days after the start of the experimental period. Biometric parameters, both body and testicular, did not differ between treatments. Treatments with PD, PB, and *E. edulis* oil were able to normalize the percentage of seminiferous epithelium, lumen, and tunica propria as well as the epithelial height and lumen diameter that had been previously altered by Cd. It was found that the number of germ cells, which had decreased due to Cd exposure, was restored after treatment with different doses of PD, PB, and oil. Furthermore, treatments with PD, PB, and *E. edulis* oil reversed the increase in nuclear diameter, nuclear volume, cellular volume, and Leydig cell observed after metal intoxication. The study results show that treatments with PD, PB, and *E. edulis* oil had a therapeutic effect against damage caused to the seminiferous epithelium by Cd exposure, in addition to reducing the progression of serious pathologies after intoxication.

Keywords: Reproduction; Toxicology; Heavy metal; Antioxidant

SUMÁRIO

1. Introdução	9
1.1. Metais pesados	9
1.2. Cádmio	9
1.3. Testículo	11
1.4. Espermatogênese	12
1.5. Efeitos do cádmio nos testículos	13
1.6. <i>Euterpe edulis</i>	13
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Referências	16
Artigo 1	22
As polpas desengordurada e bruta de <i>Euterpe edulis</i> reduzem alterações testiculares causados pela exposição subaguda ao cádmio em camundongos Swiss adultos	22
Resumo	22
1. Introdução	23
2. Material e métodos	24
2.1. Coleta e preparo dos frutos de <i>E. edulis</i>	24
2.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais nas polpas de <i>E. edulis</i>	24
2.3. Determinação da atividade antioxidante das polpas de <i>E. edulis in vitro</i>	25
2.4. Identificação de componentes dos extratos derivatizados da PD e da PB de <i>E. edulis</i>	26
2.5. Animais e tratamentos	26
2.6. Coleta de amostras, biometria corporal e testicular	27
2.7. Processamento histológico	28
2.8. Histopatologia	28
2.9. Morfometria e estereologia testicular	28
2.9.1. Morfometria tubular	28
2.9.2. Morfometria intertubular	30
2.9.3. Morfometria e estereologia da célula de Leydig	31
2.10. Parâmetros bioquímicos	31
3. Resultados	32
3.1. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e proporção dos componentes presentes na PD e PB de <i>E. edulis</i>	32
3.2. Biometria corporal e testicular	34
3.3. Histopatologia	35
3.4. Histomorfometria tubular	39
3.5. Histomorfometria intertubular	40
3.6. Parâmetros bioquímicos	49
4. Discussão	51
5. Conclusões	56
6. Referências	57
Artigo 2	63

Efeito terapêutico do óleo de <i>Euterpe edulis</i> sobre a integridade testicular de camundongos intoxicados com cádmio	63
Resumo	63
1. Introdução	64
2. Material e métodos	65
2.1. Extração do óleo de <i>E. edulis</i>	65
2.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais no óleo de <i>E. edulis</i>	65
2.3. Determinação da atividade antioxidante do óleo <i>in vitro</i>	66
2.4. Identificação de componentes derivatizados do óleo de <i>E. edulis</i>	66
2.5. Animais e tratamentos	67
2.6. Coleta de amostras, biometria corporal e testicular	68
2.7. Processamento histológico.....	69
2.8. Histopatologia.....	69
2.9. Morfometria e estereologia testicular	69
2.9.1. Morfometria tubular	69
2.9.2. Morfometria intertubular.....	71
2.9.3. Morfometria e estereologia da célula de Leydig.....	72
2.10. Parâmetros bioquímicos.....	72
2.11. Análises estatísticas	73
3. Resultados	73
3.1. Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos, atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos do óleo de <i>E. edulis</i>	73
3.2. Biometria corporal e testicular.....	74
3.3. Histopatologia.....	75
3.4. Histomorfometria tubular	77
3.5. Histomorfometria intertubular	78
3.6. Análises bioquímicas	83
4. Discussão	84
5. Conclusões.....	87
6. Referências bibliográficas	89
Conclusões Gerais	93

1. Introdução

1.1. Metais pesados

Os metais pesados são elementos químicos com peso atômico alto e densidade maior que 5g/cm^3 , tais como mercúrio, chumbo, cádmio e arsênio, que podem ser tóxicos para organismos vivos em concentrações elevadas (Wirth & Mijal, 2010; Wu et al., 2017). Eles são liberados na natureza por atividades industriais, poluição atmosférica e descarte inadequado de resíduos (Tchounwou et al., 2012; Ramos-Trevino et al., 2017). Esses metais não apresentam qualquer função biológica conhecida e podem se acumular nos tecidos biológicos ao longo do tempo, causando danos ao sistema reprodutor masculino (Rehman et al., 2018).

Estudos científicos têm demonstrado que a exposição a metais pesados pode impactar negativamente o aparelho reprodutor masculino. Desse modo, o chumbo pode interferir na produção de hormônios sexuais, como a testosterona, levando a problemas de fertilidade (Dolati et al., 2020). O mercúrio também foi associado a efeitos adversos, incluindo redução da qualidade do esperma e alterações na morfologia dos espermatozoides (Martinez et al., 2014). Além disso, o cádmio pode causar danos a arquitetura testicular e alterar a atividade de enzimas antioxidantes (Predes et al., 2016; Mouro et al., 2019). Esses estudos destacam a importância de evitar a exposição excessiva a metais pesados e de adotar medidas para minimizar seus efeitos negativos sobre a saúde reprodutiva masculina.

1.2. Cádmio

O cádmio (Cd), elemento da tabela periódica número atômico 48 e massa atômica de 112,4, é classificado como um metal pesado extremamente tóxico (Genchi et al., 2020). O Cd é encontrado na crosta terrestre em concentrações que variam entre 0.1-0.5 $\mu\text{g/g}$ (Thevenod & Lee, 2013), além de também estar presente como subproduto da extração de outros metais como: Zn, Pb e Cu (Bernhoft, 2013). Fontes naturais de emissão de Cd são representadas por erupções vulcânicas e queimadas (ATSDR, 2012). Por ser um elemento que não é degradado, a concentração deste metal persiste no meio ambiente o que representa um risco para a saúde pública (Thévenod e Lee, 2013). A ação antropogênica é um componente importante nesse processo (Rani et al., 2014; Li et al., 2015).

A crescente preocupação com a saúde pública é devido aos efeitos tóxicos do Cd, como meia-vida prolongada, baixa taxa de excreção e tendência a acumular-se em tecidos moles, como o fígado e os rins (Rani et al., 2014). A população de forma geral está exposta ao

Cd por meio da ingestão de água e alimentos contaminados e inalação (passiva e ativa) da fumaça de cigarro que contém alta concentração de Cd. A exposição ocupacional comumente ocorre na produção de baterias e pigmentos que usam Cd e na mineração (Siu et al., 2009; Li et al., 2015).

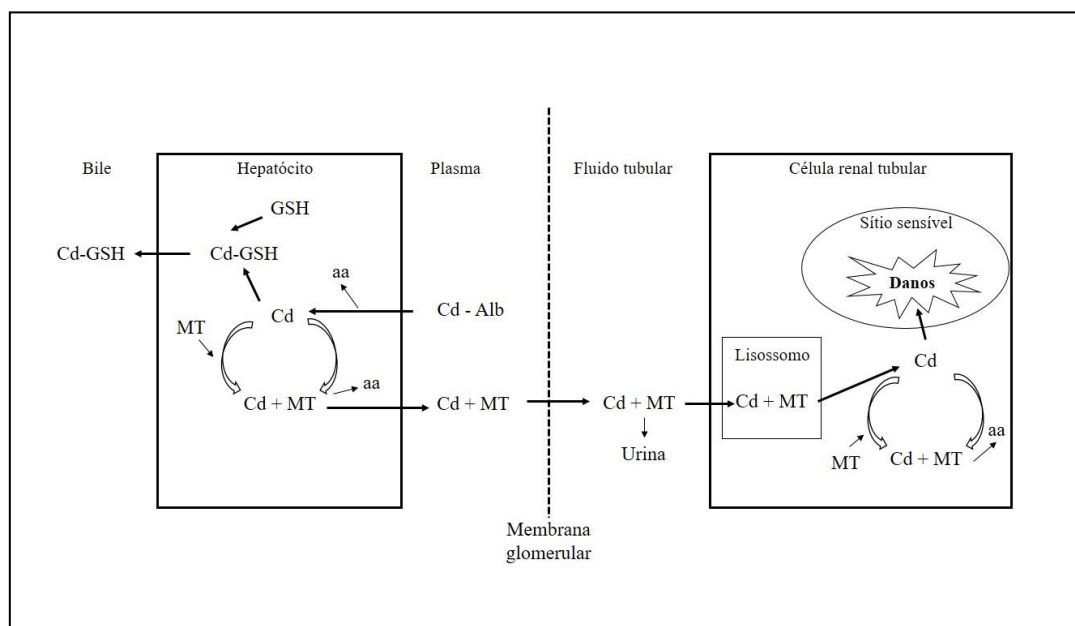
O Cd entra no organismo especialmente pelos pulmões e pelo trato gastrointestinal (ATSDR, 2012). Embora a absorção pelos pulmões apresente maior eficácia (entre 5-50%), a absorção pelo intestino (entre 1-10%) representa a principal via de entrada em humanos (Thévenod e Lee, 2013). A absorção de Cd pelos pulmões está relacionada com sua concentração no ar e o tamanho das partículas inaladas (Świergosz-Kowalewska, 2011).

O Cd livre (Cd^{2+}) ou complexado entra na célula por meio de canais iônicos, transportadores, bombas de ATP ou por meio de receptores (Thévenod et al., 2019). O transportador de metal divalente (DMT1) e os transportadores de zinco (ZIP8 e ZIP14) são algumas das proteínas envolvidas na captação de Cd pelos enterócitos (Vesey, 2010; Thévenod et al., 2019). O receptor vanilóide de potencial transitório 5 e 6 (TRPV5 e 6) também estão envolvidos no transporte de Cd no intestino e nos rins (Vesey, 2010).

Após ser absorvido, seja nos pulmões ou no intestino, o Cd atinge a circulação sanguínea e é transportado para o fígado ligado à proteína albumina, a proteína de alto teor de tiol e proteínas plasmáticas de baixo peso molecular, dentre outras (Świergosz-Kowalewska, 2011). O Cd complexado com a albumina é captado pelos hepatócitos, degradado nos lisossomos e o Cd livre é liberado no citoplasma (Figura 1) (Vesey, 2010). A liberação de Cd no citoplasma estimula a expressão das metalotioneínas, às quais se liga, formando o complexo Cd-metalotioneína (Cd-MT) (Yang e Shu, 2015). As metalotioneínas são proteínas ricas em resíduos de cisteína e que apresentam papel importante na detoxificação contra metais pesados (Bertin e Averbek, 2006; Freisinger e Vašák, 2013). Tem sido atribuído a essas proteínas a capacidade de alterar a toxicidade do Cd, podendo prevenir alguns efeitos tóxicos (Sabolić et al., 2010; Nordberg e Nordberg, 2022).

O complexo Cd-MT adentra os lisossomos das células dos túbulos proximais e o complexo é desfeito (Vesey, 2010). O Cd livre é transportado para o citoplasma e vai ligar-se novamente a metalotioneínas produzidas pelas células dos túbulos proximais, acumulando na forma complexada (Cd-MT) (Thévenod e Lee, 2013). Apenas uma pequena quantidade de Cd é eliminada pela urina, sendo seu tempo de meia vida em humanos de 20 a 40 anos (Thévenod e Lee, 2013).

Figura 1. Metabolismo do cádmio.



Fonte: Nordberg e Nordberg, 2022.

1.3. Testículo

O testículo é a gônada masculina coberta por uma cápsula de tecido conjuntivo, denominada albugínea (Svingen e Koopman, 2013). É responsável pela produção de testosterona e espermatozoides, importantes para a manutenção das características secundárias masculinas e sobrevivência da espécie (Russell e França, 1995).

O parênquima testicular pode ser funcionalmente dividido em compartimento tubular e intertubular. O compartimento tubular é representado pelos túbulos seminíferos que por sua vez são compostos pela túnica própria, o epitélio seminífero e o lúmen tubular. Nos túbulos seminíferos, são observados três tipos celulares distintos: células mioides ou peritubulares, células de Sertoli e células germinativas (Smith e Walker, 2014). As células mioides circundam os túbulos seminíferos formando, juntamente com a lâmina basal, a túnica própria e apresentam capacidade de contração, auxiliando a expulsão dos espermatozoides para o suporte das células germinativas em desenvolvimento e produção de fatores de proliferação e diferenciação para as células germinativas (Russell et al., 1990; Russell & França, 1995; Foley, 2001). Além disso, por meio de junções celulares especializadas entre as células de Sertoli adjacentes, o epitélio seminífero é dividido em dois ambientes, o basal e o adluminal (Russell et al., 1990). As células germinativas estão sequencialmente organizadas desde a base

do túbulo até o lúmen, representando os diferentes estágios de desenvolvimento e junto com as células de Sertoli, constituem o epitélio germinativo (Mathur et al., 2011; Lara et al., 2017)

No compartimento intertubular, além das células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona, também são encontrados vasos sanguíneos e linfáticos e células do tecido conjuntivo, como fibroblastos e macrófagos (Foley, 2001). A ação parácrina da testosterona ocorre quando a mesma entra nas células de Sertoli, onde desempenha determinadas funções durante o processo espermatogênico, como manutenção da barreira hematotesticular e da adesão entre os espermatozoides e a célula de Sertoli, regulação da meiose e também regula a liberação dos espermatozoides maduros (Ren et al., 2019).

1.4. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo complexo e altamente coordenado que acontece nos túbulos seminíferos (Lara et al., 2018). Esse processo é orquestrado pelas células de Sertoli e é fundamental para a produção contínua de espermatozoides no decorrer da vida reprodutiva de indivíduos machos, além de garantir a transmissão da informação genética para a próxima geração (Hess e França, 2008; Lara et al., 2018).

A espermatogênese pode ser dividida em três fases: a mitótica, a meiótica e espermiogênica (Russell et al., 1990). Durante a fase mitótica as espermatogônias se dividem formando as espermatogônias tipo A, cuja função é a manutenção da linhagem de células germinativas, e espermatogônias tipo B, que entram na próxima fase de desenvolvimento (Lara et al., 2018). As espermatogônias tipo B passam pela meiose e após duas divisões consecutivas dão origem a quatro células haploides denominadas espermátides (Smith e Walker, 2014). Por fim, as espermátides irão se diferenciar em espermatozoides que serão liberados no lúmen tubular (Creasy, 2002). A duração desse processo varia de acordo com a espécie, sendo de 56 dias em ratos e 42 dias em camundongos (França e Russell, 1998; Creasy, 2002).

O processo espermatogênico é altamente sensível a fatores hormonais sendo a testosterona essencial para que a espermatogênese ocorra de forma adequada (Lara et al., 2018). Sob estímulo do hormônio luteinizante as células de Leydig produzem a testosterona que se difunde até os túbulos seminíferos (Huhtaniemi e Teerds, 2018). Este hormônio atua na manutenção da barreira hematotesticular, meiose, adesão entre as células de Sertoli e as células germinativas e na liberação dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos (Smith e Walker, 2014).

1.5. Efeitos do cádmio nos testículos

A exposição (ocupacional e ambiental) a diversos poluentes tóxicos está relacionada a diversas alterações no sistema reprodutor masculino e feminino. Tais alterações podem causar infertilidade (Messányi et al., 2020), revelando a alta sensibilidade do testículo a exposição ao Cd (Bhardwaj et al., 2020). A toxicidade reprodutiva induzida pelo Cd é amplamente descrita na literatura (Cupertino et al., 2017; Yang et al., 2022; Yi et al., 2022).

A exposição a 1 mg/kg de Cd, via intraperitoneal, causou a redução na concentração sérica de testosterona e na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além de ter interferido na homeostase de elementos essenciais como zinco, ferro e cobre (Djuric et al., 2015). Cupertino et al., (2017) observaram alterações histopatológicas e morte de células germinativa nos túbulos seminíferos após a exposição a uma dose única de 1,4 e 1,8 mg/kg de Cd. Além disso, Adamkovicova et al. (2014) relatam que a administração de Cd induz o aumento do peso do testículo e epidídimo, espessamento do epitélio seminífero, degeneração celular e necrose nos túbulos seminíferos, dilatação vascular e congestão no intertúbulo.

Sabe-se que a toxicidade do Cd está associada à sua capacidade de, indiretamente, gerar espécies reativas de oxigênio, o que resulta no aumento da peroxidação lipídica e finalmente danos a macromoléculas celulares e apoptose (Liu et al., 2008; Liu et al., 2009). A exposição a 1.5 mg/Kg e 30 mg/Kg de Cd, via intraperitoneal e oral durante sete dias, causou diminuição na atividade de SOD e aumento da atividade da glutathione-S-transferase (GST) após exposição ao metal (Mouro et al., 2019a). Momeni e Eskandari (2019) relataram diminuição da atividade de SOD e CAT após injeção intraperitoneal única de 5mg/kg de Cd.

Os componentes do intertúbulo também são alvos da toxicidade do Cd. Cupertino et al., (2017) observaram a presença de infiltrado inflamatório, congestão vascular, hemorragia e aumento na distribuição de mastócitos no compartimento intertubular após exposição ao Cd. Além disso, as células de Leydig também são sensíveis aos efeitos tóxicos do Cd. Predes et al. (2011), relataram alterações nos parâmetros das células de Leydig após intoxicação por Cd, como redução do diâmetro nuclear, no volume nuclear e volume citoplasmático.

1.6. *Euterpe edulis*

E. edulis é uma palmeira da família Arecaceae nativa da Mata Atlântica, popularmente conhecida como juçara (Cardoso et al., 2015), encontrada desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Schulz et al., 2016; Torres et al., 2018). O fruto da juçara tem se destacado

por sua semelhança com o açaí da Amazônia (*Euterpe oleracea*), amplamente consumido no Brasil (Barroso et al., 2018; Cardoso et al., 2018). Além disso, a intensa exploração do palmito proveniente da *E. edulis* tem contribuído para a degradação do meio ambiente (Galetti e Fernandez, 1998).

Considerando que a extração do palmito representa um risco para a extinção da palmeira, a utilização do fruto da juçara na alimentação humana, apresenta-se como uma boa oportunidade para atenuar a exploração, por não demandar a retirada da palmeira da floresta (Cardoso et al., 2018). Além disso, o fruto da juçara surge como uma excelente alternativa nutricional e econômica, uma vez que seu consumo vem aumentando no Brasil (Barroso et al., 2018; Silva e Reis, 2019).

A palmeira produz um fruto redondo roxo, com semente marrom-clara, que tem maior valor nutricional sendo mais adocicada em comparação com o açaí e, por isso, a polpa obtida pela maceração dos frutos é muito apreciada por consumidores de açaí (Borges et al., 2011; Ribeiro et al., 2018; Garcia et al., 2019). O fruto da juçara é rico em flavonoides, principalmente as antocianinas, responsáveis por sua coloração roxa e por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatória (Garcia et al., 2019). A cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo são as principais antocianinas encontradas no fruto da juçara. Além das antocianinas, foram encontrados outros compostos fenólicos como, rutina, ácido elágico e quercetina (Vieira et al., 2017; Garcia et al., 2019).

Freitas et al., (2016) demonstraram que a polpa bruta e a polpa desengordurada de *E. edulis* foi capaz de atenuar a doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos, reduzindo a hipotrofia de hepatócitos, infiltrado inflamatório, esteatose e peroxidação lipídica no fígado. Em outro estudo, a juçara foi capaz de prevenir degeneração do tecido hepático, mutagenicidade, inflamação e controle do ciclo celular induzidos pela administração de ácidos graxos durante a gestação e lactação (Argentato et al., 2019). O extrato da juçara também apresentou efeito protetor contra a úlcera gástricas induzida pelo etanol em ratos (Torres et al., 2018). Nascimento (2017) verificou que o tratamento com 300, 600 e 900 mg/kg do extrato hidroalcolico de *E. edulis* não alterou parâmetros testiculares de ratos Wistar após 56 dias de tratamento.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação da polpa desengordurada, da polpa bruta e do óleo de *E. edulis* sobre o testículo de camundongos adultos intoxicados com cádmio.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter a polpa bruta tamponada com ácido cítrico de *E. edulis*;
- Obter a polpa desengordurada tamponada com ácido cítrico de *E. edulis*;
- Obter o óleo de *E. edulis* a partir da polpa bruta;
- Avaliar a biometria corporal e testicular;
- Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES) e Leydigossomático (ILS);
 - Mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos, diâmetro luminal e a altura do epitélio seminífero;
 - Obter a proporção volumétrica e volume dos componentes tubulares e intertubulares;
 - Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo;
 - Realizar a contagem da população celular dos túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo espermatogênico e obter as razões celulares entre os tipos celulares;
 - Calcular o número de células de Sertoli por testículo, por grama de testículo e a sua capacidade total de suporte.
 - Calcular o rendimento geral da espermatogênese, o rendimento espermático diário e a produção espermática diária por testículo e por grama de testículo.
 - Realizar a morfometria das células de Leydig e calcular o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Realizar avaliação histopatológica do testículo;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, e glutathion S-transferase;
- Mensurar a concentração de malondialdeído e de óxido nítrico nos testículos.

3. Referências

Adamlovicova M, Toman R, Cabaj M, Massanyi P, Martiniakova M, Omelka R, Krajcovicova V, Duranova H. Effects of Subchronic Exposure to Cadmium and Diazinon on Testis and Epididymis in Rats. *Sci World J.* 2014(3):1-9. 2014.

Argentato PP, Pisani LP, De Rosso VV, Soares GR, Silva MJD, Vilegas W, Ribeiro DA. Polyphenol rich fruit attenuates genomic instability, modulates inflammation and cell cycle progression of offspring from fatty acid intake maternal. *Pathophysiology.* 26(3-4):369-374. 2019.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cadmium, 487p. 2012.

Barroso MES, Oliveira BG, Pimentel EF, Pereira PM, Ruas FG, Andrade TU, Lenz D, Scherer R, Fronza M, Ventura JA, Vaz BG, Kondratyuk TP, Romão W, Endringer DC. Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius – Juçara palm fruits. *Food Res Int.* 116:985-993. 2018.

Bernhoff RA. Cadmium Toxicity and Treatment. *Sci World J.* 3:1-7. 2013.

Bertin G, Averbek D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie.* 88(11):1549-59. 2006.

Bhardwaj JK, Panchal H, Saraf P. Cadmium as a testicular toxicant: A Review. *J Appl Toxicol.* 1–13. 2020.

Borges GSC, Vieira FCK, Copetti C, Gonzaga LV, Zambiasi RC, Filho JM, Fett R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Res Int.* 44:128–2133. 2011.

Cardoso AL, Liz S, Rieger DK, Farah ACA, Vieira FGK, Assis MAA, Di Pietro PF. An update on the biological activities of *Euterpe edulis* (Juçara). *Planta Med.* 84(8):487-499. 2018.

Cardoso LM, Novaes RD, Castro CA, Novello AA, Gonçalves RV, Ricci-Silvas ME, Ramos HJO, Peluzio MCG, Leite JPV. Chemical composition, characterization of anthocyanins and antioxidant potential of *Euterpe edulis* fruits: applicability on genetic dyslipidemia and hepatic steatosis in mice. *Nutr Hosp.* 32(2):702-709. 2015.

Creasy DM. Histopathology of the male reproductive system II: interpretation. *Curr Protoc Toxicol.* Chapter 16: Unit 16 4. 2002.

Cupertino MC, Novaes RD, Santos EC, Bastos DSS, Santos DCM, Fialho MCQ, Matta SLP. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. *Life Sci.* 15:23–30. 2017.

Djuric A, Begic A, Gobeljic B, Stanojevic I, Ninkovic M, Vojvodic D, Pantelic A, Zebic G, Prokic V, Dejanovic 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 Chem Toxicol.* 86:25-33. 2015.

Dolati P, Khodabandeh Z, Zamiri MJ, Jamhiri I, Mehrabani D. The effect of lead acetate and quercetin on the tight and gap junctions in the mouse testis. *Biol Trace Elem Res.* 198(2):535-543. 2020.

Foley GL. Overview of male reproductive pathology. *Toxicol Pathol.* 29(1):49-63. 2001.

França LR, Russell LD. The testis of domestic animals. In: *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications. 198 – 219. 1998.

Freisinger E, Vašák. Cadmium in metallothioneins. *Met Ions Life Sci.* 11:339-371. 2013.

