

LIDIANE DA SILVA NASCIMENTO

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA POLPA DE JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius) SOBRE A MORFOLOGIA TESTICULAR DE RATOS ADULTOS SADIOS E 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*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2017**

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

T

N244e
2017 Nascimento, Lidiane da Silva, 1987-
Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe
edulis Martius*) sobre a morfologia testicular de ratos adultos
sadios e expostos ao cádmio / Lidiane da Silva Nascimento. –
Viçosa, MG, 2017.
vii, 75f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Sergio Luis Pinto da Matta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Euterpe. 2. *Euterpe edulis*. 3. Antocianinas. 4. Cádmio.
5. Espermatogênese em animais. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 634.974

LIDIANE DA SILVA NASCIMENTO

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA POLPA DE JUÇARA (*Euterpe edulis* Martius) SOBRE A MORFOLOGIA TESTICULAR DE RATOS ADULTOS SADIOS E 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: 20 de fevereiro de 2017.



Hélio Chiapini-Garcia



João Bosco Gonçalves de Barros



Sirlene Souza Rodrigues Sartori



Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo



Sérgio Luis Pinto da Matta
Orientador

A Deus, meu amigo, pai e força!
A Minha Família, pelo incentivo, amizade e amor!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder forças e entendimento durante toda minha jornada.

Aos meus pais Cristiniana da Silva Nascimento e Francisco Libanio Nascimento Filho pelo amor, apoio total, conselhos, amizade, orações e confiança.

A meu irmão Robson da Silva Nascimento e sua esposa Suely Silva Souza, a minha irmã Clarice da Silva Nascimento e seu esposo Alessandro Alves Soares, e minha irmã Bruna da Silva Nascimento, pelo companheirismo, amizade, amor, incentivo e apoio em minhas decisões.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) por intermédio do Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização do doutorado em Biologia Celular e Estrutural.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta, pela disponibilidade em me orientar. Pelo apoio, dedicação e paciência durante estes quatro anos de curso. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e por acreditar em mim.

A Marli do Carmo Cupertino, pelo suporte, orientações e contribuições essenciais para a concretização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade, comentários e sugestões.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Estrutural pela convivência e por contribuírem de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

A Ademária Novaes pela amizade, pelas sugestões e correções de grande valia para a finalização deste trabalho.

A Jerusa, pela amizade, preocupação, carinho e pelo suporte nas análises de estresse oxidativo.

As queridas amigas que conheci em Viçosa: Daiane Figueiredo Rosa, Charlene da Penha Neves, Susana Puga, Leila Lins, Larissa Zanardo, Camilla Tardin, Simone Albino, Kyvia Lugate e Carol Neves, pelas ótimas conversas, pelo suporte e carinho.

A acolhedora cidade de Viçosa, onde me adaptei perfeitamente durante os seis anos

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Metais pesados	2
2.2 Cádmio: vias de toxicidade	2
2.2.1 Cádmio: indução de estresse oxidativo	4
2.3 Testículo: Morfologia e os efeitos tóxicos do cádmio	6
2.4 Extratos vegetais: <i>Euterpe edulis Martius</i>	7
3. OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo geral	9
3.2 Objetivos específicos	9
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
ARTIGO 1	13
O extrato hidroalcoólico da polpa juçara (<i>Euterpe edulis Martius</i>) não afeta a morfofisiologia testicular de ratos Wistar adultos saudáveis	13
RESUMO	14
INTRODUÇÃO	14
METODOLOGIA.....	16
<i>Obtenção e beneficiamento dos frutos de juçara, Euterpe edulis Martius</i>	16
<i>Quantificação das antocianinas totais no extrato de juçara</i>	16
<i>Identificação dos tipos de antocianinas no extrato de juçara</i>	17
<i>Animais</i>	17
<i>Tratamentos</i>	18
<i>Coleta e preparação histológica</i>	18
<i>Percentual líquido no testículo</i>	19
<i>Análises morfométricas tubulares</i>	19
<i>Análises morfométricas intertubulares</i>	21
<i>Enzimas antioxidantes e malondialdeído</i>	22
<i>Análise estatística</i>	23
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ARTIGO 2	38
O extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (<i>Euterpe edulis Martius</i>) não atenua os efeitos do cádmio no testículo de ratos Wistar adultos	38
RESUMO	39
INTRODUÇÃO	40
METODOLOGIA.....	42
<i>Obtenção e beneficiamento dos frutos de juçara, Euterpe edulis Martius</i>	42
<i>Quantificação das antocianinas totais no extrato de juçara</i>	42

<i>Identificação dos tipos de antocianinas no extrato de juçara</i>	43
<i>Animais</i>	44
<i>Tratamentos</i>	44
<i>Coleta e preparação histológica</i>	45
<i>Percentual líquido no testículo</i>	46
<i>Análises morfológicas tubulares</i>	46
<i>Análises morfológicas intertubulares</i>	47
<i>Análises histopatológicas</i>	48
<i>Enzimas antioxidantes e malondialdeído</i>	49
<i>Testosterona sérica</i>	50
<i>Análise estatística</i>	50
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
DADOS SUPLEMENTARES	73
CONCLUSÕES GERAIS	75

RESUMO

NASCIMENTO, Lidiane da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) sobre a morfologia testicular de ratos adultos saudáveis e expostos ao cádmio.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

O cádmio (Cd) é um metal pesado tóxico aos organismos vivos. Alterações das funções reprodutivas após a exposição ao Cd tem sido foco de constantes pesquisas. Deste modo, tem-se buscado estratégias seguras e eficazes contra toxicidade do Cd, dentre estas, a avaliação de extratos vegetais. A polpa do fruto de *Euterpe edulis*, conhecida popularmente por açaí da Mata Atlântica ou por juçara, apresenta propriedades antioxidante e anti-inflamatória, *in vitro* e *in vivo*, devido principalmente ao seu alto conteúdo de antocianinas. Contudo, pouco se sabe da ação deste extrato sobre parâmetros reprodutivos masculinos. Neste trabalho foram avaliados os efeitos de diferentes doses do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (EJ) sobre túbulo seminífero, intertúbulo, atividade de enzimas antioxidantes e produtos de peroxidação lipídica de ratos Wistar saudáveis e submetidos ao cádmio. O experimento inicial testou os efeitos de três doses do extrato de juçara, 300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg sobre os parâmetros testiculares dos ratos saudáveis. No segundo experimento, o extrato de juçara foi dado após 48 horas após a exposição à dose única de 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio. Os parâmetros biométricos, tubulares e intertubulares dos grupos que receberam somente o EJ não apresentaram variação significativa em relação ao grupo controle. Também não houve diferença significativa para a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), e para o marcador de peroxidação lipídica, malondialdeído. Os animais expostos ao Cd apresentaram danos morfológicos como necrose e calcificação tubular, aumento do percentual de fibras colágenas no intertúbulo, redução da testosterona sérica, aumento da peroxidação lipídica e aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. O extrato hidroalcoólico da polpa de juçara, por sua vez, não promoveu recuperação testicular nos grupos expostos ao Cd. Além disto, o uso do EJ após a exposição ao Cd agravou os danos testiculares como observado pela redução do peso testicular e seu parênquima e pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Lidiane da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Effect of the hydroalcoholic extract of juçara palm (*Euterpe edulis* Martius) pulp on the testicular morphology of healthy and cadmium-exposed Wistar rats.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal to living organisms. Changes in reproductive functions after Cd exposure have been the focus of constant research. In that sense, safe and effective strategies against Cd toxicity have been sought, for instance, by evaluating plant extracts. *Euterpe edulis*, which is commonly known as ‘Atlantic Rainforest açai’ or ‘juçara palm’, yields fruits whose pulp extract has antioxidant and anti-inflammatory properties both in vitro and in vivo, due mainly to its high content of anthocyanins. However, little is still known about the effect of this extract on male reproductive parameters. In this work, the effects of different doses of the hydroalcoholic extract of juçara palm pulp (JE) on the seminiferous tubule, intertubular space, activity of antioxidant enzymes, and lipid peroxidation products were evaluated in healthy and Cd-exposed Wistar rats. The initial experiment tested the effects of three JE doses, namely 300, 600, and 900 mg/kg, on the testicular parameters of healthy rats. In the second experiment, rats were fed on JE 48 hours after exposure to a single dose of 1.2 mg/kg body weight of cadmium chloride. The biometric, tubular, and intertubular parameters of groups that were only fed on JE showed no significant variation in relation to the control group. Neither was there any significant difference in the activity of enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST), or in contents of the lipid peroxidation marker, malondialdehyde. The Cd-exposed animals showed morphological damage such as tubular necrosis and calcification, increased percentage of collagen fibers in the intertubular space, decreased serum testosterone, and increased lipid peroxidation and SOD and CAT activities. Hydroalcoholic extract of juçara palm pulp, on the other hand, promoted no testicular recovery in Cd-exposed groups. In addition, the use of JE after Cd exposure aggravated testicular damage, as observed by the reduction in testicular weight and in its parenchyma as well as by the increased SOD and CAT activities.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A exposição da população a agentes tóxicos, como os metais pesados, tem aumentado o número de pesquisas sobre os impactos na saúde que estes metais podem causar na saúde a longo prazo. Metais pesados, como cádmio, chumbo e mercúrio não são biodegradáveis, podem bioacumular-se e promover disfunções em diversos órgãos, dentre eles, os testículos. Os metais pesados são encontrados em toda a crosta terrestre em baixas concentrações, mas seu uso pela indústria tem aumentado consideravelmente seus níveis (Stankovic et al., 2014).

Dentre os metais pesados, o cádmio (Cd) tem sido alvo de estudos por causa de seus efeitos tóxicos em plantas, animais e humanos. Até o momento, seu único papel na biologia foi encontrado em algumas diatomáceas marinhas onde, na escassez do zinco, o Cd é utilizado no local catalítico de uma determinada classe de anidrase carbônica (Lane et al., 2005). Embora este metal não participe de reações de oxido-redução, pesquisas sugerem sua ação indireta na indução do estresse oxidativo. Há uma série de componentes e processos celulares que podem ser afetados pelo Cd para aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio, dentre os quais podem ser citados: deslocamento de metais essenciais de seus sítios de ligação, redução dos níveis de glutathiona (GSH), diminuição da atividade das enzimas antioxidantes e inibição da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Smith et al., 2013).

Estudos demonstraram que o cádmio induz efeitos prejudiciais no sistema reprodutor, em particular, na interferência do processo espermatogênico (Siu et al., 2009; Pires et al., 2013). Deste modo, tem crescido nos últimos anos a busca por substâncias com efeito protetor ou atenuador dos efeitos tóxicos do Cd. O açaí *Euterpe edulis* Martius, conhecido popularmente como palmeira juçara, içara ou açaí da Mata Atlântica, tem sido objeto de estudos em função do valor nutritivo da polpa de seu fruto, sendo considerado um alimento nutracêutico face ao elevado teor de polifenóis, ácidos graxos ômega-6, ômega-9 e alto conteúdo de antocianinas (Novello et al., 2015). As antocianinas são pigmentos naturais que conferem coloração variando de vermelho ao azul. Embora as experimentações *in vivo* sejam incipientes, algumas evidências mostraram que as antocianinas tem grande potencial antioxidante e anti-inflamatório, devido à presença de núcleo doador de elétrons na sua estrutura química (He e Giusti, 2010).

Contudo, ainda não foi documentado o efeito deste extrato nos testículos de animais expostos ao cádmio. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara sobre os testículos de ratos saudáveis e expostos à dose única de 1,2 mg/kg de peso corporal de cloreto de cádmio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metais pesados

Os metais pesados são definidos como elementos químicos que têm densidade relativamente alta em comparação com a água (5 g/cm³). Alguns destes metais como o zinco (Zn), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn) e o selênio (Se) são considerados essenciais, uma vez que são utilizados em funções bioquímicas e fisiológicas. Por outro lado, outros metais como Mercúrio (Hg), arsênio (As), ouro (Au), chumbo (Pb), lítio (Li), níquel (Ni), prata (Ag) e cádmio (Cd) não têm funções biológicas bem estabelecidas e são considerados como metais não essenciais (Tchounwou et al., 2012).

Os metais pesados são encontrados em toda a crosta terrestre, mas as atividades antropogênicas como mineração e fundição, produção industrial, além do uso doméstico e agrícola de compostos contribuíram para o aumento destes no ambiente. Tal aumento representa risco potencial para a saúde humana e animal uma vez que as células não são capazes de eliminá-los eficientemente, o que pode contribuir para a bioacumulação de metais tóxicos no organismo (Wang e Shi, 2001; He et al., 2005; Stankovic et al., 2014).

A toxicidade induzida por metais pesados envolve muitos aspectos bioquímicos, porém a escassez de comprovação científica *in vivo* dificulta a compreensão das formas de atuação destes agentes tóxicos. Contudo, metais como o Cd é sugerido imitar os metais essenciais unindo-se a sítios fisiológicos que normalmente seriam ocupados por estes (Martelli et al., 2006; Jaishankar et al., 2014).

2.2 Cádmio: vias de toxicidade

O cádmio pertence ao grupo 12 da tabela periódica, número atômico 48 e peso atômico de 112,4. O Cd é um subproduto da mineração do zinco e, em menor grau, do chumbo e dos minerais de cobre. Além disso, é liberado na atmosfera na forma de óxido de cádmio, cloreto de cádmio ou sulfeto de cádmio resultante de

atividades industriais, como a fabricação de baterias e pigmentos, fundição e refino de metais e incineração de resíduos (Martelli et al., 2006). O cádmio é conhecido pela sua toxicidade em animais e humanos uma vez que não é utilizado por estas espécies. Até o momento, seu único papel na biologia foi encontrado em algumas diatomáceas marinhas, onde na escassez do zinco, o Cd é utilizado no local catalítico de uma determinada classe de anidrase carbônica (Lane et al., 2005).

A entrada de cádmio no corpo pode ocorrer através da inalação de material particulado proveniente de fumaças industriais ou do cigarro, ou via ingestão de alimentos e água contaminados. A ingestão alimentar é apontada como principal fonte de exposição ao Cd (WHO, 2010). A média de ingestão de cádmio através dos alimentos mais propícios à contaminação do metal (como cereais, legumes e batata) varia entre 8 a 25 µg por dia (Olsson et al., 2002; Llobet et al., 2003). O limite de ingestão mensal tolerável de Cd estabelecido pela Organização Mundial da Saúde é de 25 µg/kg de peso corporal (WHO, 2010). Para fumantes estima-se que 50% do cádmio seja absorvido pelo pulmão (cada cigarro possui aproximadamente 1 a 2 µg de cádmio) (Maret e Moulis, 2013). Contudo, fatores como o estado nutricional e a genética do indivíduo influenciam na susceptibilidade ao Cd (Martelli et al., 2006).