Freitas RB, Novaes RD, Gonçalves RV, Mendonça BG, Santos EC, Ribeiro AQ, Lima LM, Fietto LG, Peluzio MCG, Leite JPV. *Euterpe edulis* extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2016.

Galetti M, Fernandez JC. Palm heart harvesting in the Brazilian Atlantic Forest: changes in industry structure and the illegal trade. *J Appl Ecol.* 35:294-301.1998.

Garcia JAA, Corrêa RCG, Barros L, Pereira C, Abreu RMV, Alves MJ, Calhelha RC, Bracht A, Peralta RM, Ferreira ICFR. Chemical composition and biological activities of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit by-products, a promising underexploited source of high-added value compounds. *J Funct Foods.* 55:325-332. 2019.

Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. Effects of Cadmium Toxicity. *Int J Environ Res Public Health.* 17(11):3782. 2020.

Hess RA, França LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol.* 636:1-15. 2008.

Huhtaniemi I, Teerds K. Leydig cell. In M. K. Skinner, *Encyclopedia of Reproduction.* 1(2):30–38. Academic Press: Elsevier.

Lara, N. L. M.; Costa, G. M. J.; Avelar, G. F.; Lace, S. M. S. N.; Hess, R. A.; França, L. R. Testis physiology: overview and histology. *Encyclopedia of Reproduction*, 1, 105 – 116, 2017.

Li Y, Wu J, Zhou W, Gao E. Association between environmental exposure to cadmium and human semen quality. *Int J Environ Health Res*. 26(2):175-86. 2015.

Liu J, Qian SY, Guo Q, Jiang JJ, Waalkes MP, Mason RP, Kadiiska MB. Cadmium generates reactive oxygen- and carbon-centered radical species in rats: 3 Insights from in vivo spin-trapping studies. *Free Radic Biol Med*. 45(4): 475–481. 2008.

Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 238(3):209-14. 2009.

Martinez CS, Escobar AG, Torres JGD, Brum DS, Santos FW, Alonso MJ, Salaices M, Vassallo DV, Peçanha FM, Leivas FG, Wiggers GA. Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats. *Journal Toxicol Environ Health*. 77:143–154. 2014.

Massányi P, Massányi M, Madeddu R, Stawarz R, Norbert Lukác. Effects of Cadmium, lead, and mercury on the structure and function of reproductive organs. *Toxics*. 8(4):94. 2020.

Mathur PP, D’Cruz SC. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian J Androl*. 13(4):585-91. 2011.

Momeni HR, Eskandari N. Curcumin protects the testis against cadmium-induced histopathological damages and oxidative stress in mice. *Hum Exp Toxicol*. 39(5):653-661. 2020.

Mouro VGS, Martins ALP, Silva J, Menezes TP, Gomes MLM, Oliveira JA, Melo FCSA, Matta SLP. Subacute testicular toxicity to cadmium exposure intraperitoneally and orally. *Oxid Med Cell Longev*. 2019(3):3429635. 2019a.

Mouro VGS, Melo FCSA, Martins ALP, Gomes MLM, Oliveira GM, Freitas MBD, Demuner AJ, Leite JPV, Matta SLP. *Euterpe oleracea* (Martius) oil reverses testicular alterations caused after cadmium administration. *Biol Trace Elem Res*. 1-16. 2020.

Mouro VGS, Siman VA, Silva J, Dias FCR, Damasceno EM, Cupertino MC, Melo FCSA, Matta SLP. Cadmium-induced testicular toxicity in mice: subacute and subchronic route-dependent effects. *Biol Trace Elem Res*. 193(2):466-482. 2019b.

Nascimento, L. S. Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis Martius*) sobre a morfologia testicular de ratos adultos sadios e expostos ao cádmio. Tese

(Doutorado)- Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2017.

Nordberg M, Nordberg GF. Metallothionein and cadmium toxicology-historical Review and Commentary. *Biomol.* 12(3):360. 2022.

Predes FS, Monteiro JC, Matta SLP, Garcia MC, Dolder H. Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and *Ginkgo biloba*. *Biol Trace Elem Res.* 140(3):330-41. 2011.

Ramos- Treviño J, Bassol-Mayagoitia S, Ruiz-Flores P, Espino-Silva PK, Saucedo-Cárdenas O, Villa-Cedillo AS, Nava-Hernández MP. *In Vitro* evaluation of damage by heavy metals in tight and gap junctions of Sertoli cells. *DNA Cell Biol.* 36(10):829-836. 2017.

Rani A, Jumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res.* 24(4):378-399. 2014.

Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem.* 119(1):157-184. 2018.

Ren Y, Shao W, Zuo L, Zhao W, Qin H, Hua Y, Lu D, Mi C, Zeng S, Zu L. Mechanism of cadmium poisoning on testicular injury in mice. *Oncol Lett.* 18(2):1035-1042. 2019.

Ribeiro LO, Pereira RNC, Tonon RV, Cabral LMC, Santiago MCPA, Vicente AA, Teixeira JAC, Matta VM, Freitas SP. Antioxidant compounds recovery from juçara residue by thermal assisted extraction. *Food Chem.* 73:68-73. 2018.

Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. 1990. Histological And histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater.

Russell LD, França LR. Building a testis. *Tissue and Cell*, 27 (2), 129 – 147, 1995.

Sabolić I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals.* 23(5):897-926. 2010.

Schulz M, Borges GSC, Gonzaga LV, Costa ANO, Fett R. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. *Food Res Int.* 89:14-26. 2016.

Silva JZ, Reis MS. Consumption of *Euterpe edulis* fruit by wildlife: implications for conservation and management of the Southern Brazilian Atlantic Forest. *An Acad Bras Ciênc.* 91(1):1-20. 2019.

Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 238(3): 240–249. 2009.

Smith LB, Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Deve Biol.* 30. 2 – 13. 2014.

Svingen T, Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27(22):2409-26. 2013.

Świergosz-Kowalewska R. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc Res Tech.* 55(3):208-22. 2011.

Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Exp Suppl.* 101:133-64. 2012.

Thévenod F, Fels J, Lee WK, Zarbock R. Channels, transporters and receptors for cadmium and cadmium complexes in eukaryotic cells: myths and facts. *Biometals.* 32(3):469-489.

Thévenod F, Lee WK. Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. *Met Ions Life Sci.* 11:415-90. 2013.

Torres OJM, Santos OJ, Moura RS, Serra HO, Ramos VP, Melo SPC, Loureiro CMB. Activity of *Orbignya phalerata* and *Euterpe edulis* in the prevention and treatment of peptic ulcer in rats. *Arq Bras Cir Dig.* 31(3):1-4. 2018.

Vesey DA. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: Focus on the interaction with essential metals. *Toxicol Lett.* 198(1):13-9. 2010.

Vieira GS, Marques ASF, Machado MTC, Silva VM, Hubinger MD. Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultraperformance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI–MS) in jussara (*Euterpe edulis*) extracts. *J Food Sci Technol.* 54(7):2135–2144. 2017.

Wirth JJ, Mijal RS. Adverse Effects of low-level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst Biol Reprod Med.* 56(2):147-167. 2010.

Wu X, Guo S, Wang H, Zhou S, Li L, Chen X, Wang G, Liu J, Ge HS, Ge RS. A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Sci Rep.* 7(1):6337. 2017.

Yang SH, Chen ST, Liang C, Shi YH, Chen QS. Effects of cadmium exposure on Leydig cells and blood vessels in mouse testis. *Int J Environ Res Public Health.* 19(4):2416. 2022.

Yi L, Shang XJ, Lv L, Wang Y, Zhang J, Quan C, Shi Y, Liu Y, Zhang L. Cadmium-induced apoptosis of Leydig cells is mediated by excessive mitochondrial fission and inhibition of mitophagy. *Cell Death Dis.* 13(11):928. 2022.

Artigo 1

As polpas desengordurada e bruta de *Euterpe edulis* reduzem alterações testiculares causados pela exposição subaguda ao cádmio em camundongos Swiss adultos

Resumo

O cádmio (Cd) é um metal pesado tóxico de ocorrência natural no meio ambiente e representa risco à saúde humana. A exposição ao metal tem sido associada a diversos danos ao sistema reprodutor masculino, podendo inclusive levar à infertilidade. Assim, estudos têm sido realizados com espécies vegetais com possível ação antioxidante contra as alterações testiculares causadas pelo Cd. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da polpa desengordurada (PD) e da polpa bruta (PB) de *Euterpe edulis*, popularmente conhecida como juçara, no testículo de camundongos expostos ao Cd. 60 camundongos Swiss foram divididos aleatoriamente em 10 grupos experimentais. O grupo controle negativo recebeu apenas água destilada; o grupo controle positivo recebeu 4,28 mg/kg de Cd e os grupos PD 300 e PB 300 receberam 300 mg/kg de PD e PB, respectivamente. Os demais grupos receberam 4,28 mg/kg de solução aquosa de cloreto de cádmio (CdCl_2), via oral durante sete dias. Após a exposição ao Cd, os animais receberam oralmente por gavagem 100, 200 e 300 mg/kg de PD ou PB de *E. edulis* durante 42 dias. Após o tratamento com a PD e a PB (100, 200 e 300 mg/kg), observou-se a normalização da proporção de epitélio seminífero, túnica própria e de lúmen, anteriormente alterados pela exposição ao Cd. Ademais, verificou-se a recuperação da altura de epitélio seminífero e do diâmetro de lúmen, com valores semelhantes ao controle, nos animais tratados com todas as doses da PD e da PB de *E. edulis*. A PD (100 e 300 mg/kg) e a PB (100 e 200 mg/kg) preservaram o número de espermatogônias, espermatócitos em preleptóteno, em paquíteno e espermátides arredondadas, que haviam reduzido após a intoxicação com o Cd. Além disso, os parâmetros da célula de Leydig, como volume nuclear, do citoplasma e da célula de Leydig, que haviam aumentado após exposição ao metal, foram mantidos semelhantes ao controle nos grupos tratados com 100, 200 e 300 mg/kg de PD. Os danos às células de Leydig podem ter comprometido a produção de testosterona. Somado a isso temos o espessamento da túnica própria que pode ter dificultado a entrada de metabólitos dentro do túbulo, interferindo no funcionamento da célula de Sertoli e conseqüentemente, no desenvolvimento das células germinativas. O tratamento com a PD e PB de *E. edulis* foi capaz de reduzir os danos causados ao epitélio seminífero. A PB foi mais eficaz contra o avanço de patologias graves enquanto a PD foi mais eficaz contra os danos sobre as células de Leydig.

Palavras-chave: juçara, antioxidante, toxicologia, histomorfometria, reprodução

1. Introdução

As atividades industrial e agrícola são responsáveis pela liberação de diversos poluentes ambientais (Massányi et al., 2020). Dentre esses poluentes destaca-se o cádmio (Cd), um metal altamente tóxico e carcinogênico (WHO, 2010; Wang et al., 2020). Por não ser biodegradável, o Cd pode acumular-se no solo, aumentando o risco de contaminação humana por meio da sua inserção na cadeia alimentar (Cuypers et al., 2010). Assim, a ingestão de água e alimentos contaminados são as principais vias de contaminação não ocupacional pelo Cd, juntamente com a inalação da fumaça do cigarro (Rani et al., 2014).

A toxicidade do Cd está relacionada à sua meia-vida longa e tendência de acumulação em diversos órgãos, como fígado, rins, cérebro e testículos (Rani et al., 2014; Zhang et al., 2019). O testículo é um órgão sensível a exposição ao Cd, que pode inclusive, causar infertilidade (Siu et al., 2009; Bhardwaj et al., 2020). A toxicidade reprodutiva do Cd está relacionada ainda com sua capacidade de induzir estresse oxidativo (Liu et al., 2009; Da Silva et al., 2021). Apesar de não participar de reações de oxido-redução, o Cd pode indiretamente causar estresse oxidativo, o que acarreta o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Liu et al., 2009). Esse processo ocorre por diferentes mecanismos, como a inibição de enzimas antioxidantes, competição com minerais essenciais e redução na concentração de glutathiona-S-transferase (GSH) (Cuypers et al., 2010; Thévenod & Lee, 2013; Rani et al., 2014; Mouro et al., 2019a). Além disso, vários estudos têm relatado alterações estruturais e funcionais nos testículos induzidas pela intoxicação com o Cd (Predes et al., 2010; Djuric et al., 2015; Cupertino et al., 2017, Mouro et al., 2019a, Mouro et al., 2019b).

Devido à toxicidade do Cd induzida pelo estresse oxidativo, tem crescido o número de estudos utilizando produtos naturais com capacidade de atuar como antioxidantes no combate às alterações testiculares causadas pelo Cd (Predes et al. 2011; Predes et al., 2016; Elmallah et al., 2017; Mahmoudi et al., 2018). Dentre estes, a *Euterpe edulis* Martius, comumente conhecida como juçara ou açaí da Mata Atlântica, surgiu como uma importante fonte natural de antioxidantes, devido ao alto teor de antocianinas (Freitas et al., 2016; Garcia et al., 2019), principalmente cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo (Vieira et al., 2017). A juçara também apresenta outros compostos fenólicos como o ácido ferúlico e gálico, além de catequina e quercetina, e alto teor lipídico, sendo o ácido linoleico (ômega 6) e o ácido oleico (ômega 9) os principais ácidos graxos encontrados (Borges et al., 2011).

Efeitos benéficos do consumo da polpa dos frutos de *E. edulis* têm sido descritos na literatura. A ingestão da polpa desengordurada da *E. edulis* atenuou os efeitos causados pela doença hepática gordurosa não alcoólica, induzida por meio da dieta, em ratos Wistar, reduzindo o infiltrado inflamatório, a esteatose e a peroxidação lipídica no tecido hepático (Freitas et al., 2016). Além disso, suplementação com a juçara modulou o perfil de ácidos graxos séricos contribuindo para a redução do risco de doença metabólica através da modulação epigenética em monócitos de indivíduos obesos (Santamarina et al., 2019).

Até o momento, não foram encontrados estudos que avaliem os efeitos da polpa bruta (PB) e desengordurada (PD) de *E. edulis* em diferentes dosagens na reprodução masculina após exposição subaguda ao Cd. Em função das propriedades apresentadas, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com a PD e PB de *E. edulis* nos testículos de animais intoxicados com Cd, de forma subaguda.

2. Material e métodos

2.1. Coleta e preparo dos frutos de *E. edulis*

Os frutos do *E. edulis* foram coletados no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-PESB (20°54'S e 42°32'W), importante área remanescente de Mata Atlântica localizada na região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, Brasil. A colheita, pós-colheita e despulpa dos frutos foram realizadas conforme orientações da Embrapa para os frutos do *E. oleracea*, o açaí da Amazônia (EMBRAPA, 2005).

A polpa dos frutos de *E. edulis* foi liofilizada e acondicionada em sacos de polietileno com revestimento de folha de alumínio para impedir a passagem da luz e armazenada em temperatura ambiente até o início do tratamento. A polpa liofilizada foi utilizada na obtenção do óleo de juçara e a polpa remanescente, chamada de polpa desengordurada, sofreu evaporação completa do éter etílico para posteriormente ser administrada aos animais via gavagem (Freitas et al., 2016). Para isso, a polpa desengordurada (PD) e a polpa bruta (PB) foram ressuspensas em uma solução com ácido cítrico (Novello et al., 2015) e ofertadas aos animais.

2.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais nas polpas de *E. edulis*

Para determinação de fenólicos totais foi utilizado o padrão quercetina. Uma curva analítica foi construída com concentrações de quercetina variando de 0 a 30 ppm (n = 7 pontos) preparadas a partir da solução estoque de quercetina (100 mg L⁻¹) em água. Para

verificar a mudança de cor na placa de porcelana foram pipetados 340 μL das soluções de quercetina, em diferentes concentrações, aos quais foram adicionados 10 μL da solução de cloreto férrico 1%. Também foi utilizada a placa de porcelana para observar mudança de cor dos extratos ao reagir com cloreto férrico. Para leitura no aplicativo PhotoMetrix[®], foram utilizados 2,0 mL das soluções de quercetina e dos extratos, respectivamente, aos quais foram adicionados 70 μL da solução de cloreto férrico 1% (p/v). O teor de fenólicos totais também foi determinado utilizando a técnica de espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis). Para construção da curva analítica, foram utilizadas as mesmas soluções de quercetina preparadas para obtenção da curva analítica usando o PhotoMetrix[®]. Tanto para obtenção da curva analítica como para determinação do teor de fenólicos totais nos extratos, foram utilizados 2,0 mL das soluções de quercetina e dos extratos separadamente, aos quais foram adicionados 70 μL da solução de cloreto férrico 1% (p/v). A leitura foi realizada em $\lambda = 294$ nm.

2.3. Determinação da atividade antioxidante das polpas de *E. edulis in vitro*

A determinação de antioxidantes na PD e PB de *E. edulis* foi realizada utilizando como padrão o hidroxitoluenobutilado (BHT), de acordo com a metodologia citada por Yen e Chen (1995), com modificações. Inicialmente, foi construída uma curva analítica com diferentes concentrações de BHT (0; 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,0 mg L^{-1} ; n = 6 pontos) preparadas a partir da solução estoque de BHT 100 mg L^{-1} em água. Para isso, foram utilizados 6 tubos de ensaios de 25 mL para os quais foram transferidas alíquotas da solução padrão de BHT (0, 10, 25, 50, 75 e 100 μL), adicionados 2,5 mL da solução de ferricianeto de potássio 1% (p/v), 2,5 mL do tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH = 6,6) e a mistura foi incubada a 45 °C por 20 min. A seguir, foram adicionados 2,0 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e os volumes foram completados para 10,0 mL com água ultrapura.

Na placa de porcelana foram pipetados 340 μL das diferentes concentrações de BHT, aos quais foram adicionados 10 μL da solução de cloreto férrico 1% (p/v) para verificar a mudança de cor. Para leitura no aplicativo PhotoMetrix[®], uma alíquota de 2,0 mL de cada concentração de BHT e dos extratos separadamente, foi transferida para um tubo de ensaio de 25 mL ao qual foram adicionados 2,5 mL da solução de ferricianeto de potássio 1% (p/v); 2,5 mL do tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH = 6,6) e a mistura foi incubada a 45 °C por 20 min. A seguir, foram adicionados 2,0 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e 1,0 mL de água ultrapura para completar o volume para 10,0 mL.

O poder redutor nas polpas também foi determinado por UV-Vis ($\lambda = 706$ nm) com uma curva analítica obtida utilizando as mesmas soluções de BHT preparadas para obtenção da curva analítica usando o PhotoMetrix[®], utilizando um volume de 2,0 mL (das soluções de BHT e dos extratos (Figura 5)) e 70 μ L da solução de cloreto férrico 1% (p/v).

2.4. Identificação de componentes dos extratos derivatizados da PD e da PB de *E. edulis*

Para realizar a derivatização foram transferidos 3 mg de amostra da PD e PB para vial de fundo cônico, foi adicionado 60 μ L de piridina anidra e a mistura foi agitada no vórtex. A esta mistura foram adicionados 100 μ L de BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) - Sigma – Aldrich (St. Louis, EUA). O frasco contendo a mistura foi submetido ao aquecimento em banho de glicerina a 70 °C, durante 30 minutos e, após esfriar cada amostra foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) de acordo com Moldoveanu e David (2018). A identificação dos componentes dos extratos derivatizados foi através da similaridade ($90, \geq$), dos espectros de massas comparados com a biblioteca (Nist-11 e Wiley-7).

2.5. Animais e tratamentos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – 058/2016). Foram utilizados 60 camundongos Swiss em idade reprodutiva (70 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral com controle de iluminação ambiente (12h claro/12h escuro) e temperatura (24°C). Após o período de aclimação (14 dias), os animais foram divididos aleatoriamente em dez grupos experimentais (n = 6 animais/grupo), pesados e colocados em gaiolas coletivas. Assim, os animais de cada grupo receberam diariamente, por gavagem, 0,7 ml de água destilada durante 49 dias (controle negativo); 4,28 mg/kg de cloreto de cádmio (CdCl_2) durante 7 dias e água destilada a partir do oitavo dia (controle positivo); água destilada durante 7 dias e 300 mg/kg de PD e PB durante 42 dias (PD 300 e PB 300). Os demais animais receberam 4,28 mg/kg de CdCl_2 por gavagem durante sete dias e a partir do oitavo dia receberam 100, 200 ou 300 mg/kg de PD e PB de *E. edulis*. Os grupos experimentais e os tratamentos estão dispostos na Figura 1.

A dose e modo de administração escolhido basearam-se no estudo de Mouro et al. (2019a) que verificaram que a dose fracionada de Cd administrada oralmente causa maiores

danos ao testículo. As doses da polpa de *E. edulis* usadas nesta pesquisa foram escolhidas com base no estudo com a polpa de *E. oleracea* (Mouro, 2018).

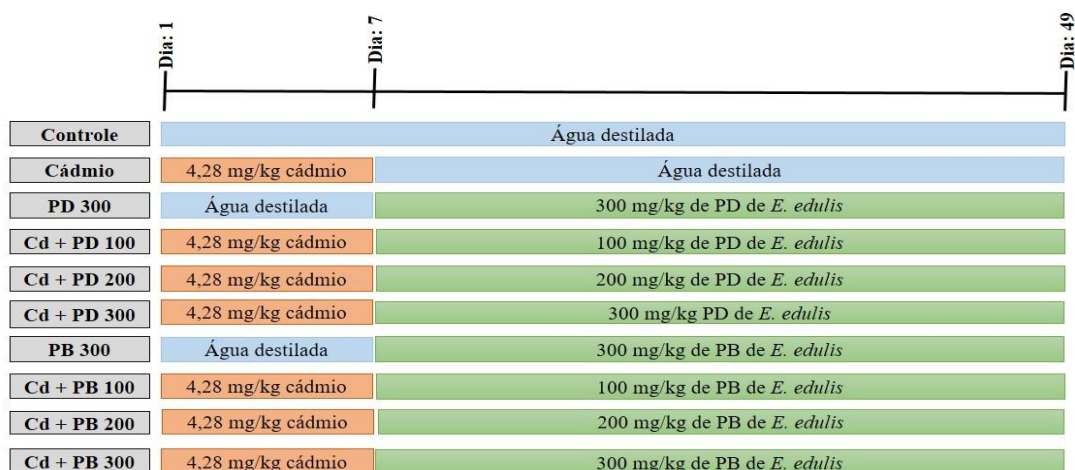


Figura 1. Grupos experimentais e tratamentos. Cd: cádmio; PD: polpa desengordurada; PB: polpa bruta.

2.6. Coleta de amostras, biometria corporal e testicular

Ao final do período de 49 dias os animais foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte) e eutanasiados. Primeiramente, os animais foram sedados e anestesiados com tiopental 30mg/kg intraperitoneal. A anestesia foi aprofundada seguida da coleta do sangue por meio de punção cardíaca levando os animais à morte por exsanguinação. Em seguida foi feita a abertura da cavidade abdominal a partir de incisão na linha alba para dissecação e obtenção dos testículos. O testículo direito foi congelado para realização das análises de estresse oxidativo. O testículo esquerdo foi destinado ao processamento histológico.

Para determinar o peso do parênquima testicular a albugínea foi retirada do testículo fixado, pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular, foi calculado o índice gonadossomático (IGS) de acordo com Amann (1970) a partir da equação: $IGS (\%) = PG / PC \times 100$, onde PG= Peso total das gônadas e PC= Peso corporal. Baseado nos pesos do parênquima testicular e corporal, foi calculado o índice parenquimossomático (IPS), a partir da equação: $IPS (\%) = PTPT / PC \times 100$, onde PTPT = Peso do parênquima dos dois testículos e PC= Peso corporal (Mouro et al., 2020). 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) (Mouro et al., 2020).

2.7. Processamento histológico

Fragmentos de um dos testículos destinados ao estudo em microscopia de luz foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm, mantendo-se um intervalo de 13 cortes entre secções, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens dos tecidos foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa ImageJ.

2.8. Histopatologia

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

2.9. Morfometria e estereologia testicular

2.9.1. Morfometria tubular

As proporções tubulares foram obtidas por contagem de 2.660 pontos projetados em 10 imagens capturadas das preparações histológicas, com ampliação de 200X. 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 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 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. O diâmetro do lúmen foi determinado ao subtrair-se o diâmetro tubular da média das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero (Mouro et al., 2020).

A área de túbulo seminífero foi calculada pela seguinte equação: $ArTS = \pi \cdot (RT)^2$, 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 (Mouro et al., 2020).

O comprimento total 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.

A população de células germinativas e células de Sertoli foram estimadas pela contagem de 10 secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do epitélio germinativo segundo o método de morfologia tubular de Berndtson (1977). Foram contados os seguintes tipos celulares: espermatogônias (EGA), espermatócitos primários em preleptóteno (PLL), em paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (EA) e células de Sertoli (CS) com nucléolos bem evidentes.

Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos dos tipos celulares estudados, para cada animal, em aumento de 400x. Para a espermatogônia, que apresenta núcleo ovoide, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre o diâmetro nuclear maior e menor. Como o núcleo da célula de Sertoli é irregular, foi medido o seu nucléolo. O número de células de

Sertoli foi corrigido para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Assim, foram contabilizadas exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente. Devido a variação de tamanho a contagem dos tipos celulares foi corrigida pela fórmula proposta por Abercrombie (1946) e modificada por Amann e Almquist (1962). A partir dos valores corrigidos foi possível quantificar os seguintes coeficientes: mitose espermatogonial (PLL/EGA), rendimento meiótico (EA/PQ), rendimento geral da espermatogênese (EA/EGA), índice da célula de Sertoli (EA/CS) e a capacidade total de suporte da célula de Sertoli ((EGA+PLL+PQ+EA)/CS). O número total de células de Sertoli foi obtido pelo número corrigido de nucléolos e o comprimento total de túbulos seminíferos (Hochereau-de-Reviers e Lincoln, 1978). O número de células de Sertoli por grama de testículo foi determinado a partir do número de células de Sertoli por testículo e do peso bruto de um testículo.

A produção espermática diária (PED) foi determinada de acordo com Amann e Almquist (1962) e Amann (1970): $PED = (VTS \times EAR) / (DC \times AST \times EC)$, onde: VTS= Volume total de túbulos seminíferos (μm^3), EAR = Número corrigido de espermátides arredondadas, DC = Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias), AST = Área da secção transversal do túbulo seminífero (μm^2) e EC = Espessura do corte histológico (μm). A produção espermática diária por grama de testículo (PED/g) foi obtida a partir da equação: $PED/gT = PED / PT$, onde PT = peso testicular. O ciclo do epitélio seminífero em camundongos dura 9 dias (Russell et al., 1990), sendo uma constante biológica espécie-específica.

A reserva espermática testicular (RET) foi calculada com base na população celular de EA, a fórmula descrita por Amann (1970) e Berndtson (1977) foi adaptada. Assim a $RET = (\text{comprimento total dos túbulos seminíferos/ espessura do corte}) \times (\text{número corrigido de EA})$.

2.9.2. *Morfometria intertubular*

A proporção dos componentes intertubulares foi realizada pela contagem de 1.000 pontos por animal, projetados em imagens do intertúbulo dos testículos. Os 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 equação:

proporção do elemento nos testículos x peso parênquima dos testículos/100 (Mouro et al., 2020).

2.9.3. *Morfometria e estereologia da célula de Leydig*

Foi medido o diâmetro nuclear médio, em μm , das células de Leydig em aumento de 400x, totalizando 30 núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram mais esféricos e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir das equações abaixo, foram calculados então o volume nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig (VL), em μm^3 : $\text{VNL} = 4/3 \pi R^3$, onde R= Raio nuclear. $\text{VCL} = \%CL \times \text{VNL} / \%NL$, onde $\%CL$ = Proporção volumétrica de citoplasma de Leydig e $\%NL$ = Proporção volumétrica de núcleo de Leydig. $\text{VL} = \text{VNL} + \text{VCL}$ (Russell et al., 1990).

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. 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 nos testículos foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam nos testículos (μm^3)/volume de uma célula de Leydig. Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo foi utilizada a equação: 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: $\text{ILS} = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular/PC} \times 100$, onde PC= peso corporal (Mouro et al., 2020).

2.10. Parâmetros bioquímicos

Para a avaliação enzimática o testículo foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7.4) na proporção de 100 mg de órgão para 1000 μL . A suspensão foi centrifugada (12000 rpm à 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade de enzimas antioxidantes, concentração de óxido nítrico, malondialdeído e proteína total.

A atividade enzimática da catalase (CAT) foi mensurada segundo Dieterich et al. (2000) pela taxa de queda da absorbância, em 60 segundos, do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) e homogenato de tecido em

espectrofotômetro ($\lambda = 240\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio e $240 = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados expressos em U CAT/mg proteína.

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa, em 570 nm, baseado na capacidade dessa enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- e H_2O_2 e assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000).

Para determinação dos níveis de malondialdeído (MDA), as amostras foram colocadas para reagir com solução de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e HCl 0,25 N) por 40 min em banho-maria (90°C). A formação de TBARS foi monitorada a 535 nm em um espectrofotômetro de microplaca (PowerWave X) (Buege e Aust, 1978).

O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico (NO) é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5% H_3PO_4 . Desta forma, 50 μL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro de exploração de microplacas. A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em μM (Ricart-Jané et al., 2002; Droge, 2002).

2.11. Análises estatísticas

Antes de serem analisados, os valores percentuais médios obtidos foram transformados em arco-seno. Os parâmetros foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para os dados paramétricos e os dados não paramétricos foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis. Foi utilizado o software PRISM, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

3. Resultados

3.1. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e proporção dos componentes presentes na PD e PB de *E. edulis*

A análise de fenólicos totais presentes nos extratos da PD e PB de *E. edulis* encontram-se na Tabela 1. Os valores obtidos na determinação da atividade antioxidante da PD e PB de *E. edulis* são observados na Tabela 2. Pode-se notar que a PB teve valores

superiores à PD com relação ao conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Nota-se que os valores obtidos pelo aplicativo PhotoMetrix® são semelhantes aos obtidos pela técnica de espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis). Após a obtenção dos cromatogramas foi possível identificar os ácidos graxos, ácido cítrico e isocítrico presentes na PD e PB (Tabela 3).

Tabela 1. Compostos fenólicos totais na PD e PB de *E. edulis*.

Polpa de <i>E. edulis</i>	Absorbância	(mg quercetina 100 g ⁻¹) PhotoMetrix®	(mg quercetina 100 g ⁻¹) UV-Vis
PD	0,365	3247,32 ± 1,69	3275,80 ± 1,11
PB	0,405	3751,73 ± 1,40	3763,59 ± 1,51

Os valores foram obtidos usando o aplicativo PhotoMetrix® e o UV-Vis. Média ± desvio-padrão. PD: polpa desengordurada; PB: polpa bruta.

Tabela 2. Atividade antioxidante da PD e PB de *E. edulis*.

Polpa <i>E. edulis</i>	Absorbância	(mg g ⁻¹) App	(mg g ⁻¹) UV-Vis
PD	0,335	60,57 ± 0,25	60,37 ± 0,09
PB	0,343	62,36 ± 0,19	62,36 ± 0,09

Os valores foram obtidos usando o aplicativo PhotoMetrix® e o UV-Vis. Média ± desvio-padrão. PD: polpa desengordurada; PB: polpa bruta.

Tabela 3. Proporção dos componentes presentes na PD e PB de *E. edulis*.

TR**	Compostos	Nomenclatura	PB*	PD*
32,300	-	Ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico (Ácido cítrico)	32,02	62,46
33,563	-	Ácido 1-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxílico (Ácido isocítrico)	-	23,89
37,420	C16:0	Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)	18,37	-
41,300	C18:2	Ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoico (Ácido linoleico)	14,76	-
41,420	C18:1	Ácido (9Z)-octadec-9-enóico (Ácido oleico)	34,85	13,65

*(% polpa desengordurada (PD) e polpa bruta (PB)); ** Tempo de retenção (TR)

3.2. Biometria corporal e testicular

Os dados de biometria corporal e testicular dos animais intoxicados com Cd e tratados com a polpa desengordurada (PD) encontram-se na Tabela 4 e com a polpa bruta (PB) na Tabela 5. Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros analisados.

Tabela 4. Biometria corporal e testicular de camundongos expostos ao Cd e tratados com a PD de *E. edulis*.

	Controle	Cd	PD 300	Cd+PD100	Cd+PD200	Cd+PD300
PC	37,26±8,34	39,88±4,07	39,17±2,33	34,87±1,67	40,34±2,04	41,39±4,51
PT	0,21±0,03	0,20±0,06	0,21±0,03	0,18±0,02	0,21±0,04	0,25±0,03
PP	0,18±0,03	0,18±0,06	0,016±0,03	0,15±0,02	0,17±0,04	0,21±0,02
PA	0,03±0,02	0,02±0,01	0,05±0,03	0,03±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01
IGS	0,53±0,06	0,49±0,14	0,53±0,08	0,51±0,08	0,49±0,11	0,60±0,05
IPS	0,48±0,08	0,45±0,13	0,40±0,08	0,42±0,06	0,42±0,11	0,43±0,19

Média ± desvio-padrão. Cd: cádmio; PD: polpa desengordurada; PC: peso corporal; PT: peso testicular; PP: peso do parênquima; PA: peso da albugínea; IGS: índice gonadossomático; IPS: índice parenquimossomático.

Tabela 5. Biometria corporal e testicular de camundongos expostos ao Cd e tratados com a PB de *E. edulis*.

	Controle	Cd	PB 300	Cd+PB100	Cd+PB200	Cd+PB300
PC	37,26±8,34	39,88±4,07	36,90±1,38	39,70±1,86	37,35±3,14	36,48±5,43
PT	0,21±0,03	0,20±0,06	0,20±0,01	0,22±0,03	0,20±0,03	0,22±0,03
PP	0,18±0,03	0,18±0,06	0,17±0,01	0,19±0,04	0,17±0,02	0,20±0,03
PA	0,03±0,02	0,02±0,01	0,03±0,01	0,03±0,02	0,03±0,01	0,02±0,01
IGS	0,53±0,06	0,49±0,14	0,53±0,03	0,53±0,08	0,51±0,08	0,58±0,07
IPS	0,48±0,08	0,45±0,13	0,47±0,04	0,47±0,11	0,47±0,05	0,54±0,07

Média ± desvio-padrão. Cd: cádmio; PB: polpa bruta; PC: peso corporal; PT: peso testicular; PP: peso do parênquima; PA: peso da albugínea; IGS: índice gonadossomático; IPS: índice parenquimossomático.

3.3.Histopatologia

Nos animais do grupo intoxicado com Cd, foi possível observar as seguintes alterações na arquitetura tecidual dos túbulos seminíferos: vacuolização, desprendimento de células do epitélio e desorganização do epitélio germinativo, assim como alguns túbulos com ausência de células germinativas e/ou células de Sertoli (Figuras 2 e 3). O percentual de patologias leves e graves dos túbulos seminíferos de animais expostos ao Cd e tratados com o a PD de *E. edulis* encontram-se na Figura 4. Houve aumento de patologias leves no grupo Cd + PD 200 em comparação ao grupo controle e grupo PD 300. O percentual de túbulos com patologias graves reduziu nos grupos Cd + PD 300 em relação ao grupo cádmio. Não houve alteração significativa de patologias leves entre os grupos intoxicados com o Cd e tratados com a PB ou somente com a polpa (Figura 5). Porém, observou-se redução de patologias graves nos grupos Cd + PB 100, 200 e 300 em comparação ao grupo cádmio.

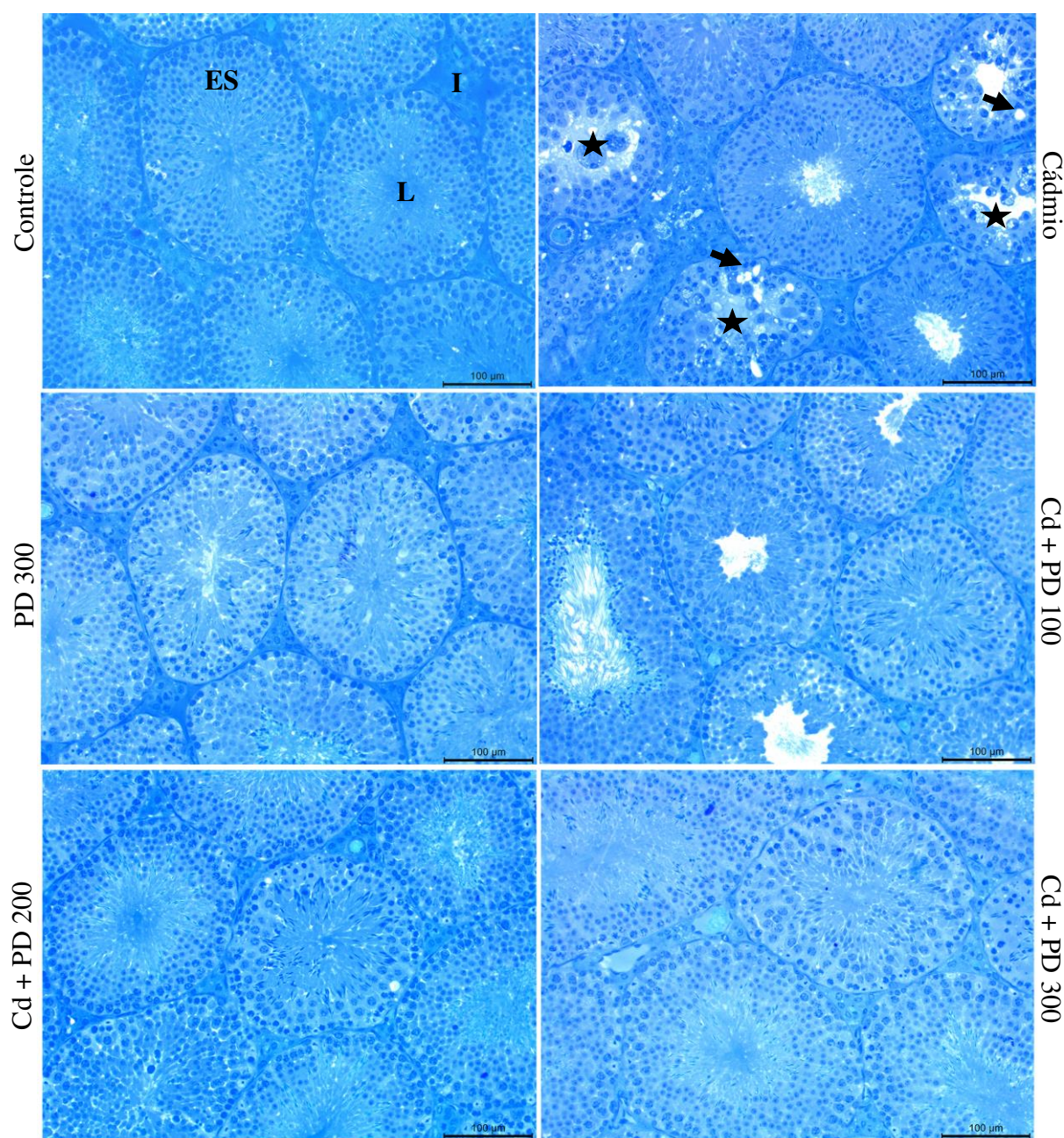


Figura 2. Fotomicrografias testiculares de camundongos expostos ao cádmio e tratados com a polpa desengordurada (PD) de *E. edulis* (100, 200 e 300 mg /kg). ES: Epitélio Seminífero; L: Lúmen; I: Intertúbulo; Setas pretas: Vacuolização; D: Desprendimento do epitélio; Estrela: Túbulos seminíferos com ausência de células de germinativas e/ou Sertoli. Azul de Toluidina. Barras: 100 µm.

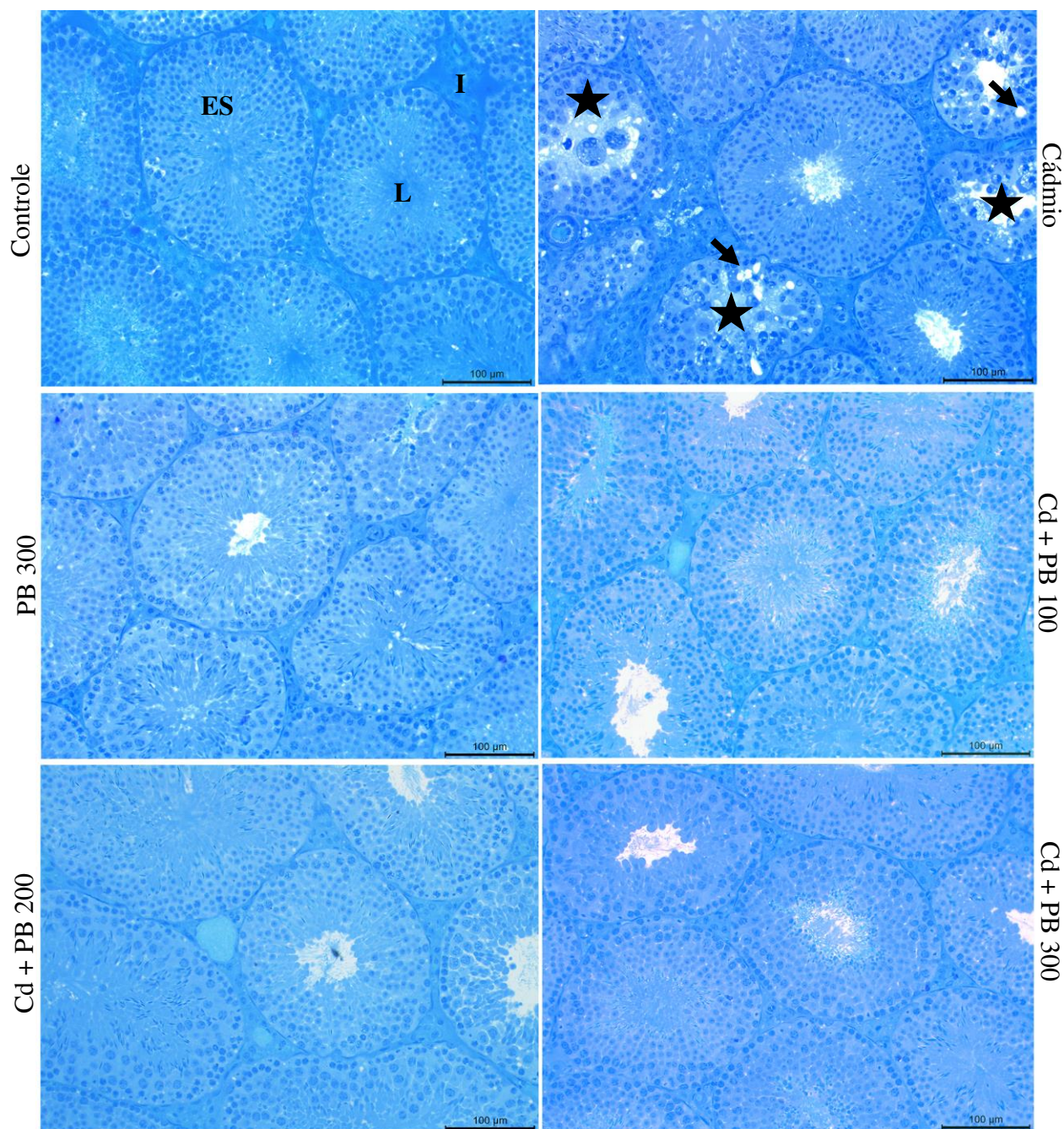


Figura 3. Fotomicrografias testiculares de camundongos expostos ao cádmio e tratados com a polpa bruta (PB) de *E. edulis* (100, 200 e 300 mg /kg). ES: Epitélio Seminífero; L: Lúmen; I: Intertúbulo; Setas pretas: Vacuolização; D: Desprendimento do epitélio; Estrela: Túbulos seminíferos com ausência de células de germinativas e/ou Sertoli. Azul de Toluidina. Barras: 100 µm.

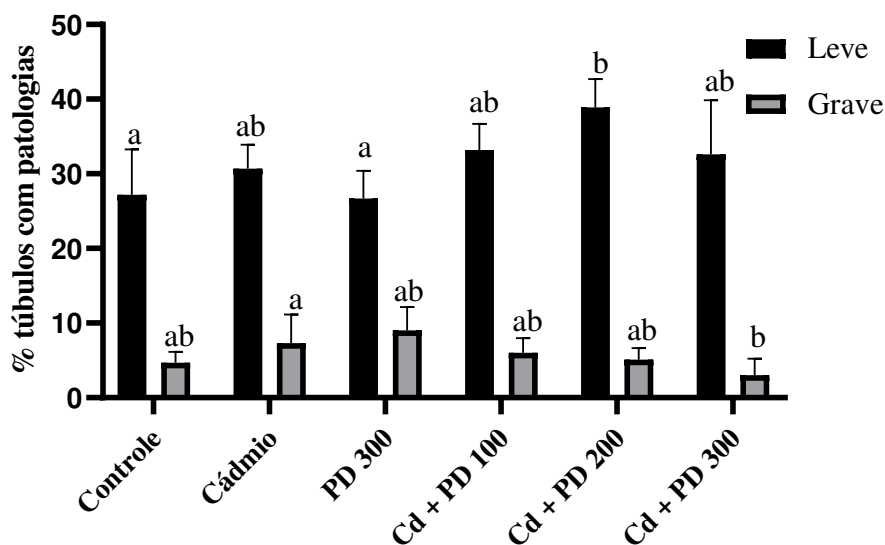


Figura 4. Quantificação de túbulos seminíferos com patologias de camundongos expostos ao Cd e tratados com polpa desengordurada (PD) de *E. edulis* (100, 200 e 300 mg/kg). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

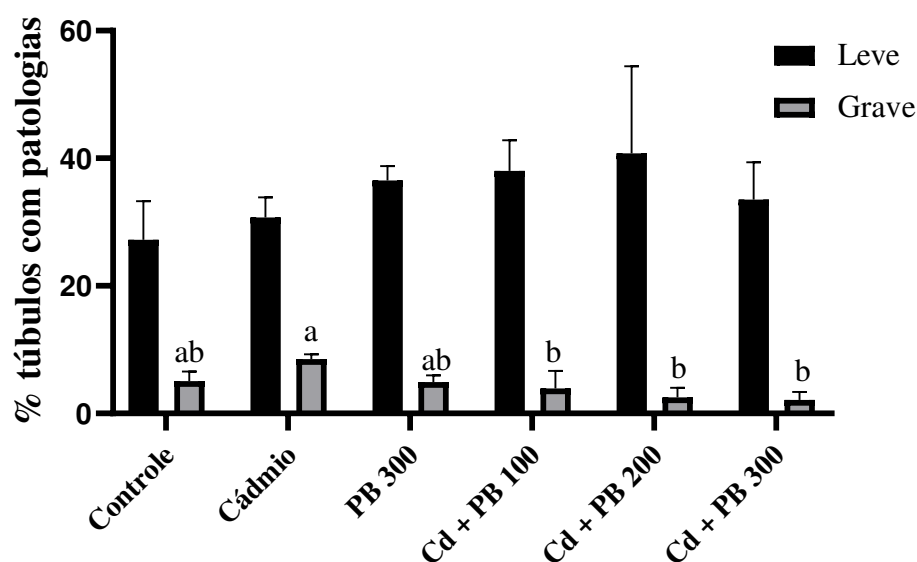


Figura 5. Quantificação de túbulos seminíferos com patologias de camundongos expostos ao Cd e tratados a polpa bruta (PB) de *E. edulis* (100, 200 e 300 mg/kg). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4. Histomorfometria tubular

Os parâmetros de proporção e o volume dos componentes tubulares, assim como os dados de morfometria tubular e estereologia de animais expostos ao Cd e tratados com a polpa desengordurada (PD) e polpa bruta (PB) de *E. edulis* estão nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Quanto à proporção dos elementos tubulares, observou-se redução no percentual de epitélio seminífero, aumento no percentual de lúmen e de túnica própria após sete dias de exposição ao Cd. Entretanto, os animais expostos ao Cd e tratados por 42 dias com a PD e PB de *E. edulis* tiveram proporção desses componentes semelhantes aos animais do grupo controle, em todas as doses testadas. Houve aumento significativo no diâmetro do lúmen e diminuição na altura de epitélio no grupo cádmio em comparação ao grupo controle. A área de lúmen e a relação túbulo/epitélio também aumentaram nesse grupo. Após o tratamento com a PD e PB, verificou-se a normalização desses parâmetros. Os demais parâmetros não sofreram alteração significativa.

O número corrigido de células germinativas por secção de túbulo seminífero no estágio 1 encontra-se nas Tabelas 8 e 9. Houve redução de espermatogônias tipo A no grupo cádmio em comparação com todos os outros tratamentos. O número de espermatócitos primários em preleptóteno também reduziu nos animais do grupo cádmio quando comparados aos grupos controle, Cd + PD 200, PB 300, Cd + PB 100 e Cd + PB 300. O número de espermatócitos em paquíteno também reduziu no grupo expostos somente ao Cd em relação a todos os grupos. A redução no número de espermátides foi observada no grupo cádmio quando comparado ao grupo controle, PD 300 e todos os grupos tratados com PB após intoxicação com o metal. O número de células de Sertoli não diferiu entre os grupos experimentais.