Uma vez presente na corrente sanguínea, é sugerido que o Cd seja absorvido pelas hemácias por transporte passivo e complexado com metaloproteínas (Garty et al., 1986). No plasma, o Cd pode se ligar a albumina, glutathione e metaloproteína (Yongqia et al., 1992). Chegando ao fígado, a albumina é degradada e o cádmio livre induz a síntese de metalotioneínas (MT), proteína de baixo peso molecular, rica em grupos sulfidrílicos, que se liga facilmente ao cádmio. Esse complexo Cd-MT passa a ser lentamente liberado do fígado para o plasma sanguíneo e ao chegar nos rins é filtrado através da membrana glomerular e quase todo complexo Cd-MT é reabsorvido no túbulo proximal. Dentro das células do túbulo proximal, o complexo Cd-MT sofre uma quebra e o cádmio livre é o responsável por danos renais. A excreção de cádmio acontece principalmente pela urina, porém é em pequena quantidade e lenta e, além disto, o aparecimento de danos nos rins pode alterar a capacidade de eliminação renal de cádmio (Arroyo et al., 2012). A meia vida biológica estimada para o Cd varia de 20-40 anos em humanos, particularmente devido ao maior acúmulo de cádmio observado no fígado e no rim, como consequência da incapacidade das células exportarem o Cd não ligado a metaloproteínas (Johri et al., 2010; Thévenod e Lee, 2013).

Dentro das células, a interação do Cd com macromoléculas e rotas bioquímicas é bastante complexa. Com base nos conhecimentos atuais, é possível citar que a principal via de toxicidade do Cd é a competição com metais essenciais devido a sua semelhança de estrutura química com metais essenciais principalmente o zinco, cobre, cálcio, manganês e ferro. Vários componentes celulares foram sugeridos estar envolvidos na captação, quelação, sequestro e exportação do Cd. Dentre estes, os transportadores de íons metálicos divalentes como ferro, zinco, cálcio e magnésio são possíveis responsáveis pela translocação de cádmio através da membrana celular (Smith et al., 2013). Uma via hipotética alternativa para a entrada de Cd é a endocitose mediada por receptores de complexos metálicos como metaloproteína (MT), glutatona (GSH) e cisteína (Cys).

2.2.1 Cádmio: indução de estresse oxidativo

A geração de espécies reativas de oxigênio, fisiológica ou não, é normalmente equilibrada pela ação dos antioxidantes endógenos e exógenos. O desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes resulta no estresse oxidativo, que causa danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA (Barbosa et al., 2010). As espécies reativas são átomos, moléculas, ou íons derivados do oxigênio, que em sua maioria possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, e com isto alta reatividade. Há três classes de compostos: espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de enxofre e espécies reativas de nitrogênio. As espécies reativas podem ainda ser didaticamente divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares. Os radicais livres podem agir como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Os compostos não radicalares, como H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e HOCl (ácido hipocloroso), não possuem elétrons livres, sendo portanto menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas na sua redondeza (Halliwell, 2006).

Há basicamente duas linhas de defesa para eliminação de espécies reativas. A primeira linha de defesa incluem vitamina C, vitamina E, ubiquinol-10, bem como glutatona (GSH) e o sistema de tioredoxina (TRX) que atuam na prevenção contra a produção de radicais livres. Enquanto isso, as proteínas quelantes de metais desempenham papéis chave no controle do nível de íons metálicos livres e assim aumentam ou impedem a geração de espécies reativas de oxigênio por metais

essenciais livres, via reações de Fenton. Estas proteínas incluem ferritina, transferrina, metalotioneína, dentre outras. Por conseguinte, é proporcionada a segunda linha de defesa através da remoção enzimática das espécies reativas. A superóxido dismutase (SOD) é responsável pela transformação de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, que é posteriormente transformado em oxigênio e água pela catalase (CAT) ou em água pela glutathione peroxidase (GPx). Além disto, as glutathione-S-transferases (GSTs) são um grupo de enzimas importantes desta segunda fase e desempenham papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais agentes, incluindo compostos farmacologicamente ativos e xenobióticos. A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutathione (GSH) com grupos eletrofílicos dos compostos xenobióticos, catalisada pela GST, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (Birben et al., 2012).

O Cd é um metal divalente que não participa de reações de oxido-redução, mas várias linhas de evidência mostram que este metal pode indiretamente induzir estresse oxidativo principalmente através do deslocamento de metais essenciais de seus sítios de ligação em proteínas e enzimas (Lai e Loo, 2011; Thévenod e Lee, 2013), redução dos níveis de GSH (Nigam et al., 1999), diminuição das atividades das enzimas antioxidantes (Ikediobi et al., 2004) e inibição da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Wang et al., 2004).

Devido à semelhança estrutural com metais divalentes, como o ferro e cobre, é sugerido que o Cd substitui sítios ativos destes metais em enzimas, como superóxido dismutase (SOD) ou catalase (CAT), causando aumento da disponibilidade destes íons nas células os quais, uma vez livres, podem catalisar a decomposição de H_2O_2 via reação de Fenton, resultando em estresse oxidativo (Lai e Loo, 2011; Thévenod e Lee, 2013). A alta afinidade do Cd aos grupos sulfidrilas (-SH) presentes em sequestradores de radicais livres, como a glutathione (GSH), pode impedir a ação desta na eliminação dos radicais livres (Nigam et al., 1999).

A atividade de enzimas antioxidantes é também alterada mediante exposição ao cádmio, provavelmente pela ligação aos grupos sulfidrilas ou pela substituição de sítios ativos de metais essenciais que fazem parte das enzimas. Contudo, as diferentes condições experimentais têm gerado variações nos níveis de atividades destas enzimas. A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) diminuíram ou

aumentaram em hepatócitos e testículo de animais conforme a dose e duração da exposição (Ikediobi et al., 2004; Pires et al., 2013; Arafa et al., 2014).

Outro provável meio do Cd induzir o estresse oxidativo é através do comprometimento da transferência de elétrons no complexo III nas mitocôndrias. Estudos *in vitro* mostraram que o Cd pode se ligar fortemente ao complexo III resultando na acumulação de semi-biquinonas instáveis, que então transferem um elétron para o oxigênio molecular, resultando na formação de superóxido (Wang et al., 2004).

2.3 Testículo: Morfologia e os efeitos tóxicos do cádmio

Os testículos podem ser divididos anatomicamente e funcionalmente em duas partes: túbulos seminíferos e intertúbulo, responsáveis pela espermatogênese e pela esteroidogênese, respectivamente. Os túbulos seminíferos são constituídos pela túnica própria, epitélio seminífero e lume. Na túnica própria são observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e as fibras colágenas. O túbulo seminífero é composto pelas células germinativas e células de Sertoli, esta última responsável pela proteção e nutrição das células da linhagem germinativa. Além disto, a célula de Sertoli divide o epitélio seminífero em dois ambientes funcionais distintos: o basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (preleptótenos e leptótenos), e o adluminal, onde se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides (Russell et al., 1990).

O intertúbulo de ratos é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, células de Leydig e células do tecido conjuntivo, como macrófagos, fibroblastos e suas fibras colágenas (Creasy, 2001). A célula de Leydig é o tipo celular mais frequente, responsável pela produção de andrógenos, principalmente testosterona, a qual pode ser posteriormente convertida em uma variedade de outros esteroides (Teerds e Huhtaniemi, 2015). A densidade e a orientação das células de Leydig variam de acordo com a espécie. Em ratos, o intertúbulo apresenta poucas fibras colágenas e grandes espaços linfáticos. As células de Leydig ficam dentro de espaços linfáticos e agrupadas em torno de vasos sanguíneos. Assim, o espaço linfático é importante para manter o equilíbrio do fluido intertubular além de fornecer nutrientes e andrógenos para os túbulos seminíferos (Fawcett et al., 1973; Foley, 2001). Outro tipo celular bastante comum no intertúbulo de ratos são os macrófagos, os quais constituem cerca

de 12% da população das células intertubulares e mantêm íntima relação celular com as células de Leydig (Dirami, 1991). É discutido que o contato direto entre estas duas células permite que o macrófago regule a produção de testosterona pela célula de Leydig e, em contrapartida, a célula de Leydig regula o número, a diferenciação e função dos macrófagos testiculares (Hutson, 1998).

Estudos utilizando o Cd têm descrito diversas alterações morfológicas e bioquímicas nos testículos de mamíferos. De modo geral, após a exposição ao Cd foi verificado menor peso dos testículos e diminuição da função endócrina, redução da espermatogênese, redução da motilidade dos espermatozoides e diminuição da fertilidade (Blanco et al., 2007; Predes et al., 2010; Pires et al., 2013). Estudo com intoxicação subcrônica de ratos por via subcutânea, na dose 0,6 kg/mg/dia de Cd durante 6 semanas, mostrou que a concentração de Cd nos testículos aumentou mais de 100 vezes que no soro depois de 2 semanas, sugerindo ativa acumulação Cd no testículo (Aoyagi et al., 2002). Além disto, há indícios de que a célula endotelial é alvo primário do Cd. Considerando que a principal via de toxicidade do Cd é a competição com metais essenciais devido a sua semelhança de estrutura química, sugere-se que este metal possa substituir o cálcio nos locais de ligação às caderinas, moléculas envolvidas na adesão celular, alterando a permeabilidade endotelial, o que contribui para o aumento da entrada do Cd no tecido (Prozialeck et al., 2008). O Cd pode também ocupar o local do zinco ou manganês no transportador ZIP8, presente nas células endoteliais de animais sensíveis ao Cd, o que também causa lesão destas células devido à acumulação do metal (Dalton et al., 2005). Lesão das células endoteliais resulta em extravasamento de glóbulos vermelhos e obstrução plaquetária, causando em última instância, isquemia seguida de necrose (Kumar et al., 2010).

2.4 Extratos vegetais: *Euterpe edulis* Martius

Nas últimas décadas tem aumentado o consumo de alimentos denominados funcionais por apresentarem alto valor nutritivo e propiciarem efeitos benéficos à saúde. As frutas, vegetais e grãos têm despertado interesse uma vez que, além de conter nutrientes essenciais e micronutrientes como minerais, fibras e vitaminas, têm também diversos compostos secundários de natureza fenólica denominados polifenóis (Harborne e Williams, 2000).

Embora estudos clínicos em animais e humanos sobre as ações dos polifenóis para a saúde ainda estejam em curso, inúmeros trabalhos realizados com extratos vegetais contendo compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (antoxantinas e antocianinas) têm mostrado uma série de efeitos benéficos, como proteção vascular (Stoclet et al., 2004) e atenuação do quadro inflamatório e oxidativo presentes na obesidade (Wang et al., 2014) e em doenças neurodegenerativas (Bhullar e Rupasinghe, 2013). Nestas pesquisas há indicações de que parte das ações benéficas dos polifenóis deve estar relacionada a sua capacidade em captar radicais livres devido à presença de núcleo doador de elétrons na sua estrutura química (Pandey e Rizvi, 2009), exercendo atividade antioxidante. Segundo Lee et al. (2013), a ação dos polifenóis na proteção celular ocorre de forma direta e indireta. Direta por agir como antioxidante e reduzir as espécies reativas de oxigênio (EROs), e indireta, por inibir a ativação do fator de transcrição nuclear, NF- κ B, o que reduziria os níveis de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão, atenuando os danos oxidativos. Além disto, alguns polifenóis podem exercer ação antioxidante através da quelação de íons de metais de transição, impedindo, portanto, de participarem da reação de Fenton, geradora de radicais livres.

O extrato da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Mart) tem sido objeto de estudo devido sua elevada concentração de polifenóis, em particular as antocianinas. A espécie *E. edulis* Mart. é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, cujos frutos são pequenos, arredondados e de coloração roxo-escuro em função da presença das antocianinas. *Euterpe edulis* é conhecida popularmente por palmeira juçara, jicara ou açai da Mata Atlântica. Esta palmeira é encontrada principalmente em áreas remanescentes de Mata Atlântica do Brasil e em comparação ao açai da Amazônia (*Euterpe oleracea* Martius), é pouco explorada para consumo (Fisch et al., 2000). Brito et al. (2007), analisando o conteúdo de antocianinas do extrato de juçara (*Euterpe edulis*) e de outras frutas, tais como acerola (*Malpighia emarginata*), jambolão (*Syzygium cumini*) e guajiri (*Chrysobalanus icaco*), verificaram maior quantidade de antocianinas no extrato de juçara. Este último continha 2956 mg de antocianinas/100g, seguido pelo guajiru (958 mg/100g), jambolão (771 mg/100g), clone de acerola II47/1(528mg /100g) e acerola roxinha (261 mg /100g).

As antocianinas são pigmentos naturais que conferem coloração que variam de vermelho ao azul. Possuem estrutura geral com um esqueleto difenilpropano (C6C3C6), isto é, dois anéis benzênicos (denominados anel A e anel B) unidos por

um heterociclo que contém um átomo de oxigênio (anel C). São classificadas como flavonoides por conter um grupo hidroxila na posição C3 do anel C. Quando encontradas na forma livre são chamadas agliconas ou antocianidinas, porém são mais encontradas ligadas a moléculas de açúcares como glicose, ramnose, galactose, xilose e arabinose. As principais agliconas presentes nas frutas e vegetais são as cianidinas, pelargonidinas, delphinidinas, petunidinas, peonidinas e malvidinas. Elas se distinguem pelos diferentes grupos substituintes que as formam e pela coloração que elas proporcionam aos alimentos (He e Giusti, 2010). Brito et al. (2007) e Novello et al. (2015) identificaram a presença de vários tipos de antocianinas no extrato de juçara: cianidina 3-O-glucosídeo, cianidina 3-O-rutinosídeo, cianidina 3-O-sambubioside, peonidina 3-O-glucosídeo, pelargonidina 3-O-rutinosídeo e delphinidina 3-O-glucosídeo. As duas primeiras foram majoritárias, sendo que a cianidina 3-O-rutinosídeo alcançou 63,12% e a cianidina 3-O-glucosídeo 36,88% de representatividade das antocianinas totais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos de doses crescentes do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis*) no compartimento tubular e intertubular do testículo de ratos adultos saudáveis e expostos ao cádmio.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos de diferentes doses (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg) do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara sobre a morfometria testicular de ratos adultos saudáveis (Artigo 1).
- Avaliar os efeitos de diferentes doses (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg) do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara sobre a atividade de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase, glutathione-S-transferase e produto de peroxidação lipídica (malondialdeído) de ratos adultos saudáveis (Artigo 1).
- Avaliar os efeitos de diferentes doses (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg) do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara sobre a morfometria testicular de ratos adultos submetidos à dose única inicial de 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio (Artigo 2).

- Avaliar os efeitos de diferentes doses (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg) do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara sobre a atividade de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase, glutationa-s-transferase e produto de peroxidação lipídica (malondialdeído) de ratos adultos submetidos à dose única inicial de 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio (Artigo 2).