O índice mitótico, rendimento geral da espermatogênese, índice meiótico e da célula de Sertoli não apresentaram variação significativa entre os grupos tratados. A capacidade total de suporte das células de Sertoli, o número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo também não variaram significativamente. A produção espermática diária e a reserva espermática do testículo não diferiram entre os grupos experimentais, porém, houve redução na produção espermática diária por grama de testículo e na reserva espermática por grama de testículo, além de redução no número corrigido de células germinativas nos animais intoxicados com Cd. Entretanto, após o tratamento com a PD e PB, observou-se a normalização desses parâmetros anteriormente alterados pela exposição ao metal, exceto o grupo Cd + PB 300 no qual a PED/gT permaneceu alterada (Tabelas 8 e 9).

3.5.Histomorfometria intertubular

A proporção e o volume dos componentes do intertúbulo dos animais expostos ao Cd e tratados com PD e PB encontram-se na Tabela 10 e 11, respectivamente. Não houve alteração significativa com relação ao percentual dos componentes intertubulares. Entretanto, observou-se aumento no volume do núcleo de Leydig no grupo Cd + PD 300 em relação aos grupos controle, cádmio, PD 300 e Cd + PD100. O volume de citoplasma e da célula de Leydig também aumentou nesse grupo quando comparado aos grupos PD 300 e Cd + PD 100. Os animais do grupo Cd + PB 300 apresentaram aumento no volume de núcleo de Leydig quando em comparação ao grupo controle, cádmio e PB 300. Os demais parâmetros não diferiram significativamente.

Os dados referentes a estereologia da célula de Leydig são apresentados na Tabela 12 e 13. A intoxicação com o Cd aumentou o diâmetro nuclear da célula de Leydig, o volume nuclear, citoplasmático e da célula de Leydig. Verificamos que após o tratamento com todas as doses de PD esses parâmetros foram normalizados. Com relação a PB, a normalização dos parâmetros foi observada apenas após o tratamento com 100 mg/kg da PB. O número de células de Leydig por testículo aumentou no grupo Cd+PD300 em relação aos grupos cádmio e PD 300. Esse parâmetro também aumentou nos animais dos grupos Cd + PB 100 e Cd + PB 300 em relação ao grupo cádmio.

Tabela 6. Morfometria e estereologia dos túbulos seminíferos de camundongos expostos ao Cd e tratados com a PD de *E. edulis*.

Parâmetro	Controle	Cd	PD 300	Cd + PD 100	Cd + PD 200	Cd + PD 300
Túbulo (%)	93,51 ± 1,64	93,81 ± 1,03	94,25 ± 0,62	92,34 ± 1,62	93,26 ± 0,95	93,06 ± 1,23
Intertúbulo (%)	6,49 ± 1,64	6,19 ± 1,03	5,75 ± 0,62	6,89 ± 0,97	6,74 ± 0,95	6,94 ± 1,23
Epitélio (%)	83,33 ± 1,10 ^a	80,42 ± 1,45 ^b	83,29 ± 0,49 ^a	81,62 ± 2,29 ^a	83,92 ± 0,71 ^a	84,19 ± 0,92 ^a
Túnica (%)	3,33 ± 0,37 ^a	4,20 ± 0,80 ^b	3,92 ± 0,29 ^a	3,45 ± 0,51 ^a	3,13 ± 0,37 ^a	2,85 ± 0,18 ^a
Lúmen (%)	6,85 ± 0,98 ^a	9,19 ± 1,07 ^b	7,03 ± 0,72 ^a	7,27 ± 1,04 ^a	6,21 ± 0,48 ^a	6,02 ± 0,61 ^a
Túbulo (mL)	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,20 ± 0,02
Epitélio (mL)	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,18 ± 0,02
Túnica (mL)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Lúmen (mL)	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
DT (µm)	206,45±10,25	208,26±6,94	209,10±4,39	210,97±4,97	208,69±1,56	211,40±6,33
DL (µm)	43,38±4,17 ^a	58,16±3,62 ^b	39,06±9,41 ^a	4593±3,66 ^a	42,63±3,97 ^a	48,16±6,75 ^a
AE (µm)	81,39±4,53 ^a	75,14±4,82 ^b	85,02±6,39 ^a	82,52±3,24 ^a	83,03±2,66 ^a	81,62±3,11 ^a
ArT (mm²)	3,35±0,33	3,41±0,22	3,52±0,15	3,50±0,16	3,42±0,05	3,51±0,21
ArL (mm²)	0,15±0,03 ^a	0,27±0,03 ^b	0,13±0,07 ^a	0,17±0,03 ^a	0,14±0,03 ^a	0,19±0,05 ^a
ArE (mm²)	3,20±0,32	3,14±0,25	3,31±0,19	3,33±0,17	3,28±0,08	3,33±0,18
RTE	1,05±0,01 ^a	1,09±0,02 ^b	1,04±0,02 ^a	1,05±0,02 ^a	1,04±0,02 ^a	1,06±0,01 ^a
CTT/T (m)	4,91±0,76	4,89±1,44	4,39±0,91	3,90±0,45	4,42±1,18	5,67±1,76
CTT/gT (m/g)	24,03±2,49	24,01±0,83	21,06 ± 4,12	21,83±1,40	22,23 ± 1,61	22,45 ± 2,76
ITS (%)	0,45±0,08	0,42±0,13	0,38 ± 0,07	0,39 ± 0,05	0,39 ± 0,10	0,48 ± 0,10
IES (%)	0,40±0,07	0,36±0,11	0,34 ± 0,06	0,35 ± 0,05	0,35 ± 0,09	0,44 ± 0,09

Média ± desvio-padrão. Cd: cádmio; DT: diâmetro tubular; AE: altura de epitélio; DL: diâmetro do lúmen; ArT: área de túbulo; ArL: área de lúmen; ArE: área de epitélio; RTE: relação túbulo/epitélio; CTT/T: Comprimento de túbulo seminífero nos testículos; CTT/gT: Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo; ITS: índice tubulossomático; IES: índice epiteliossomático. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Tabela 7. Morfometria e estereologia dos túbulos seminíferos de camundongos expostos ao Cd e tratados com a PB de *E. edulis*.

Parâmetro	Controle	Cádmio	PB 300	Cd + PB 100	Cd + PB 200	Cd + PB 300
Túbulo (%)	93,51 ± 1,64	93,81 ± 1,03	93,53±0,34	93,31 ± 0,70	93,41±0,88	93,45±1,11
Intertúbulo (%)	6,49 ± 1,64	6,19 ± 1,03	6,47 ± 0,34	6,69 ± 0,70	6,60 ± 0,88	6,55 ± 1,11
Epitélio (%)	83,33 ± 1,10 ^a	80,42 ± 1,45 ^b	83,80±1,08 ^a	84,10±0,64 ^a	84,52±0,6 ^a	84,03±0,88 ^a
Túnica (%)	3,33 ± 0,0,37 ^a	4,20 ± 0,80 ^b	3,59±0,32 ^a	3,08 ± 0,35 ^a	3,16±0,37 ^a	3,20±0,22 ^a
Lúmen (%)	6,85 ± 0,98 ^a	9,19 ± 1,07 ^b	6,14 ± 1,0 ^a	6,12 ± 0,60 ^a	5,73 ± 0,6 ^a	6,22 ± 0,80 ^a
Túbulo (µL)	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,16±0,02	0,18±0,03
Epitélio (µL)	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,16±0,03	0,15±0,01	0,16±0,03
Túnica (µL)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Lúmen (µL)	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
DT (µm)	206,45±10,25	208,26±6,94	211,76 ± 2,55	214,26±4,90	215,15±4,87	216,39±2,75
DL (µm)	43,38±4,17 ^a	58,16±3,62 ^b	41,69 ± 4,36 ^a	47,79±2,46 ^a	44,04±3,74 ^a	48,56±6,14 ^a
AE (µm)	81,39±4,53 ^a	75,14±4,82 ^b	85,04 ±2,67 ^a	83,23±2,49 ^a	85,55±2,41 ^a	84,66±3,48 ^a
ArT (mm)	3,35±0,33	3,41±0,22	3,52 ± 0,08 ^a	3,61±0,16 ^a	3,64±0,17 ^a	3,68±0,09 ^b
ArL (mm)	0,15±0,03 ^a	0,27±0,03 ^b	0,14 ± 0,03 ^a	0,18±0,02 ^a	0,15±0,03 ^a	0,19±0,05 ^a
ArE (mm)	3,20±0,32	3,14±0,25	3,38±0,09	3,43±0,16	3,48±0,16	3,49±0,10
RTE	1,05±0,01 ^a	1,09±0,02 ^b	1,04±0,02 ^a	1,05±0,01 ^a	1,04±0,01 ^a	1,04±0,01 ^a
CTT/T (m)	4,91±0,76	4,89±1,44	4,50±0,67	4,85±0,94	4,49±0,44	4,99±0,82
CTT/gT (m/g)	24,03±2,49	24,01±0,83	22,50±2,44	22,10±2,80	22,93±1,51	22,86±1,58
ITS (%)	0,45±0,08	0,42±0,13	0,44±0,04	0,44±0,10	0,44±0,05	0,51±0,06
IES (%)	0,40±0,07	0,36±0,11	0,39±0,03	0,40±0,08	0,40±0,05	0,45±0,06

Média ± desvio-padrão. Cd: cádmio; DT: diâmetro tubular; AE: altura de epitélio; DL: diâmetro do lúmen; ArT: área de túbulo; ArL: área de lúmen; ArE: área de epitélio; RTE: relação túbulo/epitélio; CTT/T: Comprimento de túbulo seminífero nos testículos; CTT/gT: Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo; ITS: índice tubulossomático; IES: índice epiteliossomático. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Tabela 8. População celular corrigida e razões entre os números celulares, índice de célula de Sertoli, produção e reserva espermática no testículo de camundongos intoxicados com Cd e tratados com PD de *E. edulis*.

Parâmetro	Controle	Cádmio	PD 300	Cd + PD 100	Cd + PD 200	Cd + PD 300
EGA	2,39±0,16 ^a	1,57±0,20 ^b	2,16±0,47 ^a	1,90±0,47 ^a	2,14±0,36 ^a	2,38±0,48 ^a
PLL	27,68±2,33 ^a	20,46±0,42 ^b	24,17±2,13 ^a	24,01±3,03 ^a	21,71±1,81 ^b	26,73±1,38 ^a
PQ	31,78±2,37 ^a	23,94±1,85 ^b	29,05±3,56 ^a	28,29±3,66 ^a	29,20±2,81 ^a	33,05±2,81 ^a
AR	62,60±7,15 ^a	48,30±4,63 ^b	60,46±7,40 ^a	62,63±11,44 ^a	59,70±5,67 ^a	70,23±8,96 ^a
CS	4,78±0,83	4,44±1,68	4,57±0,63	4,60±0,95	4,83±0,85	5,13±0,80
IMt	11,56±0,56	13,26±1,89	11,51±2,07	13,29±3,29	10,46±2,44	11,54±2,10
RG	26,23±3,14	31,25±4,98	29,00±6,78	33,91±5,43	28,75±6,59	29,80±2,22
IMe	1,97±0,11	2,02±0,20	2,08±0,09	2,21±0,26	2,05±0,10	2,13±0,30
ICS	13,31±1,91	12,04±4,23	13,31±1,51	13,69±1,30	12,54±1,56	13,78±1,28
NCG	124,46±11,07 ^a	84,27±5,28 ^b	115,83±12,64 ^a	116,83±17,80 ^a	112,75±9,78 ^a	132,39±10,14 ^a
CTCS	26,51±3,81	23,62±8,26	25,55±3,06	25,68±2,42	23,70±2,82	26,11±2,48
CS/T	1,94±0,52	1,78±0,69	1,57±0,12	1,68±0,40,	1,82±0,30	1,90±0,22
CS/gT	20,07±9,40	17,71±6,35	15,22±2,39	19,37±4,77	16,64±3,99	15,12±3,44
PED	6,80±1,62	5,12±1,19	6,52±1,60	5,44±1,23	6,64±0,33	8,66±0,37
PED/gT	65,95±8,23 ^a	48,99±3,83 ^b	61,43±6,49 ^a	61,78±10,12 ^a	60,24±5,47 ^a	68,32±8,44 ^a
RET	12,42±2,91	9,23±2,86	11,46±2,34	9,80±2,22	12,00±0,56	15,79±0,97
RET/gT	118,72±14,81 ^a	88,19±6,88 ^b	108,37±11,46 ^a	111,21±18,22 ^a	108,99±10,26 ^a	124,47±14,66 ^a

Cd: Cádmio; PLL: espermátócito em preleptóteno; PQ: espermátócito em paquíteno; EA: espermátide arredondada; CS: célula de Sertoli; IMt: índice mitótico; RG: rendimento geral; IMe: índice meiótico; ICS: índice da célula de Sertoli; NCG: número corrigido de células germinativas; CTCS: capacidade total de suporte das células de Sertoli; CS/T: número de células de Sertoli por testículo; CS/gT: número de células de Sertoli por grama de testículo; PED: produção espermática diária; PED/gT: produção espermática diária por grama de testículo; RET: reserva espermática testicular; RET/gT: reserva espermática diária por grama de testículo. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 9. População celular corrigida e razões entre os números celulares, índice de célula de Sertoli, produção e reserva espermática no testículo de camundongos intoxicados com Cd e tratados com PB de *E. edulis*.

Parâmetro	Controle	Cádmio	PB 300	Cd + PB 100	Cd + PB 200	Cd + PB 300
EGA	2,39±0,16 ^a	1,57±0,20 ^b	2,00±0,19 ^a	2,54±0,2 ^a	2,45±0,37 ^a	1,95±0,21 ^a
PLL	27,68±2,33 ^a	20,46±0,42 ^b	24,53±1,93 ^a	27,25±1,72 ^a	25,04±1,97 ^a	23,95±2,27 ^{ab}
PQ	31,78±2,37 ^a	23,94±1,85 ^b	29,71±2,81 ^a	31,15±3,664 ^a	29,70±3,53 ^a	29,70±2,27 ^a
AR	62,60±7,15 ^a	48,30±4,63 ^b	61,13±5,94 ^a	73,09±3,99 ^a	69,72±9,32 ^a	60,68±5,56 ^a
CS	4,78±0,83	4,44±1,68	4,40±0,58	5,79±0,55	5,04±0,23	4,52±0,46
IMt	11,56±0,56	13,26±1,89	12,42±2,21	10,80±1,29	10,31±0,79	12,46±2,33
RG	26,23±3,14	31,25±4,98	30,72±3,75	28,96±3,11	28,80±4,21	31,33±3,07
IMe	1,97±0,11	2,02±0,20	2,07±0,28	2,37±0,25	2,35±0,17	2,05±0,20
ICS	13,31±1,91	12,04±4,23	14,02±1,80	12,71±1,33	13,88±2,03	13,53±1,72
NCG	124,46±11,07 ^a	84,27±5,28 ^b	117,38±7,25 ^a	134,04±7,97 ^a	126,91±12,81 ^a	116,27±7,53 ^a
CTCS	26,51±3,81	23,62±8,26	26,93±2,65	23,26±1,90	25,25±2,84	25,89±2,30
CS/T	1,94±0,52	1,78±0,69	1,69±0,21	2,22±0,19	1,90±0,16	1,77±0,18
CS/gT	20,07±9,40	17,71±6,35	16,97±2,08	19,85±3,28	18,75±3,21	16,79±4,15
PDE	6,80±1,62	5,12±1,19	6,00±0,56	7,29±0,39	6,78±1,19	6,30±1,32
PDE/gT	65,95±8,23 ^a	48,99±3,83 ^b	60,25±5,01 ^a	70,49±6,94 ^a	66,24±11,83 ^a	57,77±6,13 ^b
RET	12,42±2,91	9,23±2,86	10,78±1,04	14,26±0,71	12,21±2,15	11,33±2,37
RET/gT	118,72±14,81 ^a	88,19±6,88 ^b	108,33±9,40 ^a	126,89±12,49 ^a	119,24±21,30 ^a	103,99±11,04 ^a

Cd: Cádmio; PLL: espermátócito em preleptóteno; PQ: espermátócito em paquíteno; EA: espermátide arredondada; CS: célula de Sertoli; IMt: índice mitótico; RG: rendimento geral; IMe: índice meiótico; ICS: índice da célula de Sertoli; NCG: número corrigido de células germinativas; CTCS: capacidade total de suporte das células de Sertoli; CS/T: número de células de Sertoli por testículo; CS/gT: número de células de Sertoli por grama de testículo; PED: produção espermática diária; PED/gT: produção espermática diária por grama de testículo; RET: reserva espermática testicular; RET/gT: reserva espermática diária por grama de testículo. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Tabela 10. Proporção e volume dos elementos do compartimento intertubular de testículos de camundongos expostos ao cádmio e tratados com polpa desengordurada de *Euterpe edulis*.

	Controle	Cádmio	PD 300	Cd + PD 100	Cd + PD 200	Cd + PD 300
<i>Percentual no testículo (%)</i>						
INT	6,49 ± 1,64	6,19 ± 1,03	5,75 ± 0,62	6,89 ± 0,97	6,74 ± 0,95	6,94 ± 1,23
TC	0,065±0,07	0,034±0,01	0,056±0,06	0,037±0,07	0,027±0,02	0,031±0,04
EL	0,462±0,18	0,469±0,22	0,327±0,19	0,283±0,05	0,350±0,06	0,313±0,09
VS	0,890±0,26	0,777±0,20	0,721±0,22	0,992±0,19	0,479±0,17	0,730±0,15
MAC	0,024±0,03	0,007±0,01	0,005±0,01	0,006±0,01	0,005±0,01	0,009±0,01
CL	4,13±1,01	4,06±0,71	3,80±0,45	4,50±0,91	4,56±0,65	4,75±1,01
NL	0,92±0,02	0,81±0,23	0,76±0,09	0,99±0,19	1,01±0,11	1,08±0,20
LEY	5,05±1,22	4,87±0,88	4,56±0,45	5,49±1,05	5,57±0,73	5,83±1,19
IIS	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00
<i>Volume no testículo (μL)</i>						
INT	11,10±1,87	10,87±3,46	9,24±2,31	10,06±0,99	11,33±2,94	15,01±4,06
TC	0,010±0,08	0,06±0,03	0,09±0,05	0,05±0,03	0,05±0,03	0,07±0,04
EL	0,77±0,19	0,90±0,56	0,56±0,31	0,42±0,06	0,59±0,19	0,65±0,20
VS	1,55±0,43	1,36±0,49	1,16±0,44	1,20±0,34	1,25±0,35	1,56±0,39
MAC	0,02±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
CL	7,03±1,03 ^{ab}	7,14±2,29 ^{ab}	6,14±1,75 ^a	6,56±0,96 ^a	7,68±2,05 ^{ab}	10,31±3,18 ^b
NL	1,60±0,43 ^{ab}	1,36±0,27 ^a	1,22±0,23 ^a	1,46±0,33 ^a	1,69±0,39 ^{ab}	2,33±0,62 ^b
LEY	8,63±1,4 ^{ab}	8,50±2,54 ^{ab}	7,36±1,94 ^a	8,02±0,55 ^a	9,37±1,08 ^{ab}	12,64±3,78 ^b

INT: Intertúbulo; TC: Tecido conjuntivo; EL: Espaço linfático; VS: Vaso sanguíneo; MAC: macrófago; CL: Citoplasma de Leydig; NL: Núcleo de Leydig; CL: Célula de Leydig; IIS: Índice Leydigossomático. Dados expressos em média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, p≤0,05 pelo teste de Tukey.

Tabela 11. Proporção e volume dos elementos do compartimento intertubular de testículo de camundongos expostos ao cádmio e tratados com de polpa bruta de *Euterpe edulis*.

	Controle	Cádmio	PB 300	Cd + PB 100	Cd + PB 200	Cd + PB 300
<i>Percentual no testículo (%)</i>						
INT	6,49 ± 1,64	6,19 ± 1,03	6,25 ± 0,63	6,69 ± 0,70	6,60 ± 0,88	6,55 ± 1,11
TC	0,065±0,07	0,034±0,01	0,027±0,04	0,040±0,03	0,026±0,03	0,034±0,02
EL	0,462±0,18	0,469±0,22	0,280±0,09	0,254±0,09	0,261±0,10	0,277±0,08
VS	0,890±0,26	0,777±0,20	0,770±0,28	0,856±0,08	0,814±0,30	0,804±0,13
MAC	0,024±0,03	0,007±0,01	0,002±0,01	0,004±0,01	0,003±0,01	0,004±0,01
Cit. L	4,13±1,01	4,06±0,71	4,48±0,14	4,61±0,65	3,55±0,58	4,31±0,87
NL	0,92±0,02	0,81±0,23	0,86±0,09	1,06±0,06	1,02±0,09	1,11±0,20
L	5,05±1,22	4,87±0,88	5,34±0,22	5,67±0,67	4,67±0,51	5,42±0,53
IIS	0,02±0,01	0,03±0,01	0,03±0,00	0,03±0,01	0,03±0,00	0,03±0,00
<i>Volume no testículo (μL)</i>						
INT	11,10±1,87	10,87±3,46	11,14±0,72	12,67±3,46	11,50±1,72	12,84±3,00
TC	0,010±0,08	0,06±0,03	0,13±0,05	0,07±0,03	0,05±0,03	0,03±0,02
EL	0,77±0,19	0,90±0,56	0,47±0,16	0,46±0,13	0,46±0,16	0,53±0,13
VS	1,55±0,43	1,36±0,49	1,31±0,39	1,59±0,30	1,41±0,50	1,57±0,33
MAC	0,02±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,03±0,02
Cit. L	7,03±1,03	7,14±2,29	7,73±0,72	8,80±2,66	6,18±1,01	8,48±2,26
NL	1,60±0,43 ^a	1,36±0,27 ^a	1,48±0,19 ^a	1,99±0,39 ^{ab}	1,80±0,25 ^{ab}	2,18±0,51 ^b
L	8,63±1,41	8,50±2,54	9,21±0,87	10,79±3,04	7,78±1,00	10,66±2,74

INT: Intertúbulo; TC: Tecido conjuntivo; EL: Espaço linfático; VS: Vaso sanguíneo; MAC: macrófago; CL: Citoplasma de Leydig; NL: Núcleo de Leydig; CL: Célula de Leydig; IIS: Índice Leydigossomático. Dados expressos em média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Tabela 12. Estereologia das células de Leydig de camundongos expostos ao cádmio e tratados com PD de *Euterpe edulis*.

Parâmetro	Controle	Cádmio	PD 300	Cd + PD 100	Cd + PD 200	Cd + PD 300
Diâmetro nuclear (μm)	6,40 \pm 0,10 ^a	6,73 \pm 0,12 ^b	6,61 \pm 0,35 ^a	6,58 \pm 0,13 ^a	6,53 \pm 0,13 ^a	6,65 \pm 0,34 ^a
Volume nuclear (μm^3)	137,44 \pm 6,37 ^a	159,81 \pm 8,53 ^b	151,83 \pm 23,10 ^a	149,37 \pm 8,07 ^a	146,02 \pm 8,71 ^a	154,57 \pm 23,26 ^a
Volume citoplasmático (μm^3)	620,82 \pm 99,24 ^a	834,16 \pm 181,18 ^b	750,64 \pm 109,17 ^a	682,46 \pm 96,44 ^a	660,90 \pm 100,89 ^a	687,40 \pm 160,40 ^a
Volume celular (μm^3)	758,26 \pm 104,55 ^a	993,98 \pm 188,73 ^b	902,47 \pm 117,94 ^a	831,82 \pm 100,38 ^a	806,91 \pm 107,17 ^a	841,97 \pm 182,13 ^a
Volume de Leydig/T (mL)	0,009 \pm 0,001	0,008 \pm 0,002	0,007 \pm 0,002	0,008 \pm 0,001	0,009 \pm 0,002	0,013 \pm 0,003
Volume de Leydig/gT (mL)	0,043 \pm 0,010	0,042 \pm 0,006	0,035 \pm 0,007	0,045 \pm 0,009	0,046 \pm 0,008	0,049 \pm 0,010
N de Leydig/T ($\times 10^6$)	11,77 \pm 3,79 ^{ab}	8,46 \pm 1,41 ^a	8,12 \pm 1,59 ^a	9,75 \pm 2,03 ^{ab}	11,58 \pm 2,60 ^{ab}	15,34 \pm 4,40 ^b
N de Leydig/gT ($\times 10^6$)	57,89 \pm 17,17	44,02 \pm 11,62	39,07 \pm 8,42	54,74 \pm 10,36	56,86 \pm 10,49	60,13 \pm 13,95
ILS (%)	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01

PD: polpa desengordurada; ILS: índice Leydigossomático. Dados expressos em média \pm DP. Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Tabela 13. Estereologia das células de Leydig de camundongos expostos ao cádmio e tratados com PB de *Euterpe edulis*.

Parâmetro	Controle	Cádmio	PB 300	Cd + PB 100	Cd + PB 200	Cd + PB 300
Diâmetro nuclear (μm)	6,40 \pm 0,10 ^a	6,73 \pm 0,12 ^b	6,52 \pm 0,11 ^a	6,63 \pm 0,19 ^a	6,83 \pm 0,07 ^b	6,76 \pm 0,25 ^b
Volume nuclear (μm^3)	137,44 \pm 6,37 ^a	159,81 \pm 8,53 ^b	145,08 \pm 7,18 ^a	155,63 \pm 13,75 ^a	167,37 \pm 5,28 ^b	162,87 \pm 18,42 ^b
Volume citoplasmático (μm^3)	620,82 \pm 99,24 ^a	834,16 \pm 181,18 ^b	759,07 \pm 72,46 ^a	679,10 \pm 139,65 ^a	577,08 \pm 54,95 ^a	634,93 \pm 117,54 ^a
Volume celular (μm^3)	758,26 \pm 104,55 ^a	993,98 \pm 188,73 ^b	904,15 \pm 77,11 ^a	834,73 \pm 151,88 ^a	744,39 \pm 54,70 ^a	797,80 \pm 133,54 ^a
Volume de Leydig/T (mL)	0,009 \pm 0,001	0,008 \pm 0,002	0,009 \pm 0,001	0,010 \pm 0,003	0,008 \pm 0,001	0,011 \pm 0,003
Volume de Leydig/gT (mL)	0,043 \pm 0,010	0,042 \pm 0,006	0,046 \pm 0,003	0,049 \pm 0,010	0,040 \pm 0,006	0,049 \pm 0,008
N de Leydig/T ($\times 10^6$)	11,77 \pm 3,79 ^{ab}	8,46 \pm 1,41 ^a	10,24 \pm 1,29 ^{ab}	12,82 \pm 2,4 ^b	10,47 \pm 1,28 ^{ab}	13,27 \pm 1,79 ^b
N de Leydig/gT ($\times 10^6$)	57,89 \pm 17,17	44,02 \pm 11,62	51,45 \pm 6,20	58,75 \pm 9,37	53,34 \pm 4,33	61,22 \pm 6,43
ILS (%)	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01

PB: polpa bruta; ILS: índice Leydigossomático. Dados expressos em média \pm DP. Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

3.6. Parâmetros bioquímicos

As atividades da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) não alteraram significativamente entre os grupos expostos somente ao Cd e nos animais que após a exposição foram tratados com a PD e PB de *E. edulis* (Figura 2 e 3). Também não houve mudança em relação à concentração de malondialdeído (MDA), porém a concentração de óxido nítrico (ON) reduziu de forma significativa no grupo exposto ao Cd e que recebeu 200 mg/Kg de PD de *E. edulis* em comparação ao grupo controle.

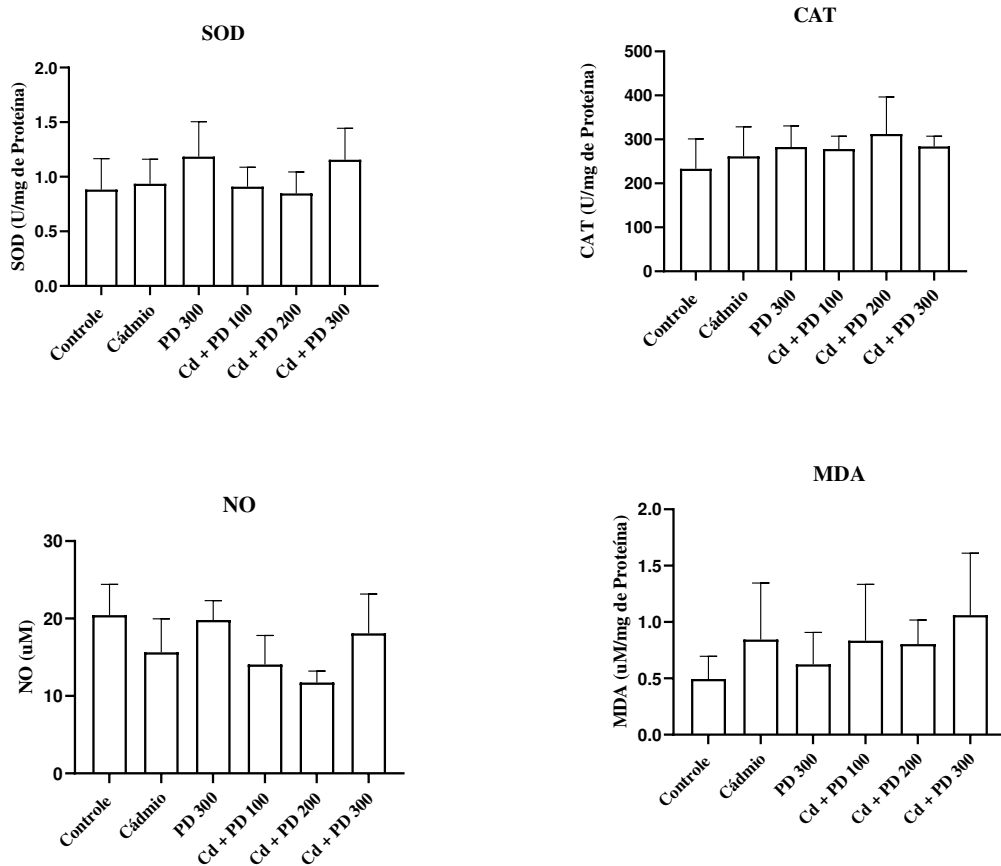


Figura 6. Atividade das enzimas antioxidantes e concentração de marcadores de estresse oxidativo do testículo de camundongos expostos ao cádmio e tratados com polpa desengordurada (PD) de *E. edulis*. SOD – Superóxido dismutase; CAT – Catalase; GST – Glutathione – S – Transferase; MDA – malondialdeído; NO – óxido nítrico.

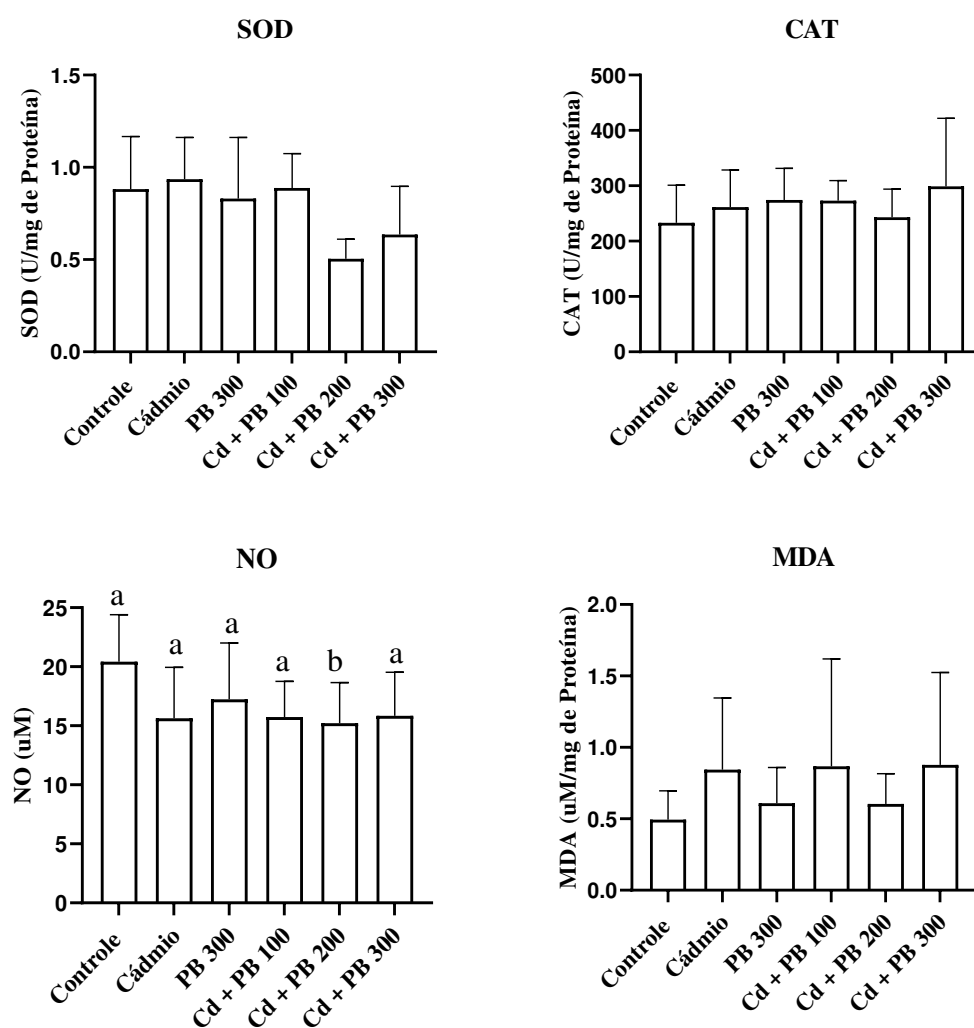


Figura 7. Atividade das enzimas antioxidantes e concentração de marcadores de estresse oxidativo do testículo de camundongos expostos ao cádmio e tratados com polpa bruta (PB) de *E. edulis*. SOD – Superóxido dismutase; CAT – Catalase; GST – Glutathione – S – Transferase; MDA – malondialdeído; NO – óxido nítrico.

4. Discussão

Estudos têm mostrado que espécies vegetais com propriedades antioxidantes podem ser usadas para proteger ou atenuar danos testiculares induzidos pelo cádmio (Cd) em animais experimentais (Lamas et al., 2015; Predes et al., 2011). Assim, neste estudo avaliamos a ação da polpa da *E. edulis*, planta com potencial antioxidante, frente aos danos testiculares induzidos pela exposição subaguda ao Cd. A dose de Cd e das polpas de *E. edulis* foi escolhida com base em estudos anteriores (Mouro, 2018; Mouro et al., 2019a).

Os valores referentes ao conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da PD e PB de *E. edulis* foram menores dos que os relatados por Mouro (2018) para a polpa de *Euterpe oleracea*. A PB apresentou maior porcentagem de ácido oleico em comparação com a PD (34,85% e 13,65%, respectivamente). Além disso, na PB também foram encontrados ácidos graxos monoinsaturados (ácido linoleico- 14,76%) e ácidos graxo saturados (ácido palmítico – 18,37%) que não estavam presentes na PD. Esses resultados eram esperados pois a PD foi utilizada para a extração do óleo de *E. edulis*. Novello et al. (2015) encontraram valores semelhantes com relação a quantidade de ácido oleico (34%), porém a quantidade de ácido linoleico (32,9%) e ácido palmítico (27,1%) foi superior aos valores encontrados no nosso estudo para a PB. Os níveis de polifenóis podem variar pois existe uma série de fatores envolvidos, como fatores genéticos e condições ambientais, além da maturação, processamento e armazenamento dos frutos (Costa et al., 2013).

A exposição ao Cd não alterou os parâmetros biométricos corporais e testiculares. Estudos mostraram alterações no peso corporal de ratos Wistar após exposição a 1,2 mg/kg de Cd, via intraperitoneal (i.p.) durante 56 dias (Lamas et al., 2015) e em camundongos intoxicados com 24 mg/kg do metal, por gavagem durante 7 dias (Mouro et al., 2019a). Alteração no peso testicular foi relatada por Leite et al. (2013) após ratos Wistar serem expostos a 1,15 mg/kg de Cd (i.p.) durante 56 dias. Resultados semelhantes foram relatados por Djuric et al. (2015) e Predes et al. (2016). Diminuição no índice gonadossomático foi observada por Predes et al. (2010), após 7 e 56 dias de exposição a 1,2 mg/kg de Cd. As discrepâncias encontradas entre os estudos ocorrem devido à diferença entre as doses utilizadas, o tempo de exposição, via de administração e modelo animal.

A administração da PD e PB de juçara não causou alterações nos parâmetros biométricos, sugerindo que as polpas não apresentam toxicidade sistêmica. Nossos resultados estão de acordo com Nascimento (2017), que verificou que o tratamento com 300, 600 e 900

mg/kg do extrato hidroalcoólico de *E. edulis* não afeta os parâmetros biométricos de ratos Wistar.

A proporção (%) dos túbulos seminíferos varia entre as espécies e está relacionada com a eficiência na produção de espermatozoides (França e Russell, 1998). No presente trabalho, os animais expostos ao Cd apresentaram redução significativa no percentual de epitélio seminífero e aumento no percentual de lúmen. Esses dados sugerem que houve perda de células germinativas, possivelmente pela perturbação da adesão entre as células de Sertoli e as células germinativas (Creasy, 2002). Os efeitos tóxicos do Cd sobre a barreira hematotesticular (BHT) que ocasionam a sua ruptura, perda do contato entre as células e descamação são bem descritos na literatura (Zhu et al., 2020; Venditti et al., 2021). As células de Sertoli formam a BHT e sua integridade é essencial para evitar, entre outros, que agentes tóxicos como o Cd, saia dos vasos e entre nos túbulos seminíferos onde ocorre o processo de espermatogênese (Venditti et al., 2021). Dessa forma, a ruptura da BHT pode ocasionar alterações na arquitetura do epitélio germinativo, como observado pela diminuição no percentual de epitélio seminífero nos animais expostos ao Cd.

O aumento no percentual de túnica própria observado nos animais expostos ao Cd pode estar relacionado à maior deposição de colágeno, o que pode dificultar a troca de metabólitos entre o compartimento intertubular e o epitélio seminífero (Paniagua et al., 1991). Estes autores citam ainda que, o espessamento da túnica própria pode ser um dano secundário à perda de células germinativas, e que a produção de colágeno seja um mecanismo para compensar a perda dessas células, com a finalidade de preencher o volume perdido. O aumento na proporção de fibras colágenas pode ainda comprometer a função contrátil das células mioídes, importante para a liberação dos espermatozoides no lúmen tubular (Aydos et al., 2001). Assim, o aumento no percentual de lúmen nos animais expostos ao Cd pode estar relacionado a diminuição da eliminação do fluido luminal juntamente com os espermatozoides devido ao comprometimento da contratilidade das células mioídes. Verificamos que os animais que receberam apenas a PD e a PB não apresentaram alteração nesse parâmetro, o que indica que a polpa de *E. edulis* não afeta a dinâmica do fluido intertubular e o fornecimento de metabólitos para os túbulos seminíferos. Além disso, as doses testadas neste trabalho foram capazes de prevenir o acúmulo de colágeno causado pelo Cd, como observado pela normalização desse parâmetro nos animais que receberam 100, 200 e 300 mg/kg de PD e PB após serem intoxicados com o metal. É possível que, ao evitar o acúmulo de colágeno e reverter o espessamento da túnica própria, as polpas de *E. edulis*

tenham auxiliado a entrada dos compostos antioxidantes, presentes nas polpas, nos túbulos seminíferos e que isso tenha contribuído para a redução de patologias graves e recuperação do epitélio seminífero após a exposição ao Cd.

Alterações na espermatogênese podem ser avaliadas por meio de parâmetros tubulares, os quais estão relacionados diretamente a produção de espermatozoides, como o diâmetro tubular, a altura de epitélio e o comprimento total tubular (Russell et al., 1990). Neste trabalho, animais intoxicados com Cd apresentaram aumento no diâmetro luminal e redução na altura de epitélio, que pode estar relacionada a perda de células germinativas.

A exposição ao Cd no presente estudo não alterou parâmetros relacionados às células de Sertoli (número de células de Sertoli, índice da célula de Sertoli e capacidade total de suporte da célula de Sertoli), porém, causou a redução no número de células germinativas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (espermatogônias, espermatócitos em preleptóteno, paquíteno e espermátides arredondadas). É amplamente reconhecido que as células de Sertoli têm maior resistência à toxicidade em comparação com as células germinativas (Creasy, 2001). No entanto, alterações na sua função podem prejudicar o suporte estrutural e metabólico oferecido às células germinativas, o que acarreta degeneração e descamação das células germinativas no interior do lúmen tubular (Creasy, 1997). Assim, a diminuição no número de células da linhagem germinativa comprova a gravidade da toxicidade do Cd, o que compromete a espermatogênese e pode causar a infertilidade.

O tratamento com a PD e PB foi capaz de prevenir a diminuição dos diferentes tipos celulares no estágio 1, exceto para a dose de 200 mg/kg de PD. Além disso, neste trabalho observamos a diminuição de patologias graves em animais expostos ao Cd e tratados com diferentes doses de PD e PB de *E. edulis*, quando comparados com os animais que receberam apenas o Cd. Estes resultados indicam que a PD e a PB foram capazes de auxiliar na recuperação dos danos causados ao epitélio germinativo o avanço de lesões. A recuperação da arquitetura tecidual e a manutenção da fisiologia testicular podem estar relacionadas à presença dos compostos antioxidantes na polpa de *E. edulis*, reduzindo os danos morfológicos causados pelo Cd. A quercetina, um flavonoide natural presente na polpa de *E. edulis* (Vieira et al., 2017), apresentou efeito protetor contra danos testiculares causados pelo Cd, com redução na taxa de apoptose (Bu et al., 2011). Segundo os autores, por ser um poderoso antioxidante, a quercetina apresenta capacidade de quelatação de íons metálicos, eliminação de radicais livres e combate a peroxidação lipídica.

Melhora da arquitetura testicular de animais expostos ao Cd foi observada após a administração de suco de uva concentrado (Lamas et al., 2015). Da mesma forma, Leite et al. (2013) observaram redução no percentual de túbulos seminíferos com danos em animais expostos a 1,15mg/Kg de Cd (i.p.) e tratados durante 56 dias com semente de *Paullinia cupana*. Os autores sugerem que a *Paullinia cupana* apresentou efeito antioxidante contra a intoxicação por Cd. De forma contrária, Predes et al., (2016) relataram que não houve melhora nos danos testiculares induzidos pelo Cd, após 56 dias de tratamento com extrato hidroetanólico de *Arctium lappa* (300mg/Kg).

Observamos, neste trabalho, aumento do volume nuclear e citoplasmático das células de Leydig, o que refletiu no aumento do volume celular após a exposição ao Cd. Esses resultados podem indicar que a célula desenvolveu um mecanismo para compensar os danos morfológicos causados pelo metal (Blanco et al., 2009). Como o número de células de Leydig, por testículo e por grama de testículo, nos animais que receberam apenas o Cd se apresentou abaixo do controle, podemos inferir que o aumento nos parâmetros das células de Leydig nesses animais está relacionado a um processo de hipertrofia e não hiperplasia. Blanco et al. (2010) relataram hipertrofia das células de Leydig, vacuolização citoplasmática, aumento de retículo endoplasmático liso e acúmulo de gotículas de lipídios em camundongos intoxicados oralmente com 0,15 g/L de Cd. Os danos morfológicos nessas células persistem mesmo após a interrupção da exposição ao metal (Blanco et al., 2009).

Dessa forma, a exposição do Cd pode comprometer a esteroidogênese indicando que a célula de Leydig pode ser alvo inicial dos efeitos tóxicos do Cd enquanto desregulador endócrino (Siu et al., 2009). Entretanto, parece não haver consenso se os danos a essas células seriam consequência dos efeitos diretos do Cd, se seriam secundários às lesões vasculares causadas pelo metal ou ainda se seriam devido aos dois fatores (Blanco et al., 2010; Da Silva et al., 2021; Yang et al., 2022). Sabe-se que a suscetibilidade do endotélio testicular à toxicidade do Cd está relacionada à expressão do transportador de zinco ZIP8 pelas células endoteliais, que é o responsável pelo transporte e acúmulo do metal no citosol (Fujie et al., 2022). Assim, o comprometimento da síntese de testosterona e da vasculatura testicular podem interferir no fornecimento desse hormônio para o corpo sendo que, para os túbulos seminíferos, essa interferência pode ocorrer pelo aumento da espessura da túnica própria. Dessa forma, pode ocorrer perturbação no processo espermatogênico, uma vez que a testosterona é necessária para que ele ocorra (Wu et al., 2016).

Verificamos que os tratamentos com as três doses de PD e a dose de 100 mg/kg de PB de *E. edulis* foram capazes de restaurar os parâmetros alterados da célula de Leydig após a exposição ao Cd. Além disso, observamos aumento no número de células de Leydig por testículo nos animais que, após serem expostos ao Cd, foram tratados com 300 mg/kg da PD e com 100 e 300 mg/kg de PB. Ao considerarmos a relação existente entre essas células e a síntese de testosterona, e o papel desempenhado por esse hormônio na espermatogênese, podemos inferir que a melhora destes parâmetros tenha contribuído para a manutenção da arquitetura do epitélio germinativo, observada nesses grupos, após a exposição ao Cd e tratamento com a polpa de *E. edulis*. Predes et al. (2011), estudando o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* em ratos intoxicados com Cd, observaram que após 56 dias de tratamento (100mg/Kg) houve o restabelecimento dos parâmetros de Leydig, anteriormente alterados pelo metal. De forma semelhante, Mouro et al. (2020) relataram que o tratamento durante 42 dias com o óleo de *Euterpe oleracea* recuperou os parâmetros alterados de Leydig e aumentou a concentração de testosterona sérica, após a exposição oral a 4,28 mg/Kg de Cd (7 dias).

A exposição ao Cd, tanto crônica quanto aguda, tem sido associada a danos testiculares severos (Predes et al., 2016; Cupertino et al., 2017; Mouro et al., 2019b). A toxicidade do Cd tem sido relacionada à sua capacidade de causar estresse oxidativo, que leva ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e inibição do sistema de defesa antioxidante (Jahan et al., 2014; Da Silva et al., 2021). No presente estudo, não houve alteração das enzimas antioxidantes, SOD e CAT, após exposição ao Cd. Além disso, não houve alteração na concentração de MDA e ON nos animais expostos somente ao Cd. Estudos têm demonstrado que a exposição a baixas doses de Cd causa alteração na atividade de enzimas antioxidantes (Cupertino 2012, Djuric et al., 2015; Nascimento, 2017). A não alteração do status oxidativo, no presente trabalho, após sete dias de exposição ao Cd, pode ser devido a recuperação durante os 42 dias sem a exposição ao metal. Embora não tenham sido observadas alterações nas enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo após a exposição ao Cd, as patologias nos túbulos seminíferos, assim como as alterações na morfometria tubular, podem estar relacionadas ao acúmulo de Cd e não somente ao estresse oxidativo (Mouro et al., 2019b). A melhora destas alterações induzidas pelo metal após o tratamento com as polpas de *E. edulis* pode estar relacionada à capacidade de quelatação dos compostos presentes na planta. Segundo Li et al. (2017), os metabólitos secundários, como as antocianinas, são capazes de reduzir o acúmulo de Cd no organismo, por meio da quelatação de metais pesados nas células intestinais promovendo sua excreção. Dessa forma, nossos dados

mostram a importância de análises morfométricas e estereológicas que permitem detectar alterações aparentemente não evidentes, mas que acabam causando consequências severas, como observado nesse estudo.

Nossos resultados são semelhantes aos relatados na literatura para plantas do mesmo gênero. Mouro (2018) observou que a polpa desengordurada de *Euterpe oleracea*, nas mesmas concentrações usadas neste trabalho, apresentou atividade antioxidante revertendo danos tubulares e restabelecendo os parâmetros de Leydig alterados pelo Cd. De forma contrária, Nascimento (2017) verificou que o extrato hidroalcoólico de *E. edulis* (300, 600 e 900 mg/kg) não foi capaz de atenuar os danos testiculares induzidos por Cd (1,2mg/kg) em ratos Wistar. Os métodos de extração, dose, via de exposição e animais experimentais usados pela autora diferem dos usados neste trabalho. Assim, esses podem ser alguns dos motivos de termos observados resultados diferentes quando usamos a mesma concentração da polpa de *E. edulis* (300 mg/kg). Além disso, ainda segundo a autora, as altas dosagens do extrato hidroalcoólico de *E. edulis* (600 e 900 mg/kg) podem ter potencializado os danos causados pelos Cd, pelo fato de ser rico em polifenóis, que em altas concentrações podem apresentar efeito pró-oxidante.