4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoyagi, T.; Ishikawa, H.; Miyaji, K.; Hayakawa, K.; Hata, M. (2002). Cadmium-induced testicular damage in a rat model of subchronic intoxication. *Reprod. Med. Biol.* 1, 1434–1443.
- Arafa, M.H.; Mohammad, N.S.; Atteia, H.H. (2014). Fenugreek seed powder mitigates cadmium-induced testicular damage and hepatotoxicity in male rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 66, 293–300.
- Arroyo, V.; Martínez-Flores, K.; Bucio-Ortiz, L.; Gómez-Quiroz, L.E.; Gutiérrez-Ruiz, M.C. (2012). Liver and cadmium toxicity. *Drug Metab. Toxicol.* S5, 1–7.
- Barbosa, K.B.F.; Costa, N.M.B.; Alfnas, R.D.G.; De Paula, S.O.; Minim, V.P.R.; Bressan, J. (2010). Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr.* 23, 629–643.
- Bhullar, K.S.; Rupasinghe, H.P.V. (2013). Polyphenols: Multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 1–18.
- Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19.
- Blanco, A.; Moyano, R.; Vivo, J.; Flores-Acuña, R.; Molina, A.; Blanco, C.; Agüera, E.; Monterde, J.G. (2007). Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 96–101.
- Brito, E.S.; Araújo, MCP.; Alves, R.E.; Carkeet, C.; Clevidence, B.A.; Novotny, J.A. (2007). Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jabolão, jussara, and guajiru. *J. Agric. Food. Chem.* 55, 9389–9394.
- Creasy, D.M. (2001). Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.* 29, 64–76.
- Dalton, T.P.; He, L.; Wang, B.; Miller, M.L.; Jin, L.; Stringer, K.F.; Chang, X.; Baxter, C.S.; Nebert, D.W. (2005). Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3401–3406.
- Dirami, G.; Poulter L.W.; Cooke B.A. (1991). Separation and characterization of Leydig cells and macrophages from rat testes. *J. Endocrinol.* 130, 357-365.
- Fawcett, D.W.; Neaves, W.B.; Flores, M.N. (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 9, 500–32.
- Fisch, S.T. V.; Nogueira Jr., L.R.; Mantovani, W. (2000). Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na Mata Atlântica (Reserva Ecológica do Trabiju , Pindamonhangaba – SP). *Rev. biociências* 6, 31–37.
- Foley, G.L. (2001). Overview of Male Reproductive Pathology. *Toxicol. Pathol.* 29, 49–63.
- Garty, M.; Bracken, W.M.; Klaassen, C.D. (1986). Cadmium uptake by rat red blood cells. *Toxicology* 42, 111–119.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.

- Harborne, J.B.; Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- He, J.; Giusti, M.M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 163–187.
- He, Z.L.; Yang, X.E.; Stoffella, P.J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 125–140.
- Hutson, C. (1998). Interactions Between Testicular Macrophages and Leydig Cells. *J. Androl.* 19, 394–398.
- Ikediodi, C.O.; Badi,sa, V.L.; Ayuk-Takem, L.T.; Latinwo, L.M.; West, J. (2004). Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *Int. J. Mol. Med.* 14, 87–92.
- Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B.B.; Beeregowda, K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60–72.
- Johri, N.; Jacquillet, G.; Unwin, R. (2010). Heavy metal poisoning: The effects of cadmium on the kidney. *BioMetals* 23, 783–792.
- Kumar, V.; Abbas, K.A.; Fausto, N.; Aster, J.C. (2010). *Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Lai, C.; Loo, G. (2011). Cellular iron depletion weakens induction of heme oxygenase-1 by cadmium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 88–97.
- Lane, T.W.; Saito, M.A.; George, G.N.; Pickering, I.J.; Prince, R.C.; Morel, F.M.M.M. (2005). Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* 435, 42.
- Lee, W.L.; Huang, J.Y.; Shyur, L.F. (2013). Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 1–22.
- Llobet, J.M.; Falcó, G.; Casas, C.; Teixidó, A.; Domingo, J.L. (2003). Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. *J. Agric. Food Chem.* 51, 838–842.
- Maret, W.; Moulis, J.M. (2013). The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity. In: Sigel A, Sigel H, Sigel, RKO (eds). *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*. Volume 11, Dekker/Taylor & Francis, pp 1–26.
- Martelli, A.; Rousselet, E.; Dycke, C.; Bouron, A.; Moulis, J.M. (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 88, 1807–1814.
- Nigam, D.; Shukla, G.S.; Agarwal, a K. (1999). Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicol. Lett.* 106, 151–157.
- Novello, A.A.; Conceição, L.L.; Dias, M.M.S.; Cardoso, L.M.; Castro, C.A.; Ricci-Silva, M.E.; Viana Leite, J.P.; Gouveia Peluzio, M.D.C. (2015). Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* Mart. in mice. *J. Food Nutr. Res.* 54, 101–112.
- Olsson, I.M.; Bensryd, I.; Lundh, T.; Ottosson, H.; Skerfving, S.; Oskarsson, A. (2002). Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environ. Health Perspect.* 110, 1185–1190.
- Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270–8.
- Pires, V.C.; Gollücke, A.P.B.; Ribeiro, D.A.; Lungato, L.; D’Almeida, V.; Aguiar, O. (2013). Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: a chronic assay. *Br. J. Nutr.* 110, 2020–2029.
- Predes, F.S.; Diamante, M.A.S.; Dolder, H. (2010). Testis response to low doses of

- cadmium in Wistar rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 91, 125–131.
- Prozialeck, W.C.; Edwards, J.R.; Nebert, D.W.; Woods, J.M.; Barchowsky, A.; Atchison, W.D. (2008). The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol. Sci.* 102, 207–218.
- Russell, L.D.; Ren, H.P.; Sinha Hikim, I.; Schulze, W.; Sinha Hikim, A.P. (1990). A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am. J. Anat.* 188, 21–30.
- Siu, E.R.; Mruk, D.D.; Porto, C.S.; Cheng, C.Y. (2009). Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 240–249.
- Smith, N.; Wei, W.; Lee, J. (2013). Cadmium Transport in Eukaryotes. *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.* 1–12.
- Stankovic, S.; Kalaba, P.; Stankovic, A.R. (2014). Biota as toxic metal indicators. *Environ. Chem. Lett.* 12, 63–84.
- Stoclet, J.C.; Chataigneau, T.; Ndiaye, M.; Oak, M.H.; El Bedoui, J.; Chataigneau, M.; Schini-Kerth, V.B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 299–313.
- Tchounwou, P.B.; Yedjou, C.G.; Patlolla, A.K.; Sutton, D.J. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Exp. Suppl.* 101, 133–164.
- Teerds, K.J.; Huhtaniemi, I.T. (2015). Morphological and functional maturation of Leydig cells: From rodent models to primates. *Hum. Reprod. Update* 21, 310–328.
- Thévenod, F.; Lee, W.K. (2013). Toxicology of Cd and Its Damage to Mammalian Organs. In: Sigel A, Sigel H, Sigel, RKO (eds). *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*. Volume 11, Dekker/Taylor & Francis, pp 415-481.
- Wang, S.; Moustaid-Moussa, N.; Chen, L.; Mo, H.; Shastri, A.; Su, R.; Bapat, P.; Kwun, I.; Shen, C.L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J. Nutr. Biochem.* 25, 1–18.
- Wang, S.; Shi, X. (2001). Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 222, 3–9.
- Wang, Y.; Fang, J.; Leonard, S.S.; Rao, K.M.K. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1434–1443.
- WHO -World Health Organization (2010) Exposure to cadmium: A major public health concern. Disponível em < <http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf?ua=1>
- Yongqia, Z.; Xuying, H.; Chao, D.; Hong, L.; Sheyi, W.; Panwen, S. (1992). Structural studies on metal-serum albumin. IV. The interaction of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) with HSA and BSA. *Biophys. Chem.* 42, 201–211.

ARTIGO 1

O extrato hidroalcoólico da polpa juçara (*Euterpe edulis* Martius) não afeta a morfofisiologia testicular de ratos Wistar adultos saudáveis

Artigo com base nas normas do periódico Plant Foods for Human Nutrition

O extrato hidroalcoólico da polpa juçara (*Euterpe edulis* Martius) não afeta a morfofisiologia testicular de ratos Wistar adultos saudáveis

RESUMO

O extrato da polpa dos frutos da palmeira *Euterpe edulis*, conhecida popularmente por juçara, apresenta alta concentração de antocianinas quando comparada a outras frutas tropicais. Estudos *in vitro* têm mostrado que o extrato de juçara apresenta propriedades antioxidante e anti-inflamatória, contudo pouco se sabe da ação deste extrato sobre parâmetros reprodutivos masculinos. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara sobre os testículos de ratos Wistar adultos através de análises morfométricas e atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona-S-transferase e marcador de peroxidação lipídica (malondialdeído). Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo que o grupo controle recebeu água destilada e os grupos tratados receberam, respectivamente, 300, 600 e 900 mg/kg de peso corporal de extrato hidroalcoólico da polpa de juçara, via gavagem, durante 56 dias consecutivos. Os parâmetros biométricos, tubulares e intertubulares dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ não apresentaram variação significativa em relação ao grupo controle. Também não houve variação nas atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona-S-transferase e malondialdeído. Não foram observadas alterações patológicas ou comportamentais em nenhum dos animais que receberam o extrato de juçara. Os dados sugerem que o extrato de juçara nas doses avaliadas não apresentou indícios de toxicidade que comprometesse o processo espermatogênico.

Palavras-chave: antocianinas, espermatogênese, enzimas antioxidantes.

INTRODUÇÃO

Há relatos que o consumo diário de alimentos contendo compostos antioxidantes promove ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem no organismo [1, 2]. Frutas, vegetais em geral e condimentos contêm nutrientes essenciais e micronutrientes como minerais, fibras, vitaminas, além de diversos compostos secundários de natureza fenólica, especialmente os flavonóides [3; 4]. Deste modo, o consumo de frutas tropicais aumentou nos últimos anos devido, em parte, ao seu valor nutricional e seus benefícios à saúde [5]. No Brasil, dentre as

frutas comercializadas, destaca-se o açaí da Amazônia (*Euterpe oleracea* Martius) que vem ganhando espaço no mercado brasileiro e internacional [6]. Contudo, na região da Mata Atlântica pode-se obter fruto semelhante ao açaí da Amazônia a partir da espécie *Euterpe edulis* Martius, popularmente conhecida por juçara, sendo seu fruto também chamado de açaí da Mata Atlântica [7].

A polpa de juçara é nutricionalmente rica, apresenta alto teor de ácidos graxos insaturados e minerais, além de conter compostos bioativos, tais como antocianinas, quercetina, rutina e ácidos fenólicos [8,9]. As antocianinas são pigmentos pertencentes à categoria de metabólitos secundários, estando presentes em frutos com espectro de cor que varia do vermelho ao azul. A estrutura fenólica das antocianinas confere atividade antioxidante através de doação ou transferência de elétrons dos átomos de hidrogênio e atividade anti-inflamatória provavelmente através da sua capacidade de inibir fatores de transcrição e/ou proteínas envolvidas na indução da resposta inflamatória [1]. Novello et al. [8], ao suplementar dieta de camundongos knockout para apolipoproteína E com 2% e 6% de extrato de juçara, observaram melhora do perfil lipídico, ação hipoglicemiante e favorecimento da atividade antioxidante hepática, não sendo encontrados indícios de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

No entanto, não há registros de experimentação científica avaliando a ação dos frutos de *E. edulis* sobre parâmetros reprodutivos masculinos. O testículo é responsável pela produção de espermatozoides e andrógenos. O processo de espermatogênese, sob regência da célula de Sertoli, ocorre no compartimento tubular, enquanto que a produção de andrógenos ocorre no compartimento intertubular, onde se encontram as células de Leydig, produtoras de testosterona. No intertúbulo ainda estão presentes células do conjuntivo (macrófagos e fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos [10]. Apesar das baixas tensões de oxigênio que caracterizam o microambiente testicular, este tecido permanece vulnerável ao estresse oxidativo devido à abundância de ácidos graxos altamente insaturados e a presença de potencial de geradores de espécies reativas de oxigênio [11]. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*E. edulis*) sobre os testículos de ratos Wistar adultos através de análises morfológicas e morfométricas de túbulo e intertúbulo, e das análises da atividade de enzimas antioxidantes e marcador de peroxidação lipídica.

METODOLOGIA

Obtenção e beneficiamento dos frutos de juçara, Euterpe edulis Martius

Os frutos foram coletados no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), localizado na região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais (20°42'S; 42°29'W) a 1375 m de altitude. A coleta foi realizada no período de floração e frutificação de *E. edulis*, entre os meses de agosto a novembro [12].

Os frutos de juçara foram despulpados no prazo máximo de 24 horas após a colheita devido a sua alta perecibilidade, passando pelas fases de beneficiamento. Assim, os frutos foram imersos em água para a retirada de impurezas e para facilitar o despolpamento foram colocados na água a 50°C, por um período de 30 minutos. Para esterilização dos frutos foi utilizado 35 ppm de cloro ativo, por cerca de 30 minutos, sendo posteriormente retirado por meio da lavagem com água potável. Estas etapas são importantes para evitar a contaminação microbiológica dos frutos [13].

Para extração da polpa foram pesados 100g do fruto e adicionados 50 mL de álcool 70% (proporção fruto: solvente 2:1) acrescido de 0,3g de ácido cítrico, como agente acidulante, a fim de manter o pH < 4,0 que é importante para a estabilização das moléculas de antocianinas [8]. Em seguida a preparação foi transferida para despulpadeira industrial e homogeneizada durante 4 minutos. A extração foi realizada em triplicata. Finalmente, o extrato hidroalcoólico da polpa do fruto foi liofilizado no Departamento de Zootecnia da UFV e armazenado em frascos âmbar, em freezer a - 20°C. Todo o processo foi realizado com as luzes apagadas devido à fotossensibilidade das antocianinas.

Quantificação das antocianinas totais no extrato de juçara

O conteúdo de antocianinas foi determinado pelo método de absorvância de pH diferencial [14]. A análise foi realizada em triplicata para cada extrato. Em dois béqueres pesaram-se 0,05g de polpa de juçara liofilizada solubilizada em 50 mL de tampão pH=1,0 (cloreto de potássio, 0,025M) e 50 mL de tampão pH= 4,5 (acetato de sódio, 0,4M), obtendo fator de diluição de 1000x para as doses de 300 e 600 mg/kg e 2000x para a dose de 900mg/kg. As amostras foram deixadas no ultrassom para homogeneização durante 30 minutos (Hielscher, Ringwood, New Jersey, USA). Após este período, as amostras foram filtradas e transferidas para balão volumétrico de 50 mL, completando-se com o tampão correspondente. Cada balão volumétrico

ficou em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz, sendo posteriormente realizadas leituras de absorvância (*Abs*) nos comprimentos de onda 510 nm e 700 nm. A diferença dos valores das absorvâncias em pH= 1,0 e pH= 4,5 é diretamente proporcional à concentração de antocianinas. O cálculo é baseado na cianidina-3-glicosídeo, com massa molecular (MM) de 449,2 g/mol, diluição utilizada (D) e absortividade molar (ϵ) de 26.900 L.mol/cm. Os resultados são expressos como miligramas equivalentes de cianidina 3-glicosídeo por litro de polpa de juçara.

Teor de Antocianinas (mg/L):

$$[(Abs\ 510 - Abs\ 700)_{pH1} - (Abs\ 510 - Abs\ 700)_{pH4,5}] \times MM \times D \times 1000/\epsilon$$

Identificação dos tipos de antocianinas no extrato de juçara

A identificação das antocianinas do extrato de juçara liofilizado foi realizada para uma amostra geral, representativa a 100g de extrato liofilizado. Através da cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), modelo SCL 10AT VP (Shimadzu, Kyoto Japan), utilizou-se as condições propostas por Schauss et al. [15], com adaptações descritas a seguir. As separações foram realizadas usando Phenomenex Gemini RP-18 (5 μ m; 250 x 4,6 mm) com pré-coluna Phenomenex ODS (C18, 5 μ m; 4 x 3 mm). As fases móveis consistiram de 89% de água ultrapura acidificada com ácido fórmico até pH=2,0 e 11% de acetonitrila (fase A) e 100% de acetonitrila (fase B), com fluxo de 1 mL/minuto. A injeção do volume foi de 50 μ L e o tempo de corrida correspondeu a 45 minutos, sendo a leitura feita a 520nm.