5. Conclusões

A exposição ao Cd reduziu o percentual e altura de epitélio seminífero e aumentou no percentual e diâmetro do lúmen tubular e o percentual de túnica própria. Além disso, observou-se redução no número de células germinativas e na reserva e produção espermática. Os tratamentos com a PB de *E. edulis* foram mais eficazes na recuperação dos danos tubulares causados pelo Cd, impedindo a progressão de lesões graves. As polpas também apresentaram efeitos benéficos sobre as células de Leydig, em especial a PD que foi capaz de restabelecer os parâmetros anteriormente alterados pelo metal. A PB na concentração de 100 mg/kg foi a mais eficaz contra os danos causados pelo Cd sobre a estereologia das células de Leydig. É possível que a presença de compostos antioxidantes nas polpas de *E. edulis* sejam responsáveis pela recuperação dos danos induzido pela exposição ao metal. Esses compostos podem, ainda, terem reduzido o acúmulo de Cd devido sua capacidade de quelação de metais pesados.

6. Referências

Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec.* 94:239-47. 1946.

Amann RP, Almquist JO. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. *J Dairy Sci.* 45(6):774-781. 1962.

Amann, RP. 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. *Ann Biol Anim Biochim Biophys.* 3:219–241. 1963.

Aydos, K, Güven MC, Can B, Ergün A. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. *BJU Int.* 88(6):622-26. 2001.

Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci,* 44(5):818-833. 1977.

Bhardwaj JK, Panchal H, Saraf P. Cadmium as a testicular toxicant: A Review. *J Appl Toxicol.* 41(1):105-117. 2021.

Blanco A, Moyano MR, Molina AM, Blanco C, Flores-Acuna R, García-Flores JR, Espada M, Monterde JG. Quantitative study of Leydig cell populations in mice exposed to low doses of cadmium. *Bull Environ Contam Toxicol.* 82(6):756-60. 2009.

Blanco A, Moyano R, López AMM, Blanco C, Flores-Acuna R, García-Flores JR, Espada M, Monterde JG. Preneoplastic and neoplastic changes in the Leydig cells population in mice exposed to low doses of cadmium. *Toxicol Ind Health.* 26(8):451-57. 2010.

Borges GSC, Vieira FCK, Copetti C, Gonzaga LV, Zambiasi RC, Filho JM, Fett R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Res Int.* 44:128–33. 2011.

Bu T, Mi Y, Zeng W, Zhang C. Protective effect of quercetin on cadmium-induced oxidative toxicity on germ cells in male mice. *Reprod Biol.* 294:520-26. 2011.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation methods. *Methods Enzymol.* 52:302-310. 1978.

Costa CA, Ognibene DT, Cordeiro VSC, De Bem GF, Santos IB, Soares RA, Cunha LLM, Carvalho, LCRM, Moura RS, Resende AC. Effect of *Euterpe oleracea* Mart. seeds extract on chronic ischemic renal injury in renovascular hypertensive rats. *J Med Food.* 20(10):1002-1010. 2017.

Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol.* 25(2):119-31. 1997.

Creasy DM. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol Pathol.* 29(1):64-76. 2001.

Creasy DM. Histopathology of the male reproductive system II: interpretation. *Curr Protoc Toxicol.* Chapter 16:Unit16 4. 2002.

Cupertino MC, Novaes RD, Santos EC, Bastos DSS, Santos DCM, Fialho MCQ, Matta SLP. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. *Life Sci.* 15:23–30. 2017.

Cuyper A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Geilen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld J, Smeets K. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals.* 23(5):924-40. 2010.

Da Silva J, Gonçalves RV, Melo FC, Sarandy MM, Matta SLP. Cadmium exposure and testis susceptibility: A systematic review in murine models. *Biol Trace Elem Res.* 199(7):2663-76. 2021.

Dieterich S, Bielick 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. *J Am Heart Assoc.* 101:33-39. 2000.

Djuric A, Begic A, Gobeljic B, Stanojevic I, Ninkovic M, Vojvodic D, Pantelic A, Zebic G, Prokic V, Dejanovic 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 Chem Toxicol.* 86:25-33. 2015.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95. 2002.

Elmallah MIY, Elkhadragey MF, Al-Olayan WM, Moneim AEA. Protective Effect of *Fragaria ananassa* crude extract on cadmium-induced lipid peroxidation, antioxidant enzymes suppression, and apoptosis in rat testes. *Int J Mol Sci.* 18(5):957. 2017.

EMBRAPA. Sistema de produção do açaí. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125409/1/SISTEMA-PROD-4-ONLINE-.pdf>. Acessado em janeiro de 2019.

França LR, Russell LD. The testis of domestic animals. In: *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications. 198 – 219. 1998.

Freitas RB, Novaes RD, Gonçalves RV, Mendonça BG, Santos EC, Ribeiro AQ, Lima LM, Fietto LG, Peluzio MCG, Leite JPV. *Euterpe edulis* extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:8173876. 2016.

Fujie T, Ito K, Ozaki Y, Takahashi S, Yamamoto C, Kaji T. Induction of ZIP8, a ZIP transporter, via NF- κ B signaling by the activation of I κ B α and JNK signaling in cultured vascular endothelial cells exposed to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol*. 434:1-10. 2022.

Garcia JAA, Correa RCG, Barros L, Pereira C, Abreu RMV, Alves MJ, Calheli RC, Bracht A, Peralta RM, Ferreira ICFR. Chemical composition and biological activity of juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit by-products, a promising underexploited source of high-added value compounds. *J Funct Foods*. 55:325. 2019.

Hochereau-de-Reviere MT, Lincoln GA. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J Reprod Fertil*. 54(2):209-213. 1978.

Jahan S, Zahra A, Irum U, Iftikhar N, Ullah H. Protective effects of different antioxidants against cadmium induced oxidative damage in rat testis and prostate tissues. *Syst Biol Reprod Med*. 60(4):199-205. 2014.

Johnsen SG. 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 CS, Neaves WB. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. *Biol Reprod*. 25:217-226. 1981.

Lamas CA, Gollücke APB, Dolder H. Grape juice concentrate (G8000®) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. *Int J Exp Pathol*. 96(5):301–310. 2015.

Leite RP, Predes FS, Monteiro JC, Freitas KM, Wada RS, Dolder H. Advantage of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation on cadmium-induced damages in testis of adult Wistar rats. *Toxicol Pathol*. 41(1):73–79. 2013.

Li W, Tang D, Li F, Tian H, Yue X, Li F, Weng X, Sun W, Wang W, Mo F. Supplementation with dietary linseed oil during peri-puberty stimulates steroidogenesis and testis development in rams. *Theriogenology*. 102:10-15. 2017.

Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 238(3):209-14. 2009.

Mahmoudi R, Azizi A, Abedini S, Jahromi VH, Abidi H, Barmark MJ. Green tea improves rat sperm quality and reduced cadmium chloride damage effect in spermatogenesis cycle. *J Med Life*. 11(4):371-80. 2018.

Massányi P, Massányi M, Madeddu R, Stawarz R, Norbert Lukác. Effects of cadmium, lead, and mercury on the structure and function of reproductive organs. *Toxics*. 8(4):94. 2020.

Melo FCSA, Matta SLP, Paula TAR, Gomes MLM, Oliveira LC. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biol Res*. 43:445-450. 2010.

Moldoveanu SC, David V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. In *Tech Open*. 2018.

Mouro VGS, Siman VA, Silva J, Dias FCR, Damasceno EM, Cupertino MC, Melo FCSA, Matta SLP. Cadmium-induced testicular toxicity in mice: subacute and subchronic route-dependent effects. *Biol Trace Elem Res*. 193(2):466-482. 2019a.

Mouro VGS, Martins ALP, Silva J, Menezes TP, Gomes MLM, Oliveira JA, Melo FCSA, Matta SLP. Subacute testicular toxicity to cadmium exposure intraperitoneally and orally. *Oxid Med Cell Longev*. (3):3429635. 2019b.

Mouro VGS, Melo FCSA, Martins ALP, Gomes MLM, Oliveira GM, Freitas MBD, Demuner AJ, Leite JPV, Matta SLP. *Euterpe oleracea* (Martius) oil reverses testicular alterations caused after cadmium administration. *Biol Trace Elem Res*. 1-16. 2020.

Mouro, V. G. S. Ação antioxidante do açaí (*Euterpe oleracea* MART.) frente ao estresse oxidativo induzido pelo cádmio no testículo de camundongos adultos. 2018. 120f. Tese – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

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 AA, Conceição LL, Dias MMS, Cardoso LM, Castro CA, Ricci-Silva ME, Leite JPV, Peluzio MCG. Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* Mart. in mice. *J Food Nut Res*. 54(2):101–112. 2015.

Paniagua R, Nistal M, Saez FJ, Fraile B. Ultrastructure of the Aging Human Testis. *J Electron Microsc Tech*. 19(2):241-60. 1991.

Predes FS, Diamante MAS, Dolder H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *Int J of Exp Pathol*. 91(2):125–131. 2010.

Predes FS, Diamante MAS, Foglio MA, Dolder H. Effects of *Arctium lappa* on cadmium -induced damage to the testis and epididymis of adult Wistar rats. *Biol Trace Elem Res*. 173(2):362-71. 2016.

Predes FS, Monteiro JC, Matta SLP, Garcia MC, Dolder H. Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and *Ginkgo biloba*. *Biol Trace Elem Res*. 140(3):330-41. 2011.

Rani A, Jumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res*. 24(4):378-399. 2014.

Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide: Biol Chem*. 6(2):178-185. 2002.

Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press. Clearwater. 1990.

Santamarina AB, Jamar G, Mennitti LV, Cesar HC, Vasconcelos JR, Oyama LM, De Rosso VV, Pisani LP. Obesity-related inflammatory modulation by juçara berry (*Euterpe edulis* Mart.) supplementation in Brazilian adults: a double-blind randomized controlled trial. *Eur J Nutr*. 59(4):1693-1705. 2019.

Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 238(3): 240–249. 2009.

Thévenod F, Lee WK. Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. *Met Ions Life Sci*. 11:415-90. 2013.

Venditti M, Rhoum MB, Romano MZ, Messaoudi I, Russell JR, Minucci S. Evidence of melatonin ameliorative effects on the blood-testis barrier and sperm quality alterations induced by cadmium in the rat testis. *Exotoxicol Environ Saf*. 226:1-10. 2021.

Vieira GS, Marques ASF, Machado MTC, Silva VM, Hubinger MD. Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultraperformance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI–MS) in jussara (*Euterpe edulis*) extracts. *J Food Sci Technol*. 54(7):2135–2144. 2017.

Wang Y, Tang Y, Li Z, Hua Q, Wang L, Song X, Zou B, Ding M, Zhao J, Tang C. Joint toxicity of a multi-heavy metal mixture and chemoprevention in Sprague Dawley rats. *Int. J. Environ Res Public Health*. 17(4):1451. 2020.

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

Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int*. 23(9):8244-59. 2016.

Yang SH, Cheng ST, Liang C, Shi YH, Chen QS. Effects of cadmium exposure on Leydig cells and blood vessels in mouse testis. *Int J Environ Res Public Health*. 19(4):2416. 2022.

Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem*. 43(1):27-32. 1995.

Zhang T, Gao X, Luo X, Li L, Ma M, Zhu Y, Zhao L, Li R. The effects of long-term exposure to low doses of cadmium on the health of the next generation of mice. *Chem Biol Interact*. 312:1-10. 2019.

Zhu Q, Li X, Ge RS. Toxicological effects of cadmium on mammalian testis. *Front Genet*. 11:527. 2020.

Artigo 2

Efeito terapêutico do óleo de *Euterpe edulis* sobre a integridade testicular de camundongos intoxicados com cádmio

Resumo

Sabe-se que o cádmio (Cd) é um metal pesado tóxico capaz de causar alterações morfológicas e funcionais nos testículos. Por esse motivo, a busca por produtos vegetais ricos em compostos capazes de mitigar os efeitos prejudiciais do Cd sobre o testículo tem crescido. Dentre estes destaca-se o óleo de *E. edulis*, rico em ácidos graxos e compostos fenólicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do óleo de *E. edulis* nos testículos de camundongos Swiss intoxicados com Cd. Os animais do grupo controle receberam água destilada, os do grupo óleo 150 receberam 150mg/kg de óleo de *E. edulis*, os do grupo cádmio receberam 4,28 mg/kg de Cd durante sete dias e os animais do grupo veículo receberam Tween 20. Os demais grupos receberam 4,28 mg/kg de Cd durante sete dias e a partir do oitavo dia foram tratados com 50, 100 e 150 mg/kg de óleo de *E. edulis*. O óleo de *E. edulis*, nas doses testadas, foi capaz de recuperar o percentual de epitélio seminífero, lúmen e túnica própria anteriormente alterados pela exposição ao Cd. Além disso, o tratamento com as três doses do óleo também recuperou a altura de epitélio seminífero e o diâmetro do lúmen, apresentando valores semelhantes ao grupo controle. Houve o restabelecimento do número de células germinativas no estágio 1 após a administração de 100 e 150 mg/kg do óleo de *E. edulis*. A intoxicação com o Cd aumentou o diâmetro de Leydig, o volume nuclear, citoplasmático e da célula de Leydig. Entretanto, houve normalização desses parâmetros após o tratamento com todas as doses do óleo. O tratamento com o óleo, nas doses de 100 e 150 mg/kg, demonstrou capacidade de preservar os túbulos seminíferos, prevenindo o agravamento de patologias graves induzidas pelo Cd. Assim, pode-se concluir que o óleo de *E. edulis* apresentou efeito terapêutico sobre a integridade testicular após intoxicação com o Cd.

1. Introdução

A exposição a poluentes ambientais tem se tornado uma preocupação crescente devido aos potenciais efeitos adversos que podem exercer sobre a saúde humana (Zhao et al., 2017; He et al., 2020). Entre esses poluentes, o cádmio, um metal pesado amplamente distribuído no meio ambiente devido a atividades industriais e práticas agrícolas, tem despertado particular interesse devido à sua toxicidade cumulativa e ampla gama de impactos biológicos (Zhao et al., 2017; Wang et al., 2020). Os seres humanos estão constantemente expostos ao metal devido seu uso extensivo na indústria e pela ingestão de água e alimentos contaminados ou pela inalação da fumaça de cigarro (Li et al., 2015; Squadrito et al., 2016). Além disso, o Cd possui um meia-vida prolongada no organismo (20-30 anos), de forma que mesmo quando a exposição ocorre em níveis baixos, ele pode se acumular progressivamente em diversos tecidos (Tian et al., 2017; Da Silva et al., 2021).

A toxicidade do cádmio está associada a disfunções em diversos sistemas biológicos, incluindo o sistema reprodutivo masculino. Estudos prévios relataram a deterioração da morfologia e função testicular em resposta à exposição ao cádmio. Medina et al. (2017) relatou que o Cd causou alterações morfológicas em células germinativas, ruptura da barreira hematotesticular (BHT) e vacuolização na célula de Sertoli. O Cd também causa danos as células de Leydig, Predes et al. (2011) verificaram que após a exposição a 3 $\mu\text{mol/kg}$ de Cd houve redução no diâmetro nuclear, volume nuclear, citoplasmático e da célula de Leydig como um todo. Danos às células de Leydig após intoxicação com Cd podem ser acompanhados da redução na concentração de testosterona sérica (Yi et al., 2022). O cádmio, quando absorvido pelo organismo, pode levar a uma ampla gama de respostas adversas, sendo o estresse oxidativo uma das principais vias de toxicidade (Cuypers et al., 2010). A geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida pelo cádmio leva à oxidação lipídica, danos ao DNA e degradação de proteínas, afetando assim a homeostase celular (Da Silva et al., 2021).

Estudos científicos desempenham papel importante na busca por estratégias de mitigação eficazes contra os danos causados por esse metal tóxico. Nesse contexto, produtos vegetais têm se destacado como fontes potenciais de substâncias protetoras devido suas propriedades antioxidantes e capacidade de quelação de metais pesados (Lamas et al., 2015; Leite et al., 2013; Mouro et al., 2020). Os óleos vegetais, como o óleo de *E. edulis*, apresentam em sua composição uma variedade de substâncias antioxidantes, como os triglicerídeos e compostos fenólicos (Freitas et al., 2016), protegendo os tecidos contra os danos lesivos dos radicais livres.

Até o momento, não foram encontrados estudos que avaliem o efeito terapêutico do óleo de *E. edulis* após intoxicação com o Cd. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o uso do óleo de *E. edulis* contra os efeitos tóxicos do Cd nos testículos, visando contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação do óleo contra os efeitos adversos do Cd sobre a espermatogênese.

2. Material e métodos

2.1. Extração do óleo de *E. edulis*

Os frutos do *E. edulis* foram obtidos no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), importante área remanescente de Mata Atlântica localizada na região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais (20°54'S e 42°32'W). Frutos maduras de *E. edulis* foram selecionados, pesados e desinfetados com solução contendo água e cloro. A polpa obtida pela maceração dos frutos foi liofilizada e acondicionada em sacos de polietileno, revestido com folha de alumínio para impedir a passagem da luz, e armazenados em temperatura de -20 °C. Para a obtenção do óleo de *E. edulis*, uma amostra da polpa liofilizada (18g) foi submetida a extração com éter etílico (600ml), utilizando um extrator Soxhlet por 8 horas, conforme descrito por Freitas et al. (2016). O solvente lipofílico foi removido completamente por evaporador rotativo, produzindo o óleo de *E. edulis*.

2.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais no óleo de *E. edulis*

Para determinação de fenólicos totais foi utilizado o padrão quercetina. Uma curva analítica foi construída com concentrações de quercetina variando de 0 a 30 ppm (n = 7 pontos) preparadas a partir da solução estoque de quercetina (100 mg L⁻¹) em água. Para verificar a mudança de cor na placa de porcelana foram pipetados 340 µL das soluções de quercetina, em diferentes concentrações, aos quais foram adicionados 10 µL da solução de cloreto férrico 1%. Também foi utilizada a placa de porcelana para observar mudança de cor dos extratos ao reagir com cloreto férrico. Para leitura no aplicativo PhotoMetrix[®], foram utilizados 2,0 mL das soluções de quercetina e dos extratos, respectivamente, aos quais foram adicionados 70 µL da solução de cloreto férrico 1% (p/v).

O teor de fenólicos totais também foi determinado utilizando a técnica de espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis). Para construção da curva analítica, foram utilizadas as mesmas soluções de quercetina preparadas para obtenção da curva analítica usando o PhotoMetrix[®].

Tanto para obtenção da curva analítica como para determinação do teor de fenólicos totais nos extratos, foram utilizados 2,0 mL das soluções de quercetina e dos extratos separadamente, aos quais foram adicionados 70 µL da solução de cloreto férrico 1% (p/v). A leitura foi realizada em $\lambda = 294$ nm.

2.3. Determinação da atividade antioxidante do óleo *in vitro*

A determinação de antioxidantes no óleo de *E. edulis* foi realizada utilizando como padrão o hidroxitoluenobutilado (BHT), de acordo com a metodologia citada por Yen e Chen (1995), com modificações. Inicialmente, foi construída uma curva analítica com diferentes concentrações de BHT (0; 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,0 mg L⁻¹; n = 6 pontos) preparadas a partir da solução estoque de BHT 100 mg L⁻¹ em água. Para isso, foram utilizados 6 tubos de ensaios de 25 mL para os quais foram transferidas alíquotas da solução padrão de BHT (0, 10, 25, 50, 75 e 100 µL), adicionados 2,5 mL da solução de ferricianeto de potássio 1% (p/v); 2,5 mL do tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH = 6,6) e a mistura foi incubada a 45 °C por 20 min. A seguir, foram adicionados 2,0 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e os volumes foram completados para 10,0 mL com água ultrapura.

Na placa de porcelana foram pipetados 340 µL das diferentes concentrações de BHT, aos quais foram adicionados 10 µL da solução de cloreto férrico 1% (p/v) para verificar a mudança de cor. Para leitura no PhotoMetrix®, uma alíquota de 2,0 mL de cada concentração de BHT e dos extratos separadamente, foi transferida para um tubo de ensaio de 25 mL ao qual foram adicionados 2,5 mL da solução de ferricianeto de potássio 1% (p/v); 2,5 mL do tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH = 6,6) e a mistura foi incubada a 45 °C por 20 min. A seguir, foram adicionados 2,0 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e 1,0 mL de água ultrapura para completar o volume para 10,0 mL.

O poder redutor nos extratos também foi determinado por UV-vis ($\lambda = 706$ nm) com uma curva analítica obtida utilizando as mesmas soluções de BHT preparadas para obtenção da curva analítica usando o PhotoMetrix®, utilizando um volume de 2,0 mL (das soluções de BHT e dos extratos (Figura 5)) e 70 µL da solução de cloreto férrico 1% (p/v).

2.4. Identificação de componentes derivatizados do óleo de *E. edulis*

Para realizar a derivatização foram transferidos 3 mg de amostra do óleo para vial de fundo cônico, adicionados 60 µL de piridina anidra e a mistura foi agitada no vórtex, a esta mistura foram adicionados 100 µL de BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) - Sigma – Aldrich (St. Louis, EUA). O frasco contendo essa mistura foi submetido ao

aquecimento em banho de glicerina a 70 °C durante 30 minutos e após esfriar cada amostra foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) de acordo com Moldoveanu e David (2018). A identificação dos componentes dos extratos derivatizados foi através da similaridade ($90, \geq$), dos espectros de massas comparados com a biblioteca (Nist-11 e Wiley-7).

2.5. Animais e tratamentos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – 058/2016). Foram utilizados 42 camundongos Swiss em idade reprodutiva (70 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral com controle de iluminação ambiente (12h claro/12h escuro) e temperatura (24°C). Os animais foram divididos aleatoriamente em dez grupos experimentais (n = 6 animais/grupo), pesados e colocados em gaiolas coletivas. Assim, os animais de cada grupo receberam diariamente, por gavagem (Figura 1): 0,7 ml de água destilada durante 49 dias (controle negativo); 4,28 mg/kg de cloreto de cádmio (CdCl_2) durante 7 dias e água destilada a partir do oitavo dia (controle positivo); Tween 20 durante 42 dias (Tween); água destilada durante 7 dias e 150 mg/kg de óleo durante 42 dias (controle óleo 150). Os demais animais receberam 4,28 mg/kg de CdCl_2 por gavagem durante sete dias e a partir do oitavo dia receberam 50, 100 ou 1500 mg/kg de óleo de *E. edulis*, respectivamente. Os grupos experimentais e os tratamentos estão dispostos na Figura 1.

A dose e modo de administração escolhido basearam-se no estudo de Mouro et al. (2019) que verificaram que a dose fracionada de Cd administrada oralmente causa maiores danos ao testículo. As doses do óleo de *E. edulis* usadas nesta pesquisa foram escolhidas com base no estudo com o óleo de *E. oleracea* (Mouro et al., 2020).

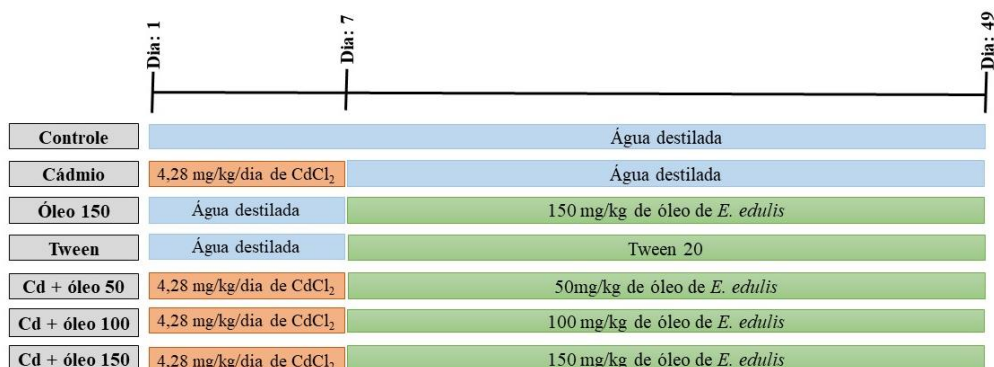


Figura 1. Grupos experimentais e tratamentos. Cd: cádmio.

2.6. Coleta de amostras, biometria corporal e testicular

Ao final do período de 49 dias os animais foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte) e eutanasiados. Primeiramente, os animais foram sedados e anestesiados com tiopental 30mg/Kg intraperitoneal. A anestesia foi aprofundada, seguida da coleta do sangue por meio de punção cardíaca levando os animais à morte por exsanguinação. Em seguida foi feita a abertura da cavidade abdominal, a partir de incisão na linha alba, para dissecação e obtenção dos testículos. O testículo direito foi congelado para realização das análises de estresse oxidativo e o testículo esquerdo foi destinado ao processamento histológico.

Para determinar o peso do parênquima testicular a albugínea foi retirada do testículo fixado, pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado nos pesos corporal e testicular, foi calculado o índice gonadossomático (IGS) baseado em Amann (1970) a partir da equação: $IGS (\%) = PG / PC \times 100$, onde PG = Peso total das gônadas e PC = Peso corporal. Baseado nos pesos do parênquima testicular e corporal, foi calculado o índice parenquimossomático (IPS), a partir da equação: $IPS (\%) = PTPT / PC \times 100$, onde PTPT = Peso do parênquima dos dois testículos e PC = Peso corporal (Mouro et al., 2020). 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) (Mouro et al., 2020).

2.7. Processamento histológico

Fragmentos de um dos testículos destinados ao estudo em microscopia de luz foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm, mantendo-se um intervalo de 13 cortes entre secções, e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha). Imagens dos tecidos foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o programa ImageJ.

2.8. Histopatologia

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

2.9. Morfometria e estereologia testicular

2.9.1. Morfometria tubular

As proporções tubulares foram obtidas por contagem de 2.660 pontos projetados em 10 imagens capturadas das preparações histológicas, com ampliação de 200X. 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 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 da média das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero (Mouro et al., 2020).

A área de túbulo seminífero foi calculada pela seguinte equação: $ArTS = \pi \cdot (RT)^2$, 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 (Mouro et al., 2020).

O comprimento total 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.

A população de células germinativas e células de Sertoli foram estimadas pela contagem de 10 secções transversais de túbulos seminíferos, no estágio 1 do ciclo do epitélio germinativo, segundo o método de morfologia tubular de Berndtson (1977). Foram contados os seguintes tipos celulares: espermatogônias (EGA), espermatócitos primários em preleptóteno (PLL), em paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (EA) e células de Sertoli (CS) com nucléolos bem evidentes.

Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos dos tipos celulares estudados, para cada animal, em aumento de 400x. Para a espermatogônia, que apresenta núcleo ovoide, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre o diâmetro nuclear maior e menor. Como o núcleo da célula de Sertoli é irregular, foi medido o seu nucléolo. O número de células de Sertoli foi corrigido para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico. Assim, foram contabilizadas exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente. Devido a variação de tamanho a contagem dos tipos celulares foi corrigida pela fórmula proposta por Abercrombie (1946) e modificada por Amann e Almquist (1962). A partir dos valores corrigidos foi possível quantificar os seguintes coeficientes: mitose espermatogonial (PLL/EGA), rendimento meiótico (EA/PQ),

rendimento geral da espermatogênese (EA/EGA), índice da célula de Sertoli (EA/CS) e a capacidade total de suporte da célula de Sertoli ((EGA+PLL+PQ+EA)/CS). O número total de células de Sertoli foi obtido pelo número corrigido de nucléolos e o comprimento total de túbulos seminíferos (Hochereau-de-Reviere e Lincoln, 1978). O número de células de Sertoli por grama de testículo foi determinado a partir do número de células de Sertoli por testículo e do peso bruto de um testículo.

A produção espermática diária (PED) foi determinada de acordo com Amann e Almquist (1962) e Amann (1970): $PED = (VTS \times EAR) / (DC \times AST \times EC)$, onde: VTS

= Volume total de túbulos seminíferos (μm^3), EAR = Número corrigido de espermátides arredondadas, DC = Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias), AST = Área da secção transversal do túbulo seminífero (μm^2) e EC = Espessura do corte histológico (μm). A produção espermática diária por grama de testículo (PED/g) foi obtida a partir da fórmula: $PED/gT = PED / PT$, onde PT = peso testicular. O ciclo do epitélio seminífero em camundongos dura 9 dias (Russel et al., 1990), sendo uma constante biológica espécie-específica.

A reserva espermática testicular (RET) foi calculada com base na população celular de EA, de acordo com a fórmula descrita por Amann (1970) e Berndtson (1977), com adaptações. Assim a $RET = (\text{comprimento total dos túbulos seminíferos} / \text{espessura do corte}) \times (\text{número corrigido de EA})$.

2.9.2. *Morfometria intertubular*

A proporção 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 equação: proporção do elemento nos testículos x peso parênquima dos testículos/100 (Mouro et al., 2020).

2.9.3. Morfometria e estereologia da célula de Leydig

Foi medido o diâmetro nuclear médio, em μm , das células de Leydig em aumento de 400x, totalizando 30 núcleos para cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram mais esféricos e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir das equações abaixo, foram calculados então o volume nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig (VL), em μm^3 : $VNL = 4/3 \pi R^3$, onde R= Raio nuclear. $VCL = \%CL \times VNL / \%NL$, onde $\%CL$ = Proporção volumétrica de citoplasma de Leydig e $\%NL$ = Proporção volumétrica de núcleo de Leydig. $VL = VNL + VCL$ (Russell et al., 1990).

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. 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. Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo foi utilizada a equação: 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: $ILS = \text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular} / \text{PC} \times 100$, onde PC= peso corporal (Mouro et al., 2020).

2.10. Parâmetros bioquímicos

Para a avaliação enzimática o testículo foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 7.4) na proporção de 100 mg de órgão para 1000 μL . A suspensão foi centrifugada (12000 rpm à 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante utilizado nas análises na determinação da atividade de enzimas antioxidantes, concentração de óxido nítrico, malondialdeído e proteína total.

A atividade enzimática da catalase (CAT) foi mensurada segundo Dieterich et al. (2000) pela taxa de queda da absorbância, em 60 segundos, do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) e homogenato de tecido em espectrofotômetro ($\lambda = 240\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio e $240 = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados expressos em U CAT/mg proteína.

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa, em 570 nm, baseado na capacidade dessa enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- e H_2O_2 e assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000).

Para determinação dos níveis de malondialdeído (MDA), as amostras foram colocadas para reagir com solução de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e HCl 0,25 N) por 40 min em banho-maria (90°C). A formação de TBARS foi monitorada a 535 nm em um espectrofotômetro de microplaca (PowerWave X) (Buege e Aust, 1978).

O nitrito usado como indicador da síntese de óxido nítrico é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5% H_3PO_4 . Desta forma, 50 μ L do sobrenadante das amostras foram adicionados em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro de exploração de microplacas. A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em μ M (Ricart-Jané et al., 2002; Droge, 2002).

2.11. Análises estatísticas

Antes de serem analisados, os valores percentuais médios obtidos foram transformados em arcoseno. Os parâmetros foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para os dados paramétricos e os dados não paramétricos foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis. Foi utilizado o software PRISM, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

3. Resultados

3.1. Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos, atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos do óleo de *E. edulis*

Os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do óleo de *E. edulis* encontram-se na Tabela 1. Após a obtenção dos cromatogramas foi possível identificar os ácidos graxos presentes no óleo de *E. edulis* (Tabela 2).

Tabela 1. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do óleo de *E. edulis*.

Óleo	Absorbância	PhotoMetrix	UV-Vis
Teor de fenólicos totais	0,150	651,60 ± 0,47	654,83 ± 0,28
Atividade antioxidante	0,090	4,064 ± 0,04	5,023 ± 0,02

Valores obtidos utilizando o App PhotoMetrix e UV-Vis. Valores expressos em mg 100 g⁻¹ de amostra (média ± desvio padrão).

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de *E. edulis*.

TR*	Compostos	Nomenclatura	% **
37,420	C16:0	Ácido hexadecanóico (Ácido palmítico)	31,81
41,300	C18:2	Ácido (9Z,12Z)-octadeca- 9,12-dienoico (Ácido linoleico)	13,84
41,420	C18:1	Ácido (9Z)-octadec-9-enóico (Ácido oleico)	54,35

* Tempo de retenção (TR); *(%) óleo da polpa de *E. edulis*.

3.2. Biometria corporal e testicular

Os dados referentes a biometria corporal e testicular encontram-se na Tabela 3. Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros avaliados.

Tabela 3. Biometria corporal e testicular da animais intoxicados com o Cd e tratados com o óleo de *E. edulis*.

	Controle	Cádmio	Óleo 150	Cd+óleo 50	Cd+óleo 100	Cd+óleo 150
PC	37,26±8,34	39,88±4,07	40,78±1,41	38,77±2,28	35,07±4,69	36,58±2,69
PT	0,21±0,03	0,20±0,06	0,20±0,02	0,21±0,02	0,18±0,03	0,19±0,02
PP	0,18±0,03	0,18±0,06	0,16±0,02	0,17±0,02	0,15±0,03	0,16±0,02
PA	0,03±0,02	0,02±0,01	0,04±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
IGS	0,53±0,06	0,49±0,14	0,47±2,15	0,53±0,07	0,50±0,04	0,49±0,06
IPS	0,48±0,08	0,45±0,13	0,39±0,05	0,45±0,04	0,43±0,05	0,45±0,03

Média ± desvio-padrão. Cd: cádmio; PC: peso corporal; PT: peso testicular; PP: peso do parênquima; PA: peso da albugínea; IGS: índice gonadossomático; IPS: índice parenquimossomático.

3.3. Histopatologia

Nas secções histológicas testiculares dos animais do grupo controle foram observados túbulos seminíferos com arquitetura normal. O epitélio seminífero apresentava todas as células da linhagem germinativa e células de Sertoli com nucléolos bem evidentes (Figura 2).

Após a exposição ao Cd foram observadas alterações nos túbulos seminíferos, tais como: vacuolização, desprendimento de células germinativas e desorganização do epitélio, bem como ausência de células germinativas e/ou de Sertoli (Figura 2). Entretanto, o percentual de patologias leves não diferiu entre os grupos experimentais. O percentual de patologias graves reduziu nos grupos em que os animais intoxicados com Cd foram tratados com 100 e 150 mg/kg do óleo de *E. edulis* em comparação com os animais do grupo que receberam somente o Cd (Figura 3).

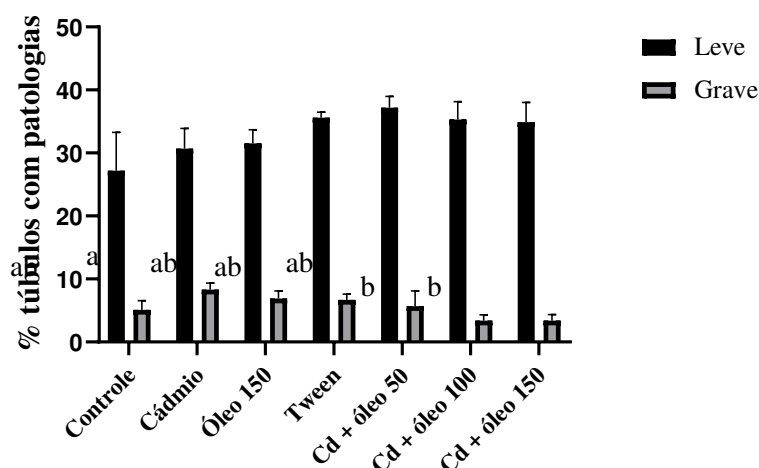


Figura 3. Quantificação de túbulos seminíferos com patologias de camundongos expostos ao Cd e tratados com o óleo de *E. edulis* (50, 100 e 150 mg/kg). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4. Histomorfometria tubular

Os parâmetros morfométricos tubulares de animais expostos ao Cd e tratados com diferentes doses do óleo de *E. edulis* estão apresentados na Tabela 4. Houve redução no percentual de epitélio seminífero e aumento no percentual de túnica própria e de lúmen nos animais intoxicados com Cd durante sete dias em comparação aos demais grupos. Observou-se ainda redução na altura de epitélio e aumento no diâmetro luminal, na área de lúmen e na relação túbulo/epitélio nos animais do grupo cádmio em relação a todos os grupos tratados. O tratamento com o óleo após a intoxicação com o metal normalizou os parâmetros anteriormente alterados, como observado pelos valores semelhantes ao grupo controle. Os demais parâmetros não diferiram significativamente entre os grupos experimentais.

O número corrigido de células germinativas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero é apresentado na Tabela 5. Houve redução no número de espermatogônias, espermatócitos primários em preleptóteno, espermatócitos em paquíteno e espermátides arredondadas nos animais expostos ao Cd em relação ao grupo controle e aos animais tratados com o óleo após serem intoxicados com o metal.

As razões entre os tipos celulares, índice de células de Sertoli, produção espermática diária e reserva espermática diária encontram-se na Tabela 5. A produção espermática diária por grama de testículo e reserva espermática diária por grama de testículo, no grupo cádmio,

diminuíram significativamente em comparação ao grupo controle. Entretanto, observou-se a recuperação desses parâmetros após o tratamento com diferentes doses do óleo de *E. edulis*.

3.5. Histomorfometria intertubular

Houve aumento no percentual de citoplasma de Leydig e no percentual de Leydig nos animais tratados somente com o óleo e nos animais que, após serem intoxicados com Cd, foram tratados com 50mg/kg do óleo de *E. edulis* em relação ao grupo Cádmio (Tabela 6).

Com relação a estereologia da célula de Leydig, a intoxicação com o Cd aumentou o diâmetro de Leydig, o volume nuclear e citoplasmático de Leydig, que acarretou o aumento no volume da célula de Leydig em relação aos animais do grupo controle (Tabela 7). O tratamento com diferentes doses do óleo de *E. edulis* normalizou as alterações causadas pelo metal. Observou-se que os animais intoxicados com Cd e tratados com 150mg/kg de óleo de *E. edulis* apresentaram aumento no número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo em comparação ao grupo que recebeu apenas o Cd (Tabela7).

Tabela 4. Densidade volumétrica, volume dos componentes tubulares, morfometria tubular e estereologia de camundongos expostos ao Cd e tratados com o óleo de *E. edulis*.

Parâmetro	Controle	Cádmio	Óleo 150	Tween	Cd+ óleo 50	Cd+óleo 100	Cd+óleo 150
Túbulo (%)	93,51 ± 1,64	93,81 ± 1,03	92,32±0,62	92,66±0,49	92,35±0,67	93,45±0,47	92,87±0,73
Intertúbulo (%)	6,49 ± 1,64	6,19 ± 1,03	7,68±0,62	7,34±0,49	7,65±0,67	6,55±0,47	7,13±0,73
Epitélio (%)	83,33 ± 1,10 ^a	80,42 ± 1,45 ^b	83,51±1,10 ^a	82,92±0,60 ^a	82,86±0,55 ^a	83,65±0,95 ^a	83,12±0,79 ^a
Túnica (%)	3,33 ± 0,37 ^a	4,20 ± 0,80 ^b	3,03±0,40 ^a	3,05±0,12 ^a	3,04±0,17 ^a	3,31±0,13 ^a	3,13±0,18 ^a
Lúmen (%)	6,85 ± 0,98 ^a	9,19 ± 1,07 ^b	5,78±0,55 ^a	6,69±0,63 ^a	7,65±0,67 ^a	6,49±0,74 ^a	6,49±0,73 ^a
Túbulo (mL)	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,15±0,02	0,17±0,04	0,16±0,02	0,14±0,03	0,15±0,02
Epitélio (mL)	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,13±0,01	0,15±0,03	0,14±0,03	0,12±0,03	0,13±0,02
Túnica (mL)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
Lumen (mL)	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
DT (µm)	206,45±10,25	208,26±6,94	204,64±5,34	210,11±3,58	212,30±6,88	210,89±6,03	214,32±7,67
AE (µm)	81,39±4,53 ^a	75,14±4,82 ^b	83,97±2,15 ^a	81,60±3,17 ^a	82,84±3,52 ^a	81,84±3,52 ^a	82,93±3,83 ^a
DL (µm)	43,38±4,17 ^a	58,16±3,62 ^b	36,69±3,62 ^a	36,69±4,67 ^a	46,91±8,79 ^a	47,20±5,76 ^a	47,98±2,42 ^a
ArT (mm)	3,35±0,33	3,41±0,22	3,29±0,17	3,47±0,12	3,54±0,23	3,49±0,20	3,61±0,26
ArL (mm)	0,15±0,03 ^a	0,27±0,03 ^b	0,11±0,03 ^a	0,17±0,04 ^a	0,18±0,06 ^a	0,18±0,04 ^a	0,18±0,02 ^a
ArE (mm)	3,20±0,32	3,14±0,25	3,18±0,25	3,29±0,12	3,37±0,20	3,32±0,16	3,43±0,23
RTE	1,05±0,01 ^a	1,09±0,02 ^b	1,03±0,02 ^a	1,05±0,01 ^a	1,05±0,01 ^a	1,05±0,01 ^a	1,05±0,01 ^a
CTT/T (m)	4,91±0,76	4,89±1,44	4,49±0,32	4,99±1,06	4,59±0,76	4,08±0,89	4,18±0,47
CTT/gT (m/g)	24,03±2,49	24,01±0,83	22,50±3,10	22,39±3,10	22,21±2,77	22,36±2,54	22,44±1,73
ITS (%)	0,45±0,08	0,42±0,13	0,36±0,04	0,46±0,08	0,42±0,04	0,40±0,05	0,41±0,05
IES (%)	0,40±0,07	0,36±0,11	0,33±0,04	0,41±0,07	0,37±0,04	0,36±0,04	0,37±0,05

Média ± desvio-padrão. Cd: cádmio; DT: diâmetro tubular; AE: altura de epitélio; DL: diâmetro do lúmen; ArT: área de túbulo; ArL: área de lumen; ArE: área de epitélio; RTE: relação túbulo/epitélio; CTT/T: Comprimento de túbulo seminífero nos testículos; CTT/gT: Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo; ITS: índice tubulossomático; IES: índice epiteliossomático. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Tabela 5. População celular corrigida, razões entre os números celulares, índice da célula de Sertoli, produção e reserva espermática de camundongos intoxicados com Cd e tratados com óleo de *E. edulis*.

Parâmetro	Controle	Cádmio	Óleo 150	Tween	Cd + óleo 50	Cd + óleo 100	Cd + óleo 150
Gônia	2,39±0,16 ^a	1,57±0,20 ^b	1,85±0,37 ^{ab}	1,94±0,18 ^{ab}	2,10±0,37 ^{ab}	2,24±0,39 ^a	2,42±0,38 ^a
PLL	27,68±2,33 ^a	20,46±0,42 ^b	24,91±1,91 ^a	25,54±1,26 ^a	25,53±1,48 ^a	24,77±2,43 ^a	22,88±1,26 ^a
PQ	31,78±2,37 ^a	23,94±1,85 ^b	29,95±2,06 ^a	31,68±4,34 ^a	31,89±3,49 ^a	30,44±1,93 ^a	29,14±5,80 ^a
EA	62,60±7,15 ^a	48,30±4,63 ^b	65,58±5,44 ^a	63,15±4,28 ^a	69,00±7,19 ^a	68,10±4,74 ^a	62,18±9,05 ^a
CS	4,78±0,83	4,44±1,68	4,94±0,92	4,90±0,44	5,24±0,14	5,35±0,54	5,44±0,52
IMt	11,56±0,56	13,26±1,89	13,90±3,14	13,28±1,68	12,50±2,62	11,37±2,47	9,58±1,26
RG	26,23±3,14	31,25±4,98	36,46±7,42	32,84±4,39	33,87±8,40	30,99±4,26	25,92±3,67
IMe	1,97±0,11	2,02±0,20	2,19±0,17	2,03±0,33	2,17±0,12	2,24±0,15	2,17±0,32
ICS	13,31±1,91	12,04±4,23	13,90±3,14	13,28±1,68	13,18±1,48	12,81±1,35	11,60±2,49
NCG	124,46±11,07 ^a	84,27±5,28 ^b	122,29±8,86 ^a	122,31±6,70 ^a	128,52±11,24 ^a	125,55±8,05 ^a	116,63±14,58 ^a
CTCS	26,51±3,81	23,62±8,26	25,25±3,56	25,12±2,63	24,54±2,31	23,59±2,07	21,67±3,98
CS/T	1,94±0,52	1,78±0,69	1,79±0,42	1,84±0,33	1,97±0,28	2,06±0,16	2,02±0,19
CS/gT	20,07±9,40	17,71±6,35	17,38±5,10	16,65±2,18	19,04±2,85	22,09±3,05	21,44±3,24
PED	6,80±1,62	5,12±1,59	7,05±0,80	6,92±1,18	6,99±1,48	6,43±0,78	5,62 ±1,17
PED/gT	65,95±8,23 ^a	48,99±3,83 ^b	67,70±7,85 ^a	62,66±5,89 ^a	66,82±10,22 ^a	68,39±7,53 ^a	59,10±10,82 ^a
RET	12,42±2,91	9,23±2,86	12,68±1,44	12,46±2,13	12,58±2,67	11,57±1,40	10,12±2,11
RET/gT	118,72±14,81 ^a	88,19±6,88 ^b	121,85±14,13 ^a	112,78±10,61 ^a	120,28±18,39 ^a	123,11±13,55 ^a	106,38±19,48 ^a

Cd: Cádmio; PLL: espermátocito em preleptóteno; PQ: espermátocito em paquíteno; EA: espermátide arredondada; CS: célula de Sertoli; IMt: índice mitótico; RG: rendimento geral; IMe: índice meiótico; ICS: índice da célula de Sertoli; NCG: número corrigido de células germinativas; CTCS: capacidade total de suporte das células de Sertoli; CS/T: número de células de Sertoli por testículo; CS/gT: número de células de Sertoli por grama de testículo; PED: produção espermática diária; PED/gT: produção espermática diária por grama de testículo; RET: reserva espermática testicular; RET/gT: reserva espermática diária por grama de testículo. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de

Tabela 6. Proporção volumétrica e volume dos elementos do compartimento intertubular de camundongos expostos ao cádmio e tratados com diferentes doses de polpa desengordurada e polpa bruta de *Euterpe edulis*. (n = 5 animais/grupo).

	Controle	Cd	Óleo	Tween	Cd+ óleo 50	Cd+óleo 100	Cd+óleo 150
<i>Percentual no testículo (%)</i>							
INT	6,49 ± 1,64	6,19 ± 1,03	7,68±0,62	7,34±0,49	7,65±0,67	6,55±0,47	7,13±0,73
CON	0,065±0,07	0,034±0,01	0,078±0,05	0,057±0,07	0,052±0,03	0,145±0,14	0,100±0,06
EL	0,462±0,18	0,469±0,22	0,272±0,13	0,191±0,10	0,298±0,19	0,282±0,18	0,340±0,19
VS	0,895±0,26	0,779±0,20	0,910±0,29	0,850±0,19	0,835±0,18	0,601±0,17	0,650±0,08
MAC	0,024±0,03	0,007±0,01	0,009±0,01	0,006±0,01	0,025±0,02	0,011±0,01	0,020±0,00
CL	4,11±1,01 ^{ab}	4,06±0,71 ^a	5,34±0,43 ^b	5,14±0,52 ^{ab}	5,35±0,49 ^b	4,52±0,39 ^{ab}	4,82±0,62 ^{ab}
NL	0,92±0,02	0,81±0,23	1,06±0,16	1,09±0,04	1,09±0,13	0,98±0,13	1,21±0,16
L	5,03±1,22 ^{ab}	4,87±0,88 ^a	6,40±0,50 ^b	6,23±0,48 ^{ab}	6,44±0,55 ^b	5,51±0,44 ^{ab}	6,03±0,74 ^{ab}
IIS	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00
<i>Volume por testículo (mL)</i>							
INT	0,011±0,002	0,011±0,003	0,012±0,002	0,014±0,003	0,013±0,002	0,010±0,002	0,010±0,001
CON	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
EL	0,001±0,000	0,001±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,001±0,000	0,000±0,000	0,001±0,000
VS	0,002±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,002±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,00
MAC	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
CL	0,007±0,001	0,007±0,002	0,009±0,002	0,010±0,002	0,009±0,001	0,007±0,001	0,008±0,001
NL	0,002±0,000	0,001±0,000	0,002±0,000	0,002±0,000	0,002±0,000	0,001±0,000	0,002±0,000
L	0,009±0,001	0,008±0,002	0,011±0,002	0,012±0,002	0,011±0,002	0,008±0,001	0,010±0,001

INT: Intertúbulo; TC: Tecido conjuntivo; EL: Espaço linfático; VS: Vaso sanguíneo; MAC: macrófago; CL: Citoplasma de Leydig; NL: Núcleo de Leydig; CL: Célula de Leydig; IIS: Índice Leydigossomático. Dados expressos em média±DP. Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Tabela 7. Estereologia das células de Leydig em camundongos expostos ao cloreto de cádmio e tratados com óleo de *Euterpe edulis*.