O extrato de juçara liofilizado (0,01g) foi ressuspendido em 5 mL de HCl 1%. Como padrão externo utilizaram-se as antocianinas: cianidina -3-O-glucosídeo (Cloreto de curomanina, Sigma-Aldrich) e cianidina -3-O-rutinosídeo (Keracyanin chloride, Sigma-Aldrich). Suas absortividades molares foram, respectivamente, 26900 mol/cm e 28840 mol/cm. Finalizando, injetou-se um mix dos padrões para observar o tempo de retenção de cada antocianina.

Animais

Todos os procedimentos envolvidos no protocolo experimental foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 030/2010. O

experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Ratos Wistar machos adultos, com 80 dias de idade e 349 ± 11 gramas de peso corporal (PC), foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminação com ciclos claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração. Todos os animais passaram por um período de aclimação correspondente a 30 dias antes do início do experimento. O período experimental durou 56 dias consecutivos, correspondente à duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos [10].

Tratamentos

Os animais foram pesados e distribuídos em 4 grupos experimentais (n=5). Três grupos receberam diferentes doses de extrato hidroalcoólico de juçara (EJ): o grupo EJ₃₀₀ recebeu 1,5 mL/dia de 300 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara, o grupo EJ₆₀₀ recebeu 1,5 mL/dia de 600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara e o grupo EJ₉₀₀ recebeu 1,5 mL/dia de 900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. O grupo controle recebeu diariamente 1,5 mL de água destilada. Em todos os grupos o tratamento foi realizado por gavagem e as soluções foram calculadas com base no peso corporal de cada animal (PC).

A dose de 300 mg/kg de EJ foi determinada a partir de dosagens utilizadas em estudos prévios com extratos vegetais (100-500 mg/kg) [16, 17]. As outras doses corresponderam, respectivamente, ao dobro e três vezes a dose inicial utilizada.

Coleta e preparação histológica

Ao término do período experimental os animais foram pesados e eutanasiados por inalação de CO₂. Os testículos foram rapidamente removidos e pesados em balança de precisão (BEL Mark 160 classe 2) (0,001g). Para determinar o peso do parênquima do testículo, a albugínea de um dos testículos foi retirada e pesada, descontando seu peso daquele obtido para um testículo inteiro. O testículo direito de cada animal foi fixado em solução de Karnovsky [18] para análises histológicas e histoquímicas e para o cálculo do percentual líquido no testículo, enquanto o testículo esquerdo foi primeiramente congelado em nitrogênio líquido e depois

mantido em freezer -80°C para as análises de estresse oxidativo. Baseado nos pesos corporais e testiculares foi calculado o índice gonadossomático (IGS) a partir da fórmula: $IGS = PG/PC \times 100$, onde PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal. O IGS corresponde ao percentual do peso corporal alocado em testículo [19].

Após fixação durante 24 horas, os testículos foram transferidos para álcool 70%, desidratados em série etanólica crescente e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha) usando navalhas de vidro. Para evitar a repetição das análises de uma mesma região, as secções foram obtidas de modo semisseriado respeitando-se intervalos de 40 µm e colocadas em lâminas histológicas. Finalmente, as secções foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1% e hematoxilina - eosina para análises morfológicas e morfométricas. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha).

Percentual líquido no testículo

O percentual líquido de água por unidade de peso de tecido testicular (mL/g) foi feita pela relação da massa fresca (100 mg de fragmento testicular fixado em Karnovsky) e a massa seca do órgão (peso úmido - peso seco), sendo a massa seca obtida após secagem do fragmento de testículo em estufa 70°C até atingir peso seco constante (durante 7 dias) [20].

Análises morfométricas tubulares

Todas as análises morfométricas foram realizadas utilizando-se o software Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Foi projetada uma grade contendo 266 pontos sobre 15 imagens de campos capturados ao acaso em objetiva de 20X (Olympus AX 70 TRF), totalizando 3990 pontos por animal. Foram computados os pontos coincidentes sobre túbulos seminíferos (túnica própria, epitélio seminífero e lume) e intertúbulo e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente. O volume dos túbulos seminíferos e do intertúbulo foram estimados a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se o peso de um testículo pelo peso da albugínea de um testículo. Como a densidade do testículo é igual a 1 [21], o peso do testículo foi

considerado igual ao seu volume. A fim de quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal, foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula: $ITS = VTS/PC \times 100$, onde VTS = volume de túbulo seminífero e PC = peso corporal. Também foi calculado o índice parenquimossomático (IPS) com o objetivo de verificar o investimento em parênquima testicular em relação à massa corporal. Fórmula $IPS = \text{parênquima dos dois testículos}/PC \times 100$.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo. A altura do epitélio seminífero foi mensurada na mesma secção transversal em que foi aferido o diâmetro dos túbulos seminíferos. Neste caso, considerou-se a distância da túnica própria até a borda luminal, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal, sendo considerada como medida representativa a média das duas. O comprimento total de túbulos seminíferos (CT), expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos em um testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal a partir da fórmula $CT = VTS/\pi R^2$, onde: VTS= volume de túbulo seminífero e πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos ($R = \text{diâmetro tubular}/2$).

As populações de células germinativas e de células de Sertoli foram estimadas pela contagem de 20 secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 segundo o método da morfologia tubular [22]. Os seguintes tipos celulares foram contados: espermatogônias do tipo A (SGA), espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno (PLL) e paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (AR) e células de Sertoli (CS) com nucléolos bem evidentes. Os diâmetros nucleares e nucleolares médios (DM), os últimos somente para células de Sertoli, foram obtidos pela mensuração de 30 núcleos ou nucléolos em cada tipo celular supracitado. Devido a espessura do corte, a contagem dos diferentes tipos celulares foi corrigida pela fórmula proposta por Abercrombie [23] modificada por Amann e Almquist [24]:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{(\text{DM}/2)^2 - (\text{DM}/4)^2}}$$

Baseado em valores corrigidos, foi possível quantificar os seguintes coeficientes: mitose espermatogonial (PLL/SGA), rendimento meiótico (AR/PQ), rendimento geral da espermatogênese (AR/SGA), índice de célula de Sertoli (AR/CS) e capacidade total de suporte da célula de Sertoli ((SGA + PLL + PQ + AR) /CS). O número total de células de Sertoli foi determinado pelo número corrigido de nucléolos de célula de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos [25].

A produção espermática diária (PED) foi calculada de acordo com Amann [19] e Amann e Almquist [24]:

$$\text{PED} = \frac{\text{Volume total do túbulo seminífero } (\mu\text{m}^3) \times \text{Número corrigido de espermátides arredondadas}}{\text{Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero } (\mu\text{m}^2) \times \text{espessura do corte histológico } (\mu\text{m})}$$

A duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos Wistar é de 12,8 dias [10], sendo esta uma constante biológica espécie-específica.

A reserva espermática do testículo (RET) foi calculada com base na população de espermátides arredondadas (AR), adaptando-se a fórmula descrita por Amann [19] e Berndtson [22], na qual $\text{RET} = (\text{comprimento total dos túbulos seminíferos/espessura do corte}) \times (\text{número corrigido de AR})$.

Análises morfológicas intertubulares

Para cada animal foram quantificados 1000 pontos sobre intertúbulo, utilizando-se uma grade projetada contendo 266 pontos sobre 15 imagens intertubulares capturadas ao acaso em objetiva de 40X (Olympus AX 70 TRF). Foram registrados os pontos coincidentes sobre núcleo (NL) e citoplasma de célula de Leydig (CL), fibras colágenas/fibroblastos (FCF), macrófagos (MC), vasos sanguíneos (VS) e espaço linfático (EL) e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente. O volume de cada elemento no intertúbulo foi determinado a partir do percentual do elemento e o peso do parênquima de um testículo.

Para morfometria das células de Leydig foram medidos diâmetros nucleares de 20 células de Leydig em imagens capturadas com objetiva de 40x, escolhendo-se os núcleos que apresentavam contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos

evidentes. O volume nuclear de Leydig (VNL) foi obtido a partir da fórmula $VNL = 4/3\pi \times R^3$ onde R = raio nuclear. Para cálculo do volume citoplasmático de Leydig (VCL) utilizou-se a fórmula: $VCL = (\%CL \times VNL)/\%NL$, onde CL = percentual de citoplasma de Leydig, VNL = volume nuclear de Leydig e NL = percentual de núcleo de Leydig. O volume celular de Leydig (VL) foi obtido somando-se VNL e VCL. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3). O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo (VLT) foi feito a partir da fórmula: $(VLT) = (\%CLPPAR \times PPAR)/100$, onde CLPPAR = percentual de célula de Leydig no parênquima e PPAR= peso do parênquima de um testículo. A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a seguinte fórmula: $ILS = (VLT/PC) \times 100$. Para cálculo do número de células de Leydig (CLT) utilizou a fórmula: $CLT = VLT/VL$, onde VL= volume de célula de Leydig (μm^3).

Enzimas antioxidantes e malondialdeído

Amostras de 200 mg de testículos congelados foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4), centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos. Em seguida foi retirado o sobrenadante para análise da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona-S-transferase (GST), bem como a concentração do produto de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) e a concentração de proteína total (PRT). As análises foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia do Departamento de Biologia Animal da UFV.

Inicialmente foi mensurada a concentração de proteína total do testículo de acordo com Lowry et al. [26], utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão. Este dado foi usado na conversão da unidade de medida da atividade das enzimas SOD, CAT e para MDA em miligrama de proteína por grama de tecido testicular.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60 s [27]. A atividade da CAT foi expressa em U CAT/ mg prt. Já a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa a 570 nm [28], baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- em peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. A atividade da SOD foi expressa em U SOD/ mg prt. A atividade da glutaciona-S-transferase (GST)

foi mensurada através da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340 nm por 60 s. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade da enzima GST. Uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1 mol do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDBN 340 = $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos [29]. A atividade da GST foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Para determinação dos metabólitos da ação de espécies oxidantes (indicativo da peroxidação lipídica) foi feita a mensuração da concentração de malondialdeído (MDA) nas amostras de tecido homogeneizadas em tampão fosfato (pH 7,4). O sobrenadante foi centrifugado (10000 g por 10 min), adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15% e 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCL 0,25 N) em banho-maria por 15 minutos, resfriado, centrifugado a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante mensurado em espectrofotômetro a 535 nm [30]. Os cálculos foram feitos utilizando-se o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^{-5} \text{ M cm}^{-1}$. A concentração de MDA foi expressa em nmol/mg de proteína.

Análise estatística

Utilizou-se o programa GraphPad Prism 6.01 para realizar análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK) para comparar médias entre os grupos experimentais. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Quantificação e identificação de antocianinas

O conteúdo de antocianinas totais encontrado na polpa de *E. edulis* foi de 2348 mg por 100 g de polpa de juçara. As dosagens de 300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg de extrato de juçara (EJ) apresentaram, respectivamente, 70 mg, 119 mg e 133 mg de antocianinas totais. Para os dois tipos de antocianinas, cianidina 3-O-glucosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo foram encontrados, respectivamente, 988 mg/100g e 1103 mg/100g de polpa de juçara.

Dados biométricos

Para peso corporal inicial (PCI) peso corporal final (PCF), peso testicular (PT), peso de albugínea testicular (PAT), peso do parênquima (PPAR), índice gonadossomático (IGS), índice parenquimossomático (IPS) e percentual líquido (PL) não foram observadas diferenças significativas dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos corporais, testiculares e índice gonadossomático de ratos Wistar adultos do grupo controle e grupos tratados com diferentes doses de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	EJ ₃₀₀	EJ ₆₀₀	EJ ₉₀₀
PCI _(g)	365±25 ^a	337±29 ^a	346±36 ^a	347±12 ^a
PCF _(g)	396±67 ^a	402±20 ^a	358±29 ^a	402±10 ^a
PT _(g)	1,51±0,10 ^a	1,52±0,09 ^a	1,38±0,05 ^a	1,49±0,10 ^a
PAT _(g)	0,04±0,004 ^a	0,05±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a
PPAR _(g)	1,46±0,09 ^a	1,47±0,09 ^a	1,34±0,05 ^a	1,45±0,10 ^a
IGS _(%)	0,76±0,11 ^a	0,76±0,08 ^a	0,77±0,09 ^a	0,74±0,04 ^a
IPS _(%)	0,73±0,09 ^a	0,73±0,07 ^a	0,74±0,08 ^a	0,72±0,05 ^a
PL _(%)	82±0,01 ^a	82±0,02 ^a	83±0,01 ^a	82±0,01 ^a

CS=controle salina; EJ₃₀₀= 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₆₀₀= 600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₉₀₀= 900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. PCI= peso corporal inicial; PCF= peso corporal final; PT= peso referente a um testículo; PAT= peso da albugínea referente a um testículo; PPAR= peso do parênquima referente a um testículo; IGS= índice gonadossomático; IPS= índice parenquimossomático; PL= percentual de líquido no testículo. Dados expressos como média±dp. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Morfometria tubular

O índice tubulossomático (ITS), percentual e o volume de túbulo seminífero (TS), epitélio seminífero (ES), túnica própria (TP), lume tubular (LT), altura de epitélio seminífero (AES), diâmetro de túbulo seminífero (DT) e comprimento total de túbulo seminífero (CT) dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ não diferiram do grupo controle (Tabela 2). Ao microscópio de luz, as secções tubulares dos testículos dos animais do grupo controle e dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ apresentaram características morfológicas normais típicas. Os túbulos seminíferos se apresentaram com contorno bem delimitado e definido, possuindo epitélio germinativo organizado

em camadas concêntricas da base para luz tubular, assim como luz tubular bem definida (Figura 1).