Parâmetro	Controle	Cd	Óleo	Tween	Cd+ óleo 50	Cd+óleo 100	Cd+óleo 150
DN (μm)	6,40 \pm 0,10 ^a	6,73 \pm 0,12 ^b	6,64 \pm 0,12 ^a	6,60 \pm 0,21 ^a	6,63 \pm 0,17 ^a	6,57 \pm 0,17 ^a	6,47 \pm 0,05 ^a
VN (μm^3)	137,44 \pm 6,37 ^a	159,81 \pm 8,53 ^b	153,55 \pm 8,0 ^a	151,17 \pm 14,55 ^a	152,99 \pm 11,31 ^a	149,21 \pm 11,78 ^a	141,68 \pm 3,22 ^a
V Cit. (μm^3)	620,82 \pm 99,24 ^a	834,16 \pm 181,18 ^b	787,72 \pm 152,42 ^a	707,75 \pm 84,56 ^a	758,67 \pm 124,99 ^a	694,24 \pm 113,34 ^a	568,35 \pm 56,27 ^a
VC (μm^3)	758,26 \pm 104,55 ^a	993,98 \pm 188,73 ^b	941,27 \pm 159,91 ^a	858,92 \pm 89,25 ^a	911,66 \pm 130,27 ^a	843,45 \pm 120,10 ^a	710,03 \pm 55,93 ^a
V Ley/T (mL)	0,009 \pm 0,001	0,008 \pm 0,002	0,010 \pm 0,002	0,011 \pm 0,002	0,011 \pm 0,001	0,008 \pm 0,002	0,010 \pm 0,002
V Ley/gT (mL)	0,043 \pm 0,010	0,042 \pm 0,006	0,051 \pm 0,007	0,052 \pm 0,005	0,054 \pm 0,003	0,046 \pm 0,005	0,052 \pm 0,007
N Ley/T ($\times 10^6$)	11,77 \pm 3,79 ^{ab}	8,46 \pm 1,41 ^b	11,24 \pm 2,71 ^{ab}	13,52 \pm 2,44 ^{ab}	12,45 \pm 1,66 ^{ab}	9,91 \pm 1,86 ^{ab}	13,80 \pm 2,28 ^a
N Ley/gT ($\times 10^6$)	57,89 \pm 17,17 ^{ab}	44,02 \pm 11,62 ^b	56,53 \pm 16,72 ^{ab}	61,01 \pm 6,99 ^{ab}	60,52 \pm 7,93 ^{ab}	54,98 \pm 7,93 ^{ab}	74,10 \pm 11,15 ^a
ILS (%)	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00

Cd: cádmio; ILS: Índice Leydigossomático. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes na mesma linha indica que os dados diferem significativamente entre si $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

3.6. Análises bioquímicas

A atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) não diferiu significativamente entre os grupos experimentais. A concentração de malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO) também não apresentaram variação significativa entre os tratamentos (Figura 4).

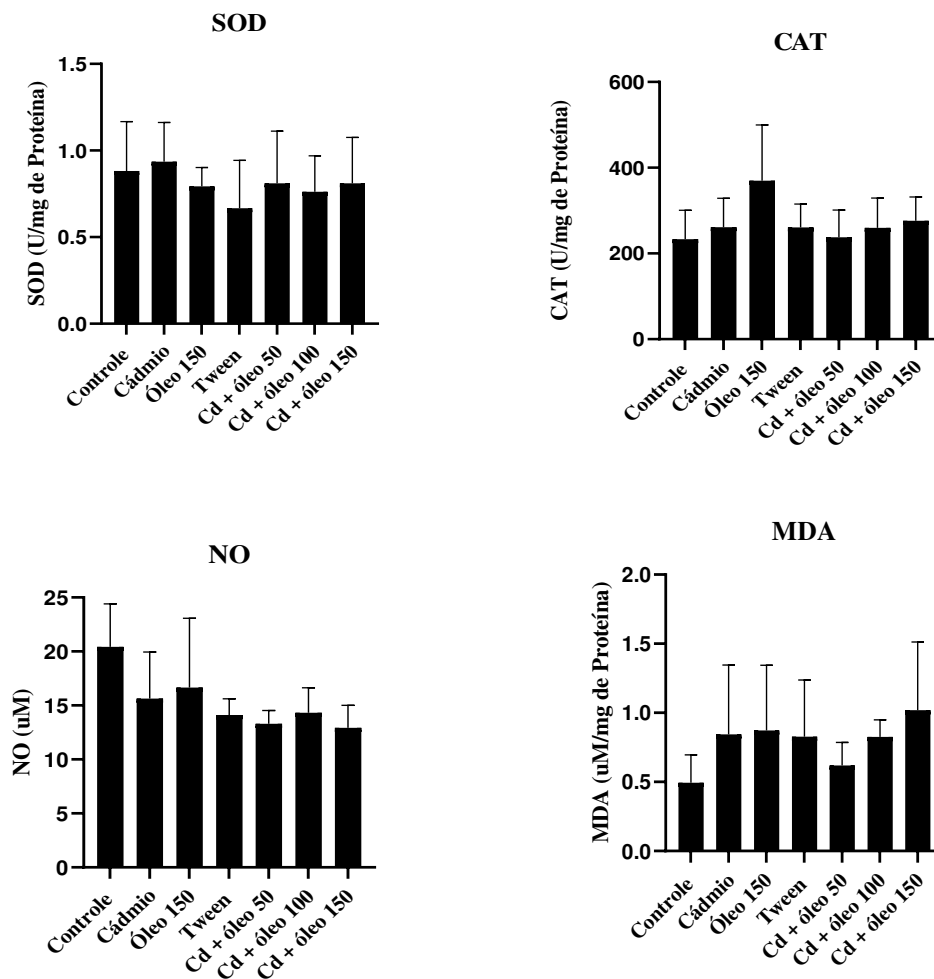


Figura 4. Atividade das enzimas antioxidantes e concentração de marcadores de estresse oxidativo do testículo de camundongos expostos ao cádmio e tratados com o óleo de *E. edulis*. SOD – Superóxido dismutase; CAT – Catalase; GST – Glutathione – S – Transferase; MDA – malondialdeído; NO – óxido nítrico.

4. Discussão

O uso de óleos vegetais ricos em compostos bioativos são uma importante estratégia para mitigar os efeitos tóxicos de metais pesados como o Cd. Neste estudo, o óleo extraído da palmeira juçara (*E. edulis*) apresentou predominância de ácido graxos insaturados, especialmente o ácido oleico monoinsaturado e o ácido linoleico poli-insaturado, além de ácidos graxos saturados como o ácido palmítico. Esses valores são semelhantes aos relatados por Freitas et al. (2016) ao avaliar o óleo de *E. edulis*. Sabe-se que os ácidos graxos são componentes cruciais das membranas celulares, influenciando sua fluidez e permeabilidade (Calder, 2017), assim o uso de óleos vegetais desempenham papel importante em prevenir e/ou tratar danos às células e melhorar a suas funções.

No presente trabalho, a exposição ao Cd reduziu o percentual de epitélio seminífero e aumentou o percentual de lúmen. Além disso, houve redução na altura de epitélio e aumento no diâmetro luminal, o que acarretou aumento na área de lúmen. As alterações podem ser resultado da descamação de células germinativas devido à perda de contato entre as células de Sertoli que formam a barreira hematotesticular (BHT). Além disso, a BHT torna-se mais permeável permitindo que substâncias tóxicas, como o Cd e outros metais pesados, possam chegar até os túbulos seminíferos (Siu et al., 2009). Um dos mecanismos descritos pelo qual o Cd pode afetar a BHT é através do aumento da síntese e liberação de citocinas que ativam a via de sinalização p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), que por sua vez estimula a produção de proteases (Siu et al., 2009; Ali et al., 2022). O resultado dessas alterações é a aceleração da endocitose e degradação de proteínas estruturais e reguladoras, o que compromete a integridade da BHT pela perturbação nas moléculas de adesão que a compõem (Ali et al., 2022). Observamos que o tratamento com o óleo foi capaz de reverter as alterações observadas nos animais intoxicados com o Cd. É provável que os compostos presentes no óleo tenham atuado inibindo a ativação da via p38 MAPK e evitando a perturbação das proteínas que formam a BHT, como foi observado por Chen et al. (2018) ao administrarem ácido ascórbico, um potente antioxidante, antes e após intoxicação com 2 mg/kg de Cd.

O aumento no percentual de túnica própria nos animais intoxicados com Cd pode ter contribuído para os danos estruturais observados no epitélio seminífero nesses animais. A túnica própria é formada pelas células peritubulares e a sua contração auxilia a liberação dos espermatozoides no lúmen tubular (O'Donnell et al., 2022). Além disso, essas células trabalham em conjunto com as células de Sertoli para formar a lâmina basal nos túbulos seminíferos, criando o nicho protegido para as células tronco espermatogoniais que sofrem

autorrenovação e diferenciação em espermatogônias (Chen et al., 2014). No presente trabalho, a intoxicação com o Cd reduziu o número de espermatogônias. Assim, o espessamento da túnica própria pode ter restringido a entrada de nutrientes e oxigênio nas células de Sertoli, comprometendo a manutenção da BHT e conseqüentemente o desenvolvimento das células germinativas.

O comprometimento da função da célula de Sertoli e da integridade da BHT deixa as células germinativas expostas à ação tóxica do Cd. Os danos causados aos túbulos seminíferos após exposição subaguda ao Cd refletem os efeitos negativos do metal sobre as células de Sertoli e células germinativas. No presente estudo, o Cd também reduziu significativamente o número de todos os tipos de células germinativas presentes no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. De acordo com Niknafs et al. (2015), a morte de células germinativas induzida pelo Cd pode estar relacionada à perda de contato entre as células de Sertoli e as células germinativas. A vitamina E, um dos compostos presentes no óleo de *E. edulis* (Freitas et al., 2016), apresentou efeito antiapoptótico no testículo de ratos Wistar intoxicados com Cd durante 28 dias através do aumento da expressão do gene Bcl-2 e diminuição da proporção Bax/Bcl-2 (Amanpour et al., 2019). Esses resultados indicam que a exposição ao Cd diminui a população de células responsáveis pela produção dos espermatozoides, o que pode resultar na diminuição da capacidade reprodutiva masculina e afetar negativamente a fertilidade. Entretanto, o tratamento com diferentes doses do óleo de *E. edulis* foi capaz de reverter essas alterações, o que indica que seus compostos podem proteger contra morte celular.

O cálculo da PED pode ser usado para avaliar a eficiência da espermatogênese (Aman et al., 1970) enquanto que o cálculo da RET mostra o potencial número de espermatozoides que estão sendo produzidos no testículo a cada ciclo do epitélio seminífero (França e Russell, 1998). Neste estudo, a intoxicação por Cd reduziu a PED e RET por grama testículo. Nossos resultados confirmam o efeito prejudicial do Cd sobre a população de células germinativas o que conseqüentemente afeta a produção de espermatozoides como resultado das alterações causadas ao epitélio seminífero. A melhora nesses parâmetros após o tratamento com o óleo de *E. edulis* evidenciam os efeitos benéficos do tratamento sobre o epitélio seminífero.

O tratamento com o óleo de *E. edulis* foi eficaz contra os danos causados ao epitélio seminífero após animais serem expostos ao Cd. Além disso, verificou-se redução na porcentagem de túbulos seminíferos com patologias graves nos animais tratados com 100 e 150 mg/kg do óleo, após intoxicação pelo Cd, em comparação com os animais que receberam apenas o metal. Esses resultados podem indicar que o óleo apresenta propriedade protetora

contra danos testiculares induzidos pelo Cd, ao contribuir para a preservação da integridade da BHT, o que evita a morte e perda de células germinativas

A avaliação estereológica das células de Leydig mostrou no presente estudo que Cd provocou o aumento do diâmetro nuclear. Além disso, houve aumento no volume nuclear e citoplasmático de Leydig resultando no aumento da célula de Leydig como um todo. Em associação a isso, houve uma tendência na diminuição do número de células de Leydig por testículo. Essas alterações podem estar relacionadas ao processo de morte celular por isquêmica ou necrose oncótica devido ao aumento da permeabilidade celular em decorrência do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, o que acarreta edema celular (Mouro et al., 2019). Entretanto, observou-se que o tratamento com o óleo restabeleceu esses parâmetros alterados pelo metal, em especial na concentração de 150 mg/kg. A análise do óleo de *E. edulis* neste trabalho mostrou a presença dos ácidos graxos insaturados oleico e linoleico. Os ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoleico são convertidos em ácidos graxos de cadeia longa, que são importantes constituintes das membranas celulares influenciando a permeabilidade e fluidez da bicamada lipídica (Calder, 2017; Pashkovskaya et al., 2018). Assim, é possível que as moléculas lipídicas presentes no óleo de *E. edulis* tenham auxiliado na recuperação das alterações induzidas pelo Cd nas células de Leydig.

As células de Leydig são responsáveis por sintetizar testosterona a partir do colesterol (Scott et al., 2009). A testosterona é então transportada até as células de Sertoli e liga-se ao receptor de andrógeno para promover a regulação da espermatogênese (Li et al., 2017). Dessa forma, a alteração na função das células de Leydig pode prejudicar a produção de testosterona e comprometer o processo espermatogênico. Como a testosterona também desempenha papel importante na manutenção da integridade da BHT (Smith e Walker, 2014), é possível que a normalização dos parâmetros da célula de Leydig, após o tratamento com óleo, tenha contribuído para a recuperação dos danos causados ao epitélio seminífero em animais intoxicados pelo Cd e tratados com diferentes doses do óleo de *E. edulis*. Mouro et al. (2020) observaram recuperação dos parâmetros da célula de Leydig alterados pela exposição ao Cd (4,28mg/kg) em camundongos tratados com óleo de *Euterpe oleracea*. Os autores também observaram aumento na concentração de testosterona, que pode estar associada ao favorecimento da síntese de colesterol (e por consequência de testosterona) devido a ingestão de ácidos graxos presentes no óleo.

Sabe-se que um dos mecanismos relacionados à toxicidade do Cd é a indução de estresse oxidativo que envolve o desequilíbrio entre a produção e eliminação de espécies

reativas de oxigênio (EROS) pelas enzimas antioxidantes, o que causa danos ao DNA e proteínas celulares (Da Silva et al., 2021). As EROS também causam a peroxidação dos ácidos graxos presentes nas membranas celulares tornando-as mais permeáveis, o que pode levar à perda de integridade (Cuypers et al., 2010). Faraji et al. (2018) relataram diminuição da atividade de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) em camundongos injetados com uma única dose via intraperitoneal de 5mg/kg de Cd. Os autores também observaram aumento na concentração de malondialdeído (MDA), um indicador de peroxidação lipídica.

No presente trabalho não foram observadas alterações na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, assim como na concentração dos marcadores de estresse oxidativo, NO e MDA, após intoxicação com Cd. Como esses animais foram eutanasiados 42 dias após a exposição ao metal, é possível que durante esse período a atividade das enzimas e as concentrações de NO e MDA tenham sido restabelecidas ou foram sutis a ponto de não serem detectadas. Wang et al. (2020) observaram a normalização da atividade de SOD e GSH e diminuição dos níveis de MDA após um ciclo espermatogênico em ratos (8 semanas) sem exposição ao Cd. Nossos resultados indicam que o Cd pode afetar os testículos causando alterações histomorfológicas significativas mesmo na ausência de alterações na atividade de enzimas antioxidantes. Esses danos podem ser resultados da ação direta do Cd sobre as células testiculares como a célula de Sertoli e as células germinativas, ou ainda sobre as células de Leydig provocando desregulação na produção de testosterona e, conseqüentemente afetando a espermatogênese. Uma avaliação abrangente e detalhada dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na toxicidade do Cd podem fornecer uma compreensão completa sobre sua ação nos testículos.

Dessa forma, a utilização de óleos vegetais, como o óleo de *E. edulis*, torna-se uma estratégia importante para proteger os testículos contra danos histomorfológicos e histopatológicos causados pela exposição ao Cd. No presente trabalho verificamos que o tratamento com o óleo foi eficaz contra os danos testiculares causados pelo Cd, protegendo o tecido testicular contra os efeitos adversos do metal.

5. Conclusões

Como bem descrito na literatura, a exposição ao Cd causa danos histomorfológicos a arquitetura testicular o que resulta em prejuízos as funções testiculares. A espermatogênese pode ser afetada diretamente pela diminuição do epitélio seminífero que detectamos após a

exposição subaguda ao Cd, o que compromete a produção de espermatozoides. As células de Leydig também são alvos da intoxicação pelo Cd, o que pode resultar em possível alteração na produção de testosterona, o que contribui para os prejuízos na espermatogênese. Entretanto, o tratamento com o óleo de *E. Edulis*, nas doses de 100 e 150mg/kg, foi capaz de prevenir o agravamento de lesões no epitélio seminífero após intoxicação, o que refletiu na melhora dos parâmetros tubulares nos grupos tratados. Ainda, os parâmetros de Leydig foram recuperados pelo tratamento com o óleo de *E. edulis*, possivelmente auxiliando a recuperação das alterações histomorfológicas observadas nos túbulos seminíferos.

6. Referências bibliográficas

- Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec.* 94:239-47. 1946.
- Ali W, Ma Y, Zhu J, Zou H, Liu Z. Mechanisms of cadmium-induced testicular injury: A risk to male fertility. *Cells.* 11(22):3061. 2022.
- Amann RP, Almquist JO. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. *J Dairy Sci.* 45(6):774-781. 1962.
- Amann RP. Sperm production rates. In: Johnson, A. D.; Gomes, W.R. *The testis.* New York: Academic Press, 1970.
- Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci.* 44(5):818-833. 1977.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation methods. *Methods Enzymol.* 52:302-310. 1978.
- Chen LY, Brown PR, Willis WB, Eddy EM. Peritubular Myoid Cells Participate in Male Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance. *Endocrinology.* 155(12): 4964–4974. 2014.
- Cuyper A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Geilen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld J, Smeets K. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals.* 23(5):924-40. 2010.
- Da Silva J, Gonçalves RV, Melo FCSA, Sarandy MM, Matta SLP. Cadmium exposure and testis susceptibility: a Systematic review in murine models. *Biol Trace Elem Res.* 199(7):2663-2676. 2021.
- Dieterich S, Bielick, 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. *J Am Heart Assoc.* 101:33-39. 2000.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95. 2002.
- EMBRAPA. Sistema de produção do açúcar. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125409/1/SISTEMA-PROD-4-ONLINE-.pdf>. Acessado em janeiro de 2019.
- França LR, Russell LD. The testis of domestic animals. In: *Male reproduction: a multidisciplinary overview.* Madrid: Churchill Communications. 198 – 219. 1998.

Freitas RB, Novaes RD, Gonçalves RV, Mendonça BG, Santos EC, Ribeiro AQ, Lima LM, Fietto LG, Peluzio MCG, Leite JPV. *Euterpe edulis* extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016.

He Y, Zou L, Luo W, Yi Z, Yang P, Yu S, Liu N, Ji J, Guo Y, Liu P, He X, Lv Z, Huang S. Heavy metal exposure, oxidative stress and semen quality: Exploring associations and mediation effects in reproductive-aged men. *244:125498*. 2020.

Hochereau-de-Reviere MT, Lincoln GA. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J Reprod Fertil*. 54(2):209-213. 1978.

Johnsen SG. 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.

Lamas CA, Gollücke APB, Dolder H. Grape juice concentrate (G8000®) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. *Int J Exp Pathol*. 96(5):301–310. 2015.

Leite RP, Predes FS, Monteiro JC, Freitas KM, Wada RS, Dolder H. Advantage of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation on cadmium-induced damages in testis of adult Wistar rats. *Toxicol Pathol*. 41(1):73–79. 2013.

Li W, Tang D, Li F, Tian H, Yue X, Li F, Weng X, Sun W, Wang W, Mo F. Supplementation with dietary linseed oil during peri-puberty stimulates steroidogenesis and testis development in rams. *Theriogenology*. 102:10-15. 2017.

Li Y, Wu J, Zhou W, Gao E. Association between environmental exposure to cadmium and human semen quality. *Int J Environ Health Res*. 26(2):175-86. 2015.

Medina MF, Arrieta MC, Villafane MN, Klyver SMR, Odstreil MA, González ME. Early signs of toxicity in testes and sperm of rats exposed to low cadmium doses. *Toxicol Ind Health*. 33(7):576-587. 2017.

Melo FCSA, Matta SLP, Paula TAR, Gomes MLM, Oliveira LC. The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biol Res*. 43:445-450. 2010.

Moldoveanu SC, David V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. In *Tech Open*. 2018.

Mouro, V. G. S. Ação antioxidante do açai (*Euterpe oleracea* MART.) frente ao estresse oxidativo induzido pelo cádmio no testículo de camundongos adultos. 2018. 120f. Tese – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

Mouro VGS, Siman VA, Silva J, Dias FCR, Damasceno EM, Cupertino MC, Melo FCSA, Matta SLP. Cadmium-induced testicular toxicity in mice: subacute and subchronic route-dependent effects. *Biol Trace Elem Res.* 193(2):466-482. 2019.

Mouro VGS, Melo FCSA, Martins ALP, Gomes MLM, Oliveira GM, Freitas MBD, Demuner AJ, Leite JPV, Matta SLP. *Euterpe oleracea* (Martius) oil reverses testicular alterations caused after cadmium administration. *Biol Trace Elem Res.* 1-16. 2020.

NIST-NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Standard reference materials - ácido linoleico-TMS mass spectrum. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C56259075&Mask=200#Mass-Spec>>.

Acesso em 05 de julho de 2023.

Novello AA, Conceição LL, Dias MMS, Cardoso LM, Castro CA, Ricci-Silva ME, Leite JPV, Peluzio MCG. Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* Mart. in mice. *J Food Nut Res.* 54(2):101–112. 2015.

O'Donnell L, Smith LB, Rebourcet D. Sertoli cells as key drivers of testis function. *Semin Cell Dev Biol.* 121:2-9. 2022.

Predes FS, Monteiro JC, Matta SLP, Garcia MC, Dolder H. Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and *Ginkgo biloba*. *Biol Trace Elem Res.* 140(3):330-41. 2011.

Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide: Biol Chem.* 6(2):178-185. 2002.

Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press. Clearwater. 1990.

Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 238(3): 240–249. 2009.

Squadrito F, Micali A, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, Puzzolo D, Pisani A, Lorenzini C, Valenti C, 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. *Front Pharmacol.* 7:537. 2016.

Tian H, Chen S, Leng Y, Li T, Li Z, Chen H, Zhang Q. Exposure to cadmium during gestation and lactation affects development and function of Leydig cells in male offspring. *Environm Toxicol.* 33(3):351-360. 2017.

Wang S, Ren X, Hu X, Zhou L, Zhang C, Zhang M. Cadmium-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial oxidative stress and the JNK signaling pathway in TM3 cells, a model of mouse Leydig cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 368:37-48. 2019.

Yen GC, Chen HY. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J Agric Food Chem.* 43(1):27-32. 1995.

Yi L, Shang XY, Lv L, Wang Y, Zhang J, Quan C, Shi Y, Liu Y, Zhang L. Cadmium-induced apoptosis of Leydig cells is mediated by excessive mitochondrial fission and inhibition of mitophagy. *Cell Death Dis.* 13(11):928. 2022.

Zhao L, Ru Y, Liu M, Tang J, Zheng J, Wu B, Gu Y, Shi. Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development in vitro. *Plos One.* 12(11):e0186727. 2017.

Zhu Q, Li X, Ge RS. Toxicological effects of cadmium on mammalian testis. *Font Genet.* 11:527. 2020.

Conclusões Gerais

- O Cd causa alterações histomorfométricas tubulares significativas, mesmo na ausência de estresse oxidativo, como diminuição da proporção de epitélio seminífero e da altura de epitélio, bem como aumento na proporção e no diâmetro luminal.
- A exposição subaguda ao Cd causa a diminuição de células germinativas no estágio 1.
- O Cd afeta negativamente as células de Leydig. A exposição subaguda ao metal provocou o aumento do diâmetro, do volume citoplasmático, nuclear e da célula de Leydig como um todo.
- O tratamento com as PD e PB reduz as alterações causadas pelo metal sobre o epitélio seminífero. Todas as doses de PB evitam o avanço de lesões graves nos túbulos seminíferos, enquanto apenas a dose de 300 mg/kg de PD é capaz de evitar esse quadro.
- O tratamento com o óleo de *E. edulis*, nas doses de 100 e 150 mg/kg, evita o agravamento de lesões graves nos túbulos seminíferos, contribuindo para a recuperação da integridade do epitélio seminífero após intoxicação com Cd.
- Os tratamentos com PD e o óleo foram mais eficazes na recuperação dos parâmetros da célula de Leydig do que a PB.