Tabela 2. Parâmetros tubulares do testículo de ratos Wistar adultos do grupo controle e grupos tratados com diferentes doses de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	EJ ₃₀₀	EJ ₆₀₀	EJ ₉₀₀
ITS _(%)	0,33±0,05 ^a	0,31 ±0,04 ^a	0,32 ±0,05 ^a	0,31±0,01 ^a
TS (%)	88,28±0,87 ^a	87,88±1,21 ^a	88,91±1,98 ^a	87,97±0,99 ^a
ES _(%)	77,49±1,08 ^a	78,26±2,19 ^a	79,95±1,92 ^a	77,65±0,93 ^a
TP _(%)	1,02±0,53 ^a	1,00±0,44 ^a	1,12±0,20 ^a	1,01±0,08 ^a
LT _(%)	9,77±1,19 ^a	8,62±1,42 ^a	7,85±1,07 ^a	9,31±1,11 ^a
VTS _(mL)	1,29±0,09 ^a	1,29±0,07 ^a	1,19±0,17 ^a	1,27±0,08 ^a
VES _(mL)	1,13±0,07 ^a	1,15±0,06 ^a	1,07±0,14 ^a	1,12±0,08 ^a
VTP _(mL)	0,01±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a	0,02±0,003 ^a	0,02±0,002 ^a
VL _(mL)	0,14±0,02 ^a	0,13±0,02 ^a	0,11±0,01 ^a	0,13±0,01 ^a
AES _(µm)	90,93±6,14 ^a	90,96±2,40 ^a	93,05±4,64 ^a	91,50±4,70 ^a
DT _(µm)	296,9±12,9 ^a	293,3±17,7 ^a	296,7±13,4 ^a	293,4±8,79 ^a
CT _(x10⁶)	18,69±0,76 ^a	19,31±2,34 ^a	17,38±3,32 ^a	18,90±2,02 ^a

CS=controle salina; EJ₃₀₀= 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₆₀₀= 600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₉₀₀= 900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. ITS= índice tubulossomático; TS= percentual de túbulo seminífero; ES= percentual de epitélio seminífero; TP= percentual de túnica própria; LT= percentual de lume; VTS= volume de túbulo seminífero; VES= volume de epitélio seminífero; VTP= volume de túnica própria; LT= volume de lume; AES= altura do epitélio seminífero; DT= diâmetro de túbulo seminífero; CT= comprimento total de túbulo seminífero em metros (x10⁶). Dados expressos como média±dp. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

A contagem das células germinativas no Estádio I, assim como os índices mitótico (IMit) e meiótico (IMei), e o rendimento geral da espermatogênese (RG) dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ não sofreram alteração em relação ao grupo controle (Tabela 3). Quanto aos dados de célula de Sertoli, o número (CS), o índice (ICS), a capacidade total de suporte (CTCS) e o número de células de Sertoli por testículo (CS/T) dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ não diferiram do grupo controle. Os cálculos da produção espermática diária (PED) e reserva espermática do testículo (RET) também não apresentaram variações significativas entre os grupos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3. Número corrigido de células espermato gênicas e células de Sertoli, razões entre os números celulares, índice de célula de Sertoli, produção e reserva espermática do testículo de ratos Wistar adultos do grupo controle e grupos tratados com diferentes doses de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	EJ ₃₀₀	EJ ₆₀₀	EJ ₉₀₀
SGA	1,41±0,04 ^a	1,39 ±0,04 ^a	1,42 ±0,04 ^a	1,43±0,07 ^a
PLL	30,56±0,36 ^a	29,91±0,79 ^a	30,05±1,54 ^a	31,61±0,93 ^a
PQ	33,93±0,71 ^a	34,08±0,19 ^a	33,93±0,61 ^a	33,95±0,90 ^a
AR	87,75±2,05 ^a	86,81±2,09 ^a	88,06±1,47 ^a	88,12±1,52 ^a
IMit	21,69±0,72 ^a	21,61±0,90 ^a	21,34±1,21 ^a	22,15±1,76 ^a
IMei	2,59±0,03 ^a	2,55±0,06 ^a	2,60±0,09 ^a	2,59±0,08 ^a
RG	62,28±3,02 ^a	62,80±1,27 ^a	62,56±1,61 ^a	61,70±1,23 ^a
CS	12,76±0,21 ^a	13,24±0,38 ^a	12,84±0,38 ^a	13,54±0,66 ^a
ICS	6,88±0,07 ^a	6,56±0,09 ^a	6,87±0,17 ^a	6,51±0,25 ^a
CTCS	12,04±0,09 ^a	11,50±0,25 ^a	11,97±0,35 ^a	11,47±0,50 ^a
CS/T _(x10⁶)	79,83±2,32 ^a	82,65±9,42 ^a	71,44±5,36 ^a	84,60±7,26 ^a
PED _(x10⁶)	85,71±2,26 ^a	84,55±4,41 ^a	76,80±2,95 ^a	85,92±2,91 ^a
RET _(x10⁶)	1130,85±28,9 ^a	1114,78±56,9 ^a	1014±85,3 ^a	1135,25±86,46 ^a

CS=controle salina; EJ₃₀₀= 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₆₀₀= 600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₉₀₀= 900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. SGA= Espermatogônia do tipo A; PLL= Espermatócito primário em preleptóteno/leptóteno; PQ= Espermatócito primário em paquíteno; AR= Espermatídes arredondadas; IMit = Índice mitótico; IMei = Índice meiótico; RG = Rendimento geral da espermatogênese; CS= células de Sertoli; ICS= Índice de célula de Sertoli; CTCS= Capacidade total de suporte das células de Sertoli; CS/T= Número de célula de Sertoli por testículo (x10⁶); PED:= Produção espermática diária (x10⁶); RET= Reserva espermática do testículo (x10⁶). Dados expressos como média±dp. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

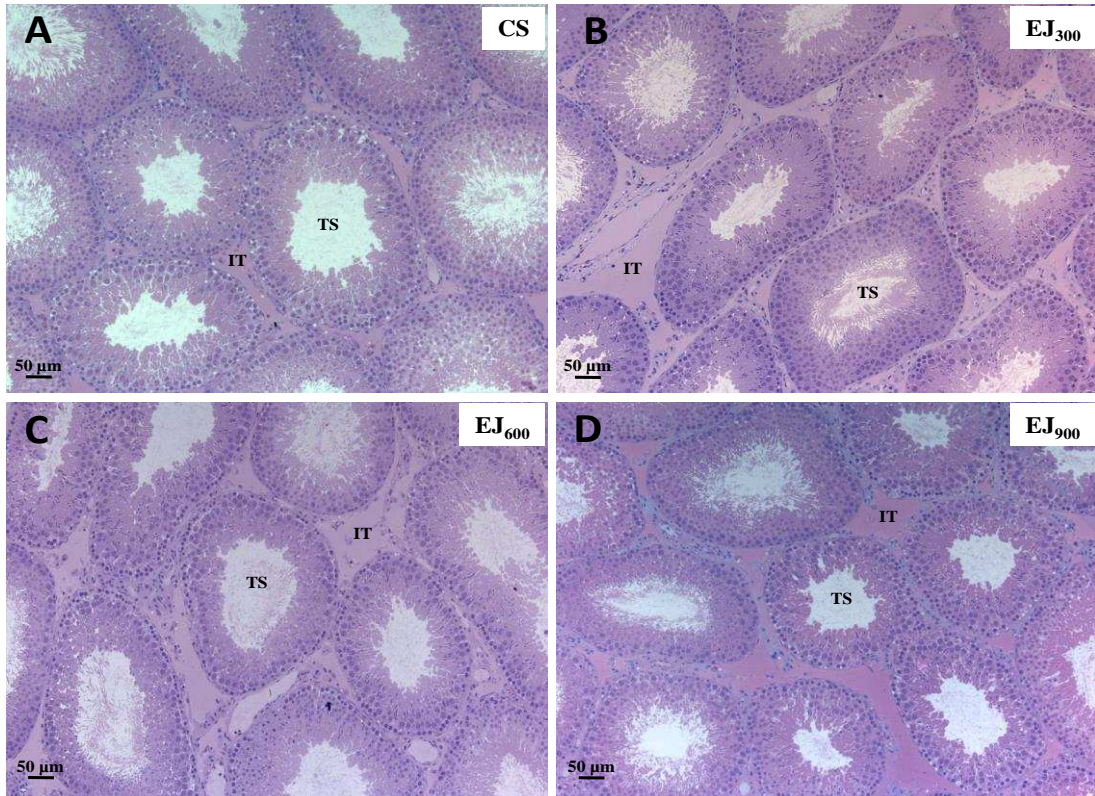


Figura 1. Fotomicrografias de secções do testículo de ratos Wistar adultos mostrando túbulos seminíferos com epitélio preservado no grupo controle (CS) e nos grupos que receberam diferentes dosagens de extrato hidroalcoólico de juçara (EJ) (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg de EJ). TS: túbulo seminífero; IT: intertúbulo.

Morfometria intertubular

Não houve diferença significativa do percentual e volume de intertúbulo (IT), fibras colágenas/fibroblastos (FCF), vasos sanguíneos (VS), espaço linfático (EL) e macrófago (MC) dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ em relação ao controle (Tabela 4). A região do intertúbulo de todos os grupos apresentou morfologia dentro dos padrões para ratos, os quais apresentam grandes espaços linfáticos, agrupamento de células de Leydig em torno de vasos sanguíneos e poucas fibras colágenas (Figura 2).

Tabela 4. Parâmetros intertubulares do testículo de ratos Wistar adultos do grupo controle e grupos tratados com diferentes doses de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	EJ ₃₀₀	EJ ₆₀₀	EJ ₉₀₀
IT _(%)	11,73±0,87 ^a	12,13±1,21 ^a	11,08±1,98 ^a	12,03±0,99 ^a
FCF _(%)	3,82±2,49 ^a	2,56±0,83 ^a	3,09±0,64 ^a	2,99±0,56 ^a
VS _(%)	10,39±1,90 ^a	9,29±1,32 ^a	8,89±2,05 ^a	8,66±2,76 ^a
EL _(%)	26,95±4,47 ^a	28,03±7,94 ^a	25,39±11,41 ^a	26,39±13,44 ^a
MC _(%)	10,43±2,41 ^a	8,50±0,63 ^a	9,01±4,6 ^a	10,18±2,8 ^a
VIT _(mL)	0,17±0,02 ^a	0,18±0,03 ^a	0,15±0,04 ^a	0,17±0,02 ^a
VFCF _(mL)	0,06±0,04 ^a	0,04±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a
VVS _(mL)	0,15±0,03 ^a	0,14±0,02 ^a	0,12±0,03 ^a	0,13±0,05 ^a
VEL _(mL)	0,39±0,06 ^a	0,41±0,11 ^a	0,33±0,15 ^a	0,39±0,21 ^a
VMC _(mL)	0,15±0,04 ^a	0,13±0,01 ^a	0,12±0,04 ^a	0,15±0,04 ^a

CS=controle salina; EJ₃₀₀= 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₆₀₀= 600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₉₀₀= 900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. IT= percentual de intertúbulo; FCF = percentual de fibras colágenas/fibroblasto; VS= percentual de vaso sanguíneo; EL = percentual de espaço linfático; MC= percentual de macrófagos; VIT= volume de intertúbulo; VFCF= volume de fibras colágenas/ fibroblasto; VVS= volume de vaso sanguíneo; VEL = volume de espaço linfático; VMC= volume de macrófagos. Dados expressos como média±dp. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

Para o percentual e volume de citoplasma de Leydig (CL), núcleo de Leydig (NL), total de células de Leydig (L), índice Leydigossomático (ILS), volume de células de Leydig por testículo (VLT), diâmetro do núcleo das células de Leydig (DNL) e número de células de Leydig por testículo (CLT) não foram observadas diferenças significativas dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ em relação ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros estereológicos de células de Leydig de ratos Wistar adultos dos grupo controle e grupos tratados com diferentes doses de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	EJ ₃₀₀	EJ ₆₀₀	EJ ₉₀₀
CL _(%)	39,16±6,50 ^a	41,55±7,84 ^a	45,12±13,9 ^a	42,41±15,1 ^a
NL _(%)	9,25±0,42 ^a	10,07±1,85 ^a	8,50±1,17 ^a	9,37±0,61 ^a
L _(%)	48,41±6,56 ^a	51,62±7,36 ^a	53,62±13,53 ^a	51,78±15,42 ^a
ILS _(%)	0,021±0,01 ^a	0,022±0,01 ^a	0,023±0,01 ^a	0,019±0,01 ^a
VCL _(μm³)	562,6±96 ^a	567,6±99 ^a	598,1±38 ^a	521,6±91 ^a
VNL _(μm³)	133,3±13 ^a	137,6±23 ^a	120,4±10 ^a	120,3±12 ^a
VL _(μm³)	695,9±99 ^a	705,2±94 ^a	718,5±30 ^a	641,9±76 ^a
VLT _(mL)	0,08±0,01 ^a	0,09±0,02 ^a	0,08±0,03 ^a	0,08±0,03 ^a
CLT _(x10⁶)	119,8±15 ^a	132,7±31 ^a	113,6±50 ^a	118,6±27 ^a
DNL _(μm)	6,33±0,21 ^a	6,39±0,36 ^a	6,07±0,66 ^a	6,11±0,34 ^a

CS=controle salina; EJ₃₀₀= 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₆₀₀= 600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; EJ₉₀₀= 900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. CL= percentual de citoplasma de Leydig; NL = percentual de núcleo de Leydig; L= percentual de célula de Leydig; ILS = Índice Leydigossomático; VCL= volume de citoplasma de Leydig; VNL = volume de núcleo de Leydig; VL= volume de células de Leydig; VLT = volume de célula de Leydig por testículo; CLT (x10⁶)= número de célula de Leydig por testículo; DNL = diâmetro do núcleo da célula de Leydig. Dados expressos como média±dp. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

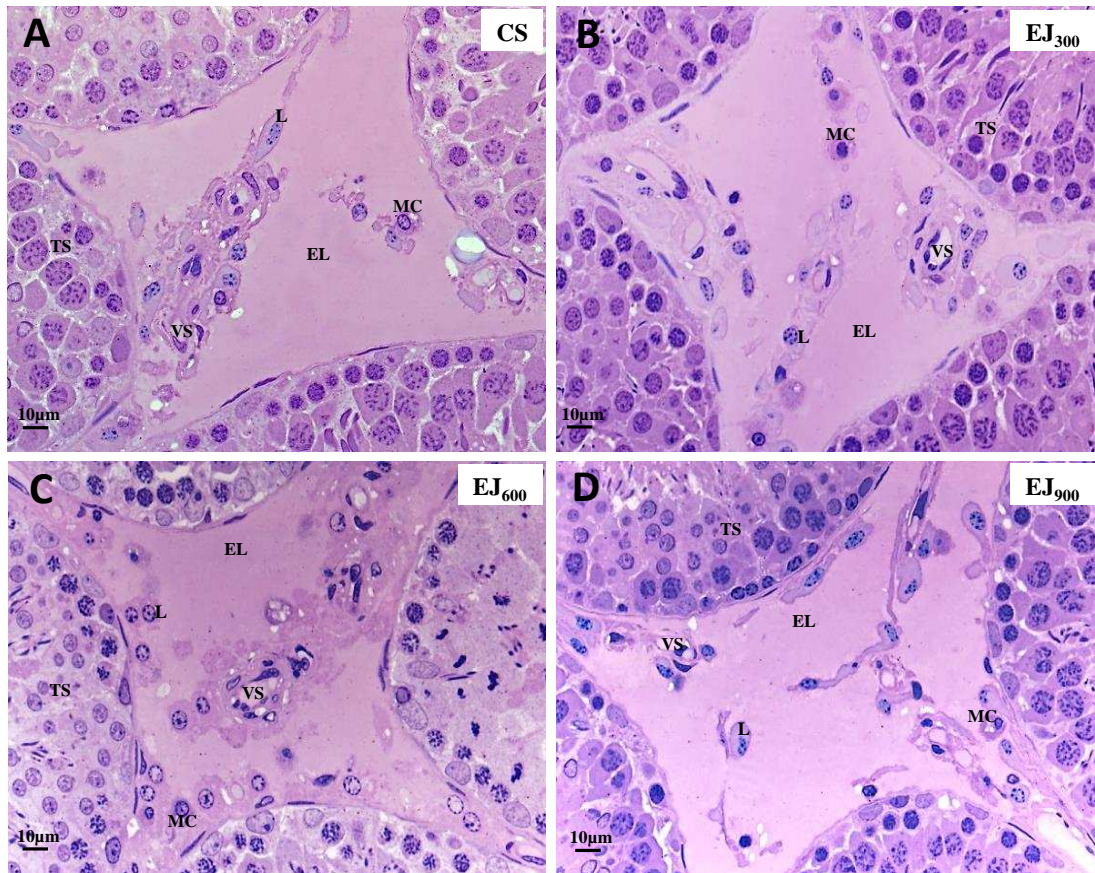


Figura 2. Fotomicrografias de secções do compartimento intertubular de testículo de ratos Wistar adultos mostrando morfologia e composição preservada dos componentes intertubulares no grupo controle (CS) e nos grupos que receberam diferentes dosagens de extrato hidroalcoólico de juçara (EJ) (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg de EJ). TS: túbulo seminífero; L: célula de Leydig; MC: macrófago; EL: espaço linfático; VS: vaso sanguíneo.

Enzimas antioxidantes e malondialdeído

Não foi observada diferença significativa da atividade das seguintes enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa-S-transferase (GST) e para concentração de malondialdeído (MDA), produto de peroxidação lipídica dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ em relação ao grupo controle (Figura 3).

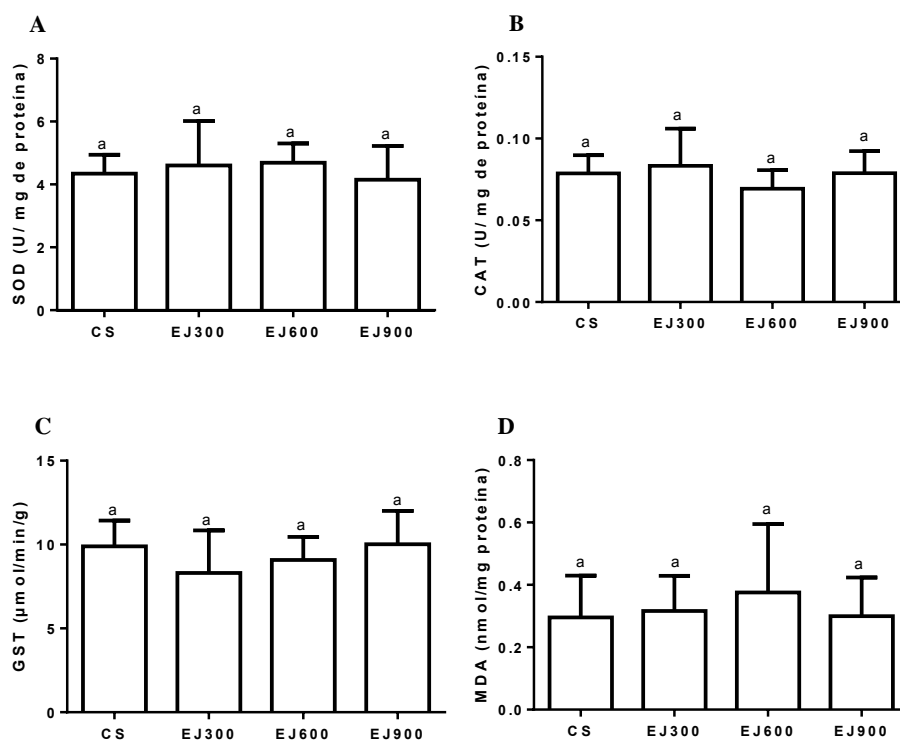


Figura 3. Atividade de enzimas antioxidantes e marcador de peroxidação lipídica no tecido testicular de ratos Wistar ratos Wistar adultos do grupo controle (CS) e dos grupos que receberam diferentes dosagens de extrato hidroalcoólico de juçara (EJ) (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg de EJ). A= superóxido dismutase (SOD), B= catalase (CAT), C= glutationa-S-transferase (GST), D= concentração de malondialdeído (MDA). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

A polpa de *E. edulis* tem sido objeto de estudo em função de seu elevado teor de antocianinas comparado a outras frutas tais como jabuticaba, jamelão [31] e acerola [7]. Neste trabalho, o teor de antocianinas totais, 2348,9 mg/100g, foi semelhante aos encontrados por Brito et al. [7] e Novello et al. [8], respectivamente 2956 mg/100g e 2471,4 mg/100g. Estes autores também quantificaram cianidina 3-O-glucosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo, além de outros tipos de antocianinas, contudo, estes dois tipos constituíram cerca de 90% das antocianinas do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (EJ). Hassimotto et al.[32] estudaram a absorção e metabolismo da cianidina-3-O-glucosídeo e da cianidina-3-O-rutinosídeo e demonstraram que, mesmo uma pequena absorção de antocianinas em ratos Wistar foi suficiente para aumentar a capacidade antioxidante do plasma.

O extrato de juçara não ocasionou mortalidade ou alterações comportamentais em nenhum dos animais durante os 56 dias de experimento. O peso corporal dos animais dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ não diferiu do grupo controle. De modo similar, também não apresentaram variação no peso corporal de camundongos tratados com 2% de EJ [8, 31] e 6% [8]. Diagnóstico inicial sobre danos à função espermatogênica pode ser feito através do peso testicular, uma vez que a maior parte do parênquima testicular é composta por túbulos seminíferos, locais de produção espermática [10, 19]. Os grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ não sofreram alteração no peso testicular, assim como não houve variação para o peso do parênquima testicular (PPAR), peso da albugínea (AT) e para o percentual de peso corporal alocado em massa testicular (IGS) em relação ao grupo controle. Assim, o tratamento com diferentes doses de extrato de *E. edulis* não causou danos morfológicos aparentes nos testículos dos animais.

Alterações no processo espermatogênico podem ser constatadas a partir dos parâmetros tubulares, principalmente aqueles relacionados à produção espermática, como medida do diâmetro tubular (DT), altura do epitélio seminífero (AES) e comprimento total tubular (CT) [10]. Como observado por Dokhanchi et al.[33], a administração de diferentes doses de extrato aquoso de palmito da espécie *Phoenix dactylifera* em ratos provocou redução do diâmetro tubular, como consequência da redução da população de células germinativas. Neste trabalho, os grupos que receberam o EJ apresentaram todos os parâmetros tubulares, incluindo os valores referentes a DT, AES e CT, dentro dos limites médios observados para o grupo controle, podendo assim inferir que o tratamento com EJ não interferiu no processo espermatogênico. Tal inferência foi confirmada pela ausência de alterações no número de células de Sertoli e células germinativas no epitélio seminífero de ratos expostos a diferentes doses do EJ em relação controle. Com isto, os índices mitótico (IMit) e meiótico (IMet), e rendimento geral da espermatogênese (RG) não variaram entre os grupos experimentais. Os parâmetros que avaliam a eficiência funcional das células de Sertoli, como o índice da célula de Sertoli (ICS) e a capacidade total de suporte das células de Sertoli (CTCS), também não mostraram diferença significativa entre os grupos experimentais. Estes dados mostram que o EJ não afetou as fases de desenvolvimento das células germinativas e na relação destas com a célula de Sertoli. Portanto, o EJ não apresentou efeito estimulador nem inibidor do processo espermatogênico e da produção espermática, como foi mostrado pela ausência de

alteração nas estimativas da produção espermática diária (PED) e reserva espermática do testículo (RET).

No intertúbulo dos mamíferos, a célula de Leydig apresenta população frequente, sendo responsável pela produção de andrógenos, além de estar diretamente relacionada ao macrófago, outro tipo celular bastante comum no compartimento intertubular [34]. No presente estudo, os grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ não apresentaram alterações nas proporções destes dois tipos celulares. Em ratos, as células de Leydig e macrófagos estão banhadas pelo fluido linfático, sendo que as células de Leydig, em particular, geralmente ficam agrupadas em torno dos vasos sanguíneos [35]. O fluido linfático tem grande importância na nutrição e entrega de substâncias para os túbulos seminíferos, dessa forma, alteração no equilíbrio de fluidos no intertúbulo causa sérios impactos à função espermatogênica. Fatores como o aumento de fibras colágenas/fibroblastos ou entrada excessiva de fluidos podem comprometer o transporte de andrógenos e outras substâncias entre intertúbulo e túbulo [36–38]. Nos grupos que receberam o EJ, além de não ocorrer variação nos percentuais e volumes de fibras colágenas/fibroblastos (FCF), vasos sanguíneos (VS) e espaço linfático (EL), também não houve variação no percentual líquido (PL). Com isto, o uso do EJ, nas doses testadas neste estudo, não afetou a dinâmica e volume do fluido intertubular, e provavelmente não interferindo no fornecimento de nutrientes, fatores de crescimento e andrógenos, essenciais no desenvolvimento das células germinativas.

Estudos com extratos vegetais têm mostrado efeitos positivos e negativos sobre as células de Leydig. Chierigatto [39], testando os efeitos de 25g dos extratos de duas plantas conhecidas popularmente como afrodisíacas, *Anemopaegma arvense* e *Heteropterys aphrodisiaca*, observou aumento no percentual e volume de núcleo e citoplasma de célula de Leydig, além de aumento no diâmetro e volume total de células de Leydig em ratos adultos. Por outro lado, Gomes [40] observou em ratos tratados com infusão de 36mg e 72mg de *Trichilia catigua* (catuaba) redução destes mesmos parâmetros de Leydig citados anteriormente. Diferente destes trabalhos, os grupos que receberam o EJ não apresentaram quaisquer variações quanto aos parâmetros de célula de Leydig que pudessem indicar prejuízos ou ganhos sobre este tipo celular.

A manutenção das características morfológicas e morfométricas são corroboradas com a ausência de danos oxidativos, a exemplo da peroxidação lipídica

(MDA), ou de alteração da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) no testículo dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ em relação ao grupo controle. O extrato de juçara possui propriedade antioxidante *in vitro* e, como demonstrado em alguns trabalhos *in vivo* [8,31]. Novello et al. [8] utilizaram 2% e 6% de *E. edulis* em dietas de camundongos ApoE -/- durante 75 dias e verificaram redução das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido hepático. Esta redução foi relacionada à modulação negativa destas enzimas pela presença de antioxidantes naturais no extrato de juçara. A atividade inalterada da atividade das enzimas antioxidantes nos grupos que receberam o EJ pode ter relação com a ausência de fatores indutores de estresse oxidativo. Como observado anteriormente no trabalho de Novello et al. [8], os camundongos ApoE -/- estavam sob constante situação de estresse oxidativo. Este modelo animal é deficiente da glicoproteína ApoE, que é importante no transporte e metabolismo de colesterol e triacilglicerol. Assim, camundongos deficientes em ApoE possuem níveis de colesterol elevados devido a ineficiente remoção das lipoproteínas, gerando um quadro de estresse oxidativo e ativação das cascatas de reação de citocinas inflamatórias [41]. Diferentemente, no presente estudo, os animais dos grupos EJ₃₀₀, EJ₆₀₀ e EJ₉₀₀ não apresentavam nenhum desafio metabólico indutor de estresse oxidativo que favorecesse a modulação das respostas das enzimas antioxidantes.

Os dados indicam que o extrato de juçara (*E. edulis*) não influenciou de forma significativa os parâmetros morfométricos testiculares. Apesar de não promover a estimulação da espermatogênese e das células de Leydig, o extrato de juçara também não induziu efeitos tóxicos no testículo, mostrando-se seguro seu consumo nas doses avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. He J, Giusti MM (2010) Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 1:163–187
2. Kris-Etherton PM, Lefevre M, Beecher GR, Gross MD, Keen CL, Etherton TD (2004) Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annu Rev Nutr* 24:511–538
3. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R (2006) Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural* 36:1283–1287
4. Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB (2012) Phenol-Based antioxidants

- and the in vitro methods used for their assessment. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 11:148–173
5. Yahia, EM (2009) The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In :Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value, and stability (eds Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA), Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp 3-51
 6. Vasconcelos MAM; Neto JTF; Silva FCF (2010) Cultivo, processamento, padronização e comercialização do açaí na Amazônia. Fortaleza: Instituto Frutal, 1-113
 7. Brito ES, Araújo MCP, Alves RE, Carkeet C, Clevidence BA, Novotny JA (2007) Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *J Agric Food Chem* 55:9389–9394
 8. Novello AA, Conceição LL, Dias MMS, Cardoso LM, Castro CA, Silva MER, Leite JPL, Peluzio MCG (2015) Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* mart in mice. *J Food Nutr Res* 54:101–112
 9. Borges GDSC, Vieira FGK, Copetti C, Gonzaga LV, Zambiasi CR, Filho JM, Fetta R (2011) Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Res Int* 44:2128–2133
 10. Russell LD, Ettlín RA, Sinha HAP, et al (1990) Mammalian spermatogenesis. In: Russell, LD, Ettlín RA, Sinha HAP, Clegg ED.(eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Saint Louis, pp 1-40
 11. Turner TT, Lysiak JJ (2008) Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl* 29:488–498
 12. Fisch STV, Nogueira JLR, Mantovani W (2000) Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na Mata Atlântica (Reserva Ecológica do Trábiju, Pindamonhangaba – SP). *Rev biociências* 6:31–37
 13. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2010) Sistema e produção do açaí. [https:// sistemas deproducao .cnptia. embrapa.br /Fontes HTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/processamento.htm](https://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/processamento.htm). Acesso Junho de 2010.
 14. Giusti MM, Wrolstad RE (2005) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. In: *Handb Food Anal Chem*. pp 19–31
 15. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, Kababick JP (2006) Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J Agric Food Chem* 54:8598–8603
 16. Silva ABL, Dias KS, Marques MS, Marques MS, Menezes IAC, Santos TC, Mello ICM, Lisboa ACCD, Cavalcanti SCH, Marçal RM, Antonioli AR (2006) Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. *Rev Bras Farmacogn* 16:475–47
 17. Lourenço JA, Pitangui CP, Jordão AA, Vannucchi H, Cecchi AOI (2010) Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) standl.]. *Rev Bras Plantas Med* 12:414–420
 18. Karnovsky MJ (1965) A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use In Electron Microscopy. *J Cell Biol* 27:137–138
 19. Amann RP (1970) Sperm production rates. In= Johnson AD, Gomes WR., VanDemark NL (Ed.) *The Testis*, Academic Press, New York Vol. 1, 433 p
 20. Cupertino MC, Costa KLC, Santos DCM, Novaes RD, Condessa SS, Neves AC, Oliveira JA, Matta SL (2013) Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. *Int J Exp Pathol* 94:343-51

21. Johnson L, Petty CS, Neaves WB (1981) A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol Reprod* 25:217-226
22. Berndtson, WE (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci* 44:818-883
23. Abercrombie, M (1946). Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Ant Rec* 94:238-248
24. Amann, RP, Almquist, JO (1962) Reproductive capacity of dairy bulls, VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J Dairy Sci* 45:774-781
25. Hochereau-de-Reviere MT, Lincoln GA (1978) Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J Reprod Fertil* 54:209-213
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
27. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
28. Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, et al (2000) Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation* 101:33-39
29. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
30. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310
31. Sant'Ana MR (2014) Avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante da casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), do açaí jussara (*Euterpe edulis* Martius) e do jambolão (*Syzygium cumini*) em camundongos submetidos à dieta de cafeteria. Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil
32. Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajo FM (2008) Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutr Res* 28:198-207
33. Dokhanchi M, Jashni HK, Tanideh N, Azarpira N (2013) Effects of heart of palm (Palmito) extract on reproductive system of adult male rats. *Asian Pacific J Reprod* 2:272-276
34. Gaytan F, Bellido C, Aguilar E, van Rooijen N (1994) Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *Reproduction* 102:393-399
35. Foley GL (2001) Overview of Male Reproductive Pathology. *Toxicol Pathol* 29:49-63.
36. Creasy DM (2001) Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol Pathol* 29:64-76
37. Porter KL, Shetty G, Meistrich ML (2006) Testicular edema is associated with spermatogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinology* 147:1297-1305
38. Adam M, Urbanski HF, Garyfallou VT, et al (2012) High levels of the extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular function. *Int J Androl* 35:550-561
39. Chierogatto, LC. Efeito do tratamento crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. e *Anemopaegma arvense* (Vell) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos. 2005. 67f. Tese (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005
40. Gomes, M.L.M. Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss. Meliaceae) (2007). 38f. Tese (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
41. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL (1994) ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis.

Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 14:605–616

.
.

ARTIGO 2:

O extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) não atenua os efeitos do cádmio no testículo de ratos Wistar adultos

Artigo redigido com base nas normas do periódico BioMetals

O extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) não atenua os efeitos do cádmio no testículo de ratos Wistar adultos

RESUMO

Dentre os metais pesados, o cádmio (Cd) tem sido alvo de estudos por causa de seus efeitos tóxicos em animais, plantas e humanos. O Cd por não ser biodegradável, pode bioacumular-se e promover uma série de disfunções nos diversos órgãos, dentre eles, nos testículos. Em contrapartida, tem crescido nos últimos anos a busca por substâncias com efeito protetor ou atenuador dos efeitos tóxicos do Cd sobre o sistema reprodutor, particularmente sobre danos a espermatogênese. A polpa dos frutos da palmeira *Euterpe edulis*, conhecida popularmente por juçara, tem mostrado propriedades antioxidante e anti-inflamatória, *in vitro* e *in vivo*, devido principalmente ao seu alto conteúdo de antocianinas. O presente estudo avaliou os efeitos de doses crescentes do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (EJ) sobre túbulo seminífero, intertúbulo, atividades de enzimas antioxidantes e produtos de peroxidação lipídica no testículo de ratos Wistar submetidos à dose única de 1,2 mg/kg de peso corporal de cloreto de cádmio. Os animais foram divididos em cinco grupos: grupo controle, grupo cádmio, grupo cádmio + 300 mg/kg de EJ, grupo cádmio + 600 mg/kg de EJ e grupo cádmio + 900 mg/kg de EJ. Após 48 horas da exposição ao cloreto de cádmio, foi iniciado o tratamento, via gavagem, com doses crescentes do extrato hidroalcoólico de juçara. A maior parte dos parâmetros tubulares e intertubulares dos grupos exposto ao cádmio, com e sem a oferta do extrato hidroalcoólico de juçara, sofreram redução devido à necrose e calcificação tubular observada nestes grupos. Estas lesões testiculares foram consistentes com o aumento da peroxidação lipídica. No entanto, nos grupos que receberam o extrato de juçara após a exposição ao cádmio apresentaram, ainda, redução do peso e parênquima testicular e do volume e comprimento de túbulo seminífero quando comparados ao grupo cádmio. Deste modo, o extrato de juçara, nas doses utilizadas, não promoveu recuperação testicular e provavelmente, seu uso após a exposição ao cádmio, potencializou os danos testiculares em ratos Wistar.

Palavras-chave: antocianinas, metais pesados, reprodução

INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um metal de transição tóxico, presente naturalmente em rochas sedimentares e obtido comercialmente como subproduto do refino de zinco, cobre e chumbo. Este metal é conhecido pela sua toxicidade em plantas, animais e humanos. Apenas uma diatomácea marinha, *Thalassiosira weissflogii*, utiliza o Cd em processos biológicos. Esta espécie apresenta um tipo exclusivo de anidrase carbônica com sítio catalítico específico para o Cd (Lane e Morel 2000).

Os alimentos são citados como principal fonte de exposição ao Cd. A média de ingestão de cádmio através dos alimentos mais propícios à contaminação do metal (como cereais, legumes e batata) varia entre 8 a 25 µg por dia (Olsson et al. 2002; Llobet et al. 2003). Conforme a Organização Mundial da Saúde, o limite de ingestão mensal tolerável é de 25 µg/kg de peso corporal (WHO 2010). O cádmio na água potável, assim como no ar, contribui apenas com uma pequena porcentagem da dose total absorvida, a não ser em áreas contaminadas, onde água de poços, rios e o ar possam estar substancialmente contaminados, mesmo após o encerramento da fonte emissora (Hogervorst et al. 2007). O tabagismo é outra importante fonte de exposição ao Cd, pois as folhas de tabaco podem acumular uma quantidade significativa deste cádmio. Um cigarro pode conter de 1 a 2 µg de cádmio, dependendo do tipo e da marca, sendo que cerca de 10% do teor de cádmio é inalado e desses, aproximadamente 50% chegam aos pulmões. Contudo, a suscetibilidade ao Cd depende também de outros fatores como genética, sexo e estado nutricional do indivíduo, além da dose e do tempo de exposição (Maret e Moulis 2013).

A principal hipótese de toxicidade do Cd se baseia na competição com metais essenciais, devido à sua semelhança estrutural com metais essenciais divalentes e a alta afinidade com grupos sulfidrilas (-SH). Tem sido mostrado que o Cd pode competir com magnésio (Mg^{2+}), zinco (Zn^{2+}), ferro ($Fe^{2+/3+}$), cálcio (Ca^{2+}) e cobre (Cu^{2+}) em sítios ativos de proteínas, enzimas antioxidantes e nos transportadores de membrana (Nigam et al. 1999; Smith et al. 2013). Diante destas inferências, é suposto que o Cd tenha um papel importante na indução de estresse oxidativo, uma vez que pode inibir ou reduzir a atividade de enzimas antioxidantes (Nigam et al. 1999). Sabe-se também que o Cd pode se ligar fortemente ao complexo III da cadeia transportadora de elétrons, o que causa acumulação de semi-biquinonas instáveis, que por fim transferem um elétron para o oxigênio molecular, resultando na

formação de superóxido (Wang et al. 2004). Contudo, a maior parte dos estudos tem sido *in vitro* e, com isto, a escassez de evidências *in vivo* torna-se um empecilho para a melhor compreensão da forma de atuação do cádmio.

Alterações das funções reprodutivas após exposição ao Cd tem sido foco de constantes pesquisas. A exposição ao Cd, mesmo em baixas doses, causa vários danos em ratos e camundongos, como redução do peso testicular (Blanco et al. 2007), diminuição da qualidade do sêmen, redução da contagem espermática (Xu et al. 2003), dos níveis de testosterona (Pires et al. 2013) e da atividade de enzimas antioxidantes (Cuypers et al. 2010; Cupertino et al. 2013). Além disto, há uma linha de pesquisa que sugere que a célula endotelial seja o alvo primário do Cd, uma vez que este metal pode substituir o cálcio nos locais de ligação às caderinas, o que pode alterar a permeabilidade endotelial, e assim contribuir para o aumento da entrada de Cd no tecido (Aoki e Hoffer 1978; Aoyagi et al. 2002; Prozialeck et al. 2008). De outro modo, o Cd também pode competir com o zinco ou magnésio pelo transportador ZIP8, observado nas células endoteliais de camundongos com necrose testicular, causando lesão nestas células (Dalton et al. 2005).

Deste modo, o desenvolvimento de estratégias seguras e eficazes contra a toxicidade do Cd é uma área de investigação em curso (Salem et al. 2008; Pires et al. 2013). O fruto de *Euterpe edulis* Martius, conhecido popularmente como palmeira juçara, içara ou açai da Mata Atlântica, tem sido objeto de estudos em função do valor nutritivo, sendo considerado um alimento nutracêutico face ao elevado teor de polifenóis, ácidos graxos ômega-6, ômega-9 e alto conteúdo de antocianinas (Sant'Ana 2014). O seu despulpamento gera um produto nutricionalmente semelhante à polpa do açai da Amazônia (*Euterpe oleracea*) (Brito et al. 2007). Antocianinas são flavonoides, uma classe de compostos fenólicos com potencial antioxidante e anti-inflamatório demonstrado principalmente *in vitro* e em alguns trabalhos *in vivo* (He e Giusti 2010). Contudo, ainda não foram documentados os efeitos deste extrato no testículo de animais expostos ao cádmio. Neste trabalho foram avaliados os efeitos de dosagens crescentes de extrato hidroalcoólico da polpa de *E. edulis* sobre túbulo seminífero e intertúbulo, atividade de enzimas antioxidantes e produtos de peroxidação lipídica no testículo de ratos Wistar submetidos à dose única de 1,2 mg/kg de peso corporal de cloreto de cádmio.

METODOLOGIA

Obtenção e beneficiamento dos frutos de juçara, Euterpe edulis Martius

A coleta dos frutos foi realizada no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), localizado na região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais (20°42'S; 42°29'W) a 1375 m de altitude. A coleta foi realizada no período de floração e frutificação de *E. edulis*, entre os meses de agosto a novembro (Fisch et al. 2000).

Os frutos de juçara foram despulpados no prazo máximo de 24 horas após a colheita devido a sua alta perecibilidade, passando pelas fases de beneficiamento. Assim, os frutos foram imersos em água para a retirada de impurezas e para facilitar o despolpamento foram colocados na água a 50°C, por um período de 30 minutos. Para esterilização dos frutos foi utilizado 35 ppm de cloro ativo, por cerca de 30 minutos, sendo posteriormente retirado por meio da lavagem com água potável. Estas etapas são importantes para evitar a contaminação microbiológica dos frutos (EMBRAPA 2010).

Para extração da polpa foram pesados 100g do fruto e adicionados 50 mL de álcool 70% (proporção fruto: solvente 2:1) acrescido de 0,3g de ácido cítrico, como agente acidulante, a fim de manter o pH < 4,0 que é importante para a estabilização das moléculas de antocianinas (Novello et al. 2015). Em seguida a preparação foi transferida para despulpadeira industrial e homogeneizada durante 4 minutos. A extração foi realizada em triplicata. Finalmente, o extrato hidroalcoólico da polpa do fruto foi liofilizado no Departamento de Zootecnia da UFV e armazenado em frascos âmbar, em freezer a - 20°C. Todo o processo foi realizado com as luzes apagadas devido à fotossensibilidade das antocianinas.

Quantificação das antocianinas totais no extrato de juçara

O conteúdo de antocianinas foi determinado pelo método de absorbância de pH diferencial (Giusti e Wrolstad 2001). A análise foi realizada em triplicata para cada extrato. Em dois béqueres pesaram-se 0,05g de polpa de juçara liofilizada solubilizada em 50 mL de tampão pH=1,0 (cloreto de potássio, 0,025M) e 50 mL de tampão pH= 4,5 (acetato de sódio, 0,4M), obtendo-se fator de diluição de 1000x para as concentrações de 300 e 600 mg/kg e 2000x para a concentração de 900mg/kg. As amostras foram deixadas no ultrassom (Hielscher, Ringwood, New Jersey, USA)

para homogeneização durante 30 minutos. Após este período, as amostras foram filtradas e transferidas para balão volumétrico de 50 mL completando-se com o tampão correspondente. Cada balão volumétrico ficou em repouso durante 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz, sendo então realizadas leituras de absorbância (*Abs*) nos comprimentos de onda 510 nm e 700 nm. A diferença dos valores das absorbâncias em pH= 1,0 e pH= 4,5 é diretamente proporcional à concentração de antocianinas. O cálculo é baseado na cianidina-3-glicosídeo, com massa molecular (MM) de 449,2 g/mol, diluição utilizada (D) e absortividade molar (ϵ) de 26.900 L.mol/cm. Os resultados são expressos como miligramas equivalentes de cianidina 3-glicosídeo por litro de polpa de juçara.

Teor de Antocianinas (mg/L):

$$[(Abs\ 510 - Abs\ 700)_{pH1} - (Abs\ 510 - Abs\ 700)_{pH4,5}] \times MM \times D \times 1000/\epsilon$$

Identificação dos tipos de antocianinas no extrato de juçara

A identificação das antocianinas do extrato de juçara liofilizado foi realizada para amostra referente a 100g de extrato liofilizado. Através da cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), modelo SCL 10AT VP (Shimadzu, Kyoto Japan) utilizou-se as condições propostas por Schauss et al (2006), com adaptações descritas a seguir. As separações foram realizadas usando Phenomenex Gemini RP-18 (5 μ m; 250 x 4,6 mm) com pré-coluna Phenomenex ODS (C18, 5 μ m; 4 x 3 mm). As fases móveis consistiram de 89% de água ultrapura acidificada com ácido fórmico até pH=2,0 e 11% de acetonitrila (fase A), e 100% de acetonitrila (fase B), com fluxo de 1 mL/minuto. A injeção do volume foi de 50 μ L. O tempo de corrida correspondeu a 45 minutos, sendo a leitura feita a 520nm.

O extrato de juçara liofilizado (0,01g) foi ressuscitado em 5 mL de HCl 1%. Como padrão externo utilizaram-se as antocianinas: cianidina -3-O-glucosídeo (Cloreto de curomanina, Sigma-Aldrich) e cianidina - 3-O-rutinosídeo (Keracyanin chloride, Sigma-Aldrich). Estas foram ressuscitadas separadamente em solução de HCl 1% (10 mg do padrão em 5 mL de HCl 1%) e as absortividades molares foram respectivamente 26900 e 28840. A identificação e a quantificação dos tipos de antocianinas basearam-se nas suas características espectrais e tempo de retenção em comparação com os padrões.

Animais

Todos os procedimentos envolvidos no protocolo experimental foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 030/2010. O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Ratos Wistar machos adultos, com 80 dias de idade e 346 ± 34 gramas de peso corporal (PC), foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminação com ciclos claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Todos os animais passaram por um período de aclimação correspondente a 30 dias antes do início do experimento. O período experimental durou 56 dias consecutivos, que corresponde à duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos (Russell et al. 1990).

Tratamentos

Os animais foram pesados e distribuídos em cinco grupos experimentais (n=5) conforme descrito na tabela 1. A preparação das soluções se deu de acordo com o peso corporal do animal (PC). O cloreto de cádmio (CdCl_2 , Fluka/Sigma, St Louis, MO, USA) foi dissolvido em água destilada e aplicado em dose única, via intraperitoneal (IP), no início do tratamento, na dose de 1,2 mg/kg em quatro grupos, enquanto o controle salina (CS) recebeu dose intraperitoneal de 1,2 mg/kg de solução salina. A dose de 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio corresponde a 0,74 mg de cádmio, sendo a menor dosagem capaz de causar alterações significativas nos parâmetros morfométricos e morfológicos dos testículos de ratos Wistar adultos em estudos realizados por Predes et al. (2010) e Cupertino (2012). Após 48 horas foi iniciado o tratamento, via gavagem, com doses crescentes do extrato hidroalcoólico de juçara (300mg/kg, 600mg/kg e 900mg/kg). A dose de 300 mg/kg de EJ foi determinada a partir de dosagens utilizadas em estudos com extratos vegetais (100-500 mg/kg) (Silva et al. 2006; Lourenço et al. 2010). As outras doses corresponderam, respectivamente, ao dobro e três vezes a dose inicial utilizada.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos

Grupos	Tratamentos
CS	1,2 mg/kg de solução salina (dose única IP) + 1,5 mL/dia de água destilada
CdCl ₂	1,2 mg/kg de cloreto de cádmio (CdCl ₂) (dose única IP) + 1,5 mL/dia de água destilada
CdCl ₂ +EJ ₃₀₀	1,2 mg/kg CdCl ₂ (dose única IP) + 1,5 mL/dia de 300 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara (EJ) ¹
CdCl ₂ +EJ ₆₀₀	1,2 mg/kg CdCl ₂ (dose única IP) + 1,5 mL/dia de 600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara (EJ) ²
CdCl ₂ +EJ ₉₀₀	1,2 mg/kg CdCl ₂ (dose única IP) + 1,5 mL/dia de 900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara (EJ) ³

¹ 300mg/kg= 70,1 mg de antocianinas

² 600mg/kg= 119,7 mg de antocianinas

³ 900mg/kg= 133,6 mg de antocianinas

Coleta e preparação histológica

Ao término do período experimental, os animais foram pesados e eutanasiados por inalação de CO₂. O sangue foi coletado através de punção cardíaca, centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm e o soro foi mantido em freezer -80°C para análise de testosterona sérica. Os testículos foram rapidamente removidos e pesados em balança de precisão (BEL Mark 160 classe 2) (0,001g). Para determinar o peso do parênquima do testículo, a albugínea de um dos testículos foi retirada e pesada, descontando seu peso daquele obtido para um testículo inteiro. O testículo direito de cada animal foi fixado em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) para análises histológicas e histoquímicas e para o cálculo do percentual líquido no testículo, enquanto o testículo esquerdo foi primeiramente congelado em nitrogênio líquido e depois mantido em freezer -80°C para as análises de estresse oxidativo. Baseado nos pesos corporais e testiculares foi calculado o índice gonadossomático (IGS) a partir da fórmula: $IGS = PG/PC \times 100$, onde PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal. O IGS corresponde à proporção do peso corporal alocado em testículo (Amann 1970).

Após fixação durante 24 horas, os testículos foram transferidos para álcool 70%, desidratados em série etanólica crescente e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha) usando navalhas de vidro. Para evitar a repetição das análises de uma mesma região, as secções foram obtidas de modo semisseriado respeitando-se intervalos de 40 µm. As secções foram coradas com azul de

toluidina/borato de sódio 1% e hematoxilina - eosina para análises morfológicas e morfométricas. Para análises histoquímicas, fragmentos de testículos foram incluídos em parafina, sendo realizados cortes histológicos semisseriados de 4 µm de espessura. Posteriormente, estas preparações foram coradas pelo método de Picrosirius (Tolosa et al. 2003) para identificação de fibras colágenas e pela técnica de Von Kossa (Carson e Hladik 2009) para detectar deposição de cálcio testicular. As preparações foram montadas com Entellan® (Merck, Frankfurt, Alemanha).

Percentual líquido no testículo

O percentual líquido de água por unidade de peso de tecido testicular (mL/g) foi feita pela relação da massa fresca (100 mg de fragmento testicular fixado em Karnovsky) e a massa seca do órgão (peso úmido - peso seco), sendo a massa seca obtida após secagem do fragmento de testículo em estufa 70°C até atingir peso seco constante (durante 7 dias) (Cupertino 2012).

Análises morfométricas tubulares

Todas as análises morfométricas foram realizadas utilizando-se o software Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Foi projetada uma grade contendo 266 pontos sobre 15 imagens de campos capturados ao acaso em objetiva de 20X (Olympus AX 70 TRF), totalizando 3990 pontos por animal. Foram computados os pontos coincidentes sobre túbulos seminíferos (túnica própria e epitélio seminífero) e intertúbulo e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente. Ponto sobre do lume e a medida da altura de epitélio seminífero não foram analisados, pois os túbulos dos animais dos tratamentos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀ e CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ estavam preenchidos com material amorfo, o que ocasionou a oclusão luminal. O volume dos túbulos seminíferos e do intertúbulo foram estimados a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. O valor deste último foi obtido subtraindo-se o peso de um testículo pelo peso da albugínea de um testículo. Como a densidade do testículo é igual a 1 (Johnson et al. 1981), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. A fim de quantificar o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal, foi calculado o índice tubulossomático (ITS) a partir da fórmula: $ITS = VTS/PC \times 100$, onde VTS = volume de túbulo seminífero e PC = peso corporal. Também foi calculado o índice

parenquimossomático (IPS) com o objetivo de obter o investimento em parênquima testicular em relação à massa corporal. Fórmula IPS = parênquima dos dois testículos/PC x 100.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo. O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos em um testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal a partir da fórmula $CT = VTS/\pi R^2$, onde: VTS= volume de túbulo seminífero e πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

As populações de células germinativas e de células de Sertoli como também os índices que quantificam o processo espermatogênico não foram estimados porque causa da necrose tubular nos grupos tratados.

Análises morfométricas intertubulares

Foram quantificados, por animal, 1000 pontos sobre intertúbulo, utilizando-se uma grade projetada sobre 15 imagens intertubulares capturadas ao acaso em objetiva de 40X (Olympus AX 70 TRF). Foram registrados os pontos coincidentes sobre núcleo (NL) e citoplasma de célula de Leydig (CL), fibras colágenas/fibroblastos (FCF), macrófagos (MC), vasos sanguíneos (VS) e espaço linfático (EL) e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente. O volume de cada elemento no intertúbulo foi determinado a partir do percentual do elemento e o peso do parênquima de um testículo.

Para morfometria das células de Leydig foram medidos diâmetros nucleares de 20 células de Leydig em imagens capturadas com objetiva de 40x, escolhendo-se os núcleos que apresentavam contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. O volume nuclear de Leydig (VNL) foi obtido a partir da fórmula $VNL = 4/3\pi \times R^3$ onde R = raio nuclear. Para cálculo do volume citoplasmático de Leydig (VCL) utilizou-se a fórmula: $VCL = (\%CL \times VNL)/\%NL$, onde CL = percentual de citoplasma de Leydig, VNL = volume nuclear de Leydig e NL = percentual de núcleo de Leydig. O volume celular de Leydig (VL) foi obtido somando-se VNL e VCL. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3). O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo (VLT) foi feito a partir da

fórmula: $(VLT) = (\%CLPPAR \times PPAR) / 100$, onde CLPPAR= percentual de célula de Leydig no parênquima e PPAR= peso do parênquima de um testículo. A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a seguinte fórmula: $ILS = (VLT/PC) \times 100$. Para cálculo do número de células de Leydig (CLT) utilizou a fórmula: $CLT = VLT/VL$, onde VL= volume de célula de Leydig (μm^3).

Análises histopatológicas

Para se estimar as proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos foram contados 200 túbulos por animal em campos aleatórios. As alterações foram classificadas de acordo com as observações realizados por Creasy et al (2012), com adaptações descritas a seguir: TS_0 = túbulo seminífero com epitélio seminífero íntegro; TS_1 = túbulo seminífero necrótico; TS_2 = túbulo seminífero necrótico atrofiado com células inflamatórias (macrófagos).

Para identificação da deposição de cálcio testicular analisaram-se lâminas histológicas coradas pela técnica de Von Kossa. Nesta técnica, a região calcificada aparece em negro como resultado da reação química do reagente (nitrato de prata) com o fosfato de cálcio presente no material analisado. Em objetiva de 4X foram quantificados 200 túbulos seminíferos por animal. Os túbulos seminíferos foram classificados nos seguintes níveis: TSC_0 = túbulo seminífero íntegro e sem calcificação; TSC_1 = túbulo seminífero necrótico sem calcificação. TSC_2 = túbulo seminífero necrótico com menos de 50% do material amorfo calcificado; TSC_3 = túbulo seminífero necrótico com mais de 50% de material amorfo calcificado. Não foi observada deposição de cálcio no intertúbulo.

Para análise de mastócitos, as secções testiculares foram coradas com azul de toluidina. A especificidade deste método baseou-se nas propriedades metacromáticas dos grânulos de mastócitos, que são ricos em porções químicas aniônicas que modificam o azul do corante inicial e adquirem uma cor roxa escura (Kulka e Metcalfe 2010). Em objetiva de 40X foram analisados 15 campos histológicos totalizando uma área de $3,79 \text{ mm}^2$ em microscópio de luz CX40® (Olympus, Tokyo, Japão). O cálculo da densidade de mastócitos foi realizado dividindo-se a quantidade de células pela área amostrada, sendo expressa em número de células por mm^2 .

Os tipos de fibras colágenas foram identificadas pelo método de Picrosirius sob luz polarizada. Uma grade contendo 150 pontos foi projetada sobre 10 imagens

de campos capturados ao acaso, em objetiva de 20X (Olympus AX 70 TRF), totalizando 1500 pontos por animal. A análise foi realizada de acordo com a propriedade de birrefringência das fibras, uma vez que, sob luz polarizada, as fibras de colágeno tipo I (FCI) aparecem em tons de cores brilhantes que vão do vermelho ao amarelo, enquanto que as fibras colágeno tipo III (FCIII) aparecem em verde brilhante. Foram computados os pontos coincidentes sobre os tipos de fibras colágenas e, em seguida, calculados os percentuais. O volume foi calculado a partir do percentual do elemento multiplicado pelo peso do parênquima de um testículo, e o valor obtido dividido por 100.

Enzimas antioxidantes e malondialdeído

Amostras de 200 mg de testículos congelados foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4), centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos. Em seguida foi retirado o sobrenadante para análise da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), bem como a concentração do produto de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) e concentração de proteína total (PRT). As análises foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia do Departamento de Biologia Animal da UFV.

Inicialmente foi mensurada a concentração de proteína total do testículo de acordo com Lowry et al (1951), utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão. Este dado foi usado na conversão da unidade de medida da atividade das enzimas SOD, CAT e para MDA em miligrama de proteína por grama de tecido testicular.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60 s (Aebi et al. 1984). A atividade da CAT foi expressa em U CAT/ mg prt. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa a 570 nm (Dieterich et al. 2000), baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- em peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. A atividade da SOD foi expressa em U SOD/ mg prt.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340 nm por 60 s. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não-enzimática, sendo

acelerada pela atividade da enzima GST. Uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1 mol do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDNB $340 = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos (Habig et al. 1976). A atividade da GST foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Para determinação dos metabólitos da ação de espécies oxidantes (indicativo da peroxidação lipídica) foi feita a mensuração da concentração de malondialdeído (MDA) nas amostras de tecido homogeneizadas em tampão fosfato (pH 7,4). O sobrenadante foi centrifugado (10000 g por 10 min), adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15% e 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCL 0,25 N) em banho-maria por 15 minutos, resfriado, centrifugado a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante mensurado em espectrofotômetro a 535 nm (Buege e Aust 1978). Os cálculos foram feitos utilizando-se o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^{-5} \text{ M cm}^{-1}$. A concentração do MDA foi expressa em nmol/mg prt.

Testosterona sérica

A concentração plasmática de testosterona foi obtida pelo método de quimioluminescência, utilizando-se kit Access® Testosterone (Beckman,USA). As leituras foram realizadas em aparelho Access II (Beckman, USA) e os resultados foram expressos em ng/dL.

Análise estatística

Utilizou-se o programa GraphPad Prism 6.01 para realizar análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK) para comparar médias entre os grupos experimentais. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Quantificação e identificação de antocianinas

O conteúdo de antocianinas totais encontrado na polpa de *E. edulis* foi de 2348 mg por 100 g de polpa de juçara. As dosagens de 300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg de extrato de juçara (EJ) apresentaram, respectivamente, 70 mg, 119 mg e 133 mg de antocianinas totais. Para os dois tipos de antocianinas, cianidina 3-O-

glucosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo foram encontrados, respectivamente, 988 mg/100g e 1103 mg/100g de polpa de juçara.

Dados biométricos

Não houve diferença significativa para peso corporal inicial (PCI), peso corporal final (PCF) e peso de albugínea testicular (PAT) dos animais dos grupos expostos ao cádmio, com e sem a oferta do EJ, quando comparados ao grupo controle. Quanto ao peso testicular (PT), peso do parênquima (PPAR), índice gonadossomático (IGS), índice parenquimossomático (IPS) e percentual líquido (PL) foi observada redução em todos os grupos em relação ao controle, considerando que nos grupos CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ os valores de PT e PPAR foram menores que os valores do grupo CdCl₂ (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros biométricos corporais, testiculares e índices, gonadossomático e parenquimossomático, de ratos Wistar adultos dos grupos controle e expostos ao CdCl₂, associados ou não a diferentes dosagens de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	CdCl ₂	CdCl ₂ +EJ ₃₀₀	CdCl ₂ +EJ ₆₀₀	CdCl ₂ +EJ ₉₀₀
PCI _(g)	365±25,6 ^a	335±23,9 ^a	346±28,9 ^a	342±28,8 ^a	351±46,3 ^a
PCF _(g)	396±57,6 ^a	433±33,1 ^a	384,7±37,3 ^a	383±34,3 ^a	359±53,6 ^a
PAT _(g)	0,04±0,004 ^a	0,06±0,02 ^a	0,06±0,04 ^a	0,06±0,02 ^a	0,05±0,02 ^a
PT _(g)	1,51±0,10 ^a	0,61±0,02 ^b	0,51±0,01 ^c	0,43±0,02 ^c	0,42±0,03 ^c
PPAR _(g)	1,46±0,09 ^a	0,55±0,02 ^b	0,45±0,01 ^c	0,37±0,02 ^c	0,37±0,02 ^c
IGS (%)	0,76±0,11 ^a	0,28±0,12 ^b	0,27±0,10 ^b	0,22±0,02 ^b	0,23±0,03 ^b
IPS (%)	0,73±0,09 ^a	0,25±0,11 ^b	0,23±0,08 ^b	0,19±0,02 ^b	0,20±0,01 ^b
PL (%)	79±0,05 ^a	63±0,06 ^b	69±0,06 ^b	72±0,01 ^b	69±0,02 ^b

CS=controle salina; CdCl₂= 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio; CdCl₂+EJ₃₀₀= CdCl₂+ 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₆₀₀= CdCl₂+600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₉₀₀= CdCl₂+900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. PCI= peso corporal inicial; PCF= peso corporal final; PAT= peso da albugínea referente a um testículo; PT= peso referente a um testículo; PPAR= peso do parênquima referente a um testículo; IGS= índice gonadossomático; IPS= índice parenquimossomático. PL= percentual líquido no testículo. Dados expressos como média±dp. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

Morfometria e histopatologia tubular

O percentual de túbulo seminífero (TS) e volume de túnica própria (VTP) nos grupos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ não diferiu em relação ao grupo controle. Porém, o índice tubulossomático (ITS), o volume de túbulo seminífero (VTS), o diâmetro de túbulo seminífero (DT) e o comprimento de túbulo seminífero (CT) nestes grupos reduziram quando comparados ao grupo controle. Sendo que os valores de VTS e CT dos grupos CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ foram inferiores quando comparados aos do grupo CdCl₂ e CdCl₂+EJ₃₀₀ (Tabela 3). Quanto ao percentual de túnica própria (TP), os grupos expostos ao CdCl₂, associados ou não ao EJ, apresentaram aumento significativo quando comparado ao grupo controle (Figura 1; Figura 4), sendo os maiores valores encontrados nos grupos CdCl₂ e CdCl₂+EJ₃₀₀ (Tabela 3).

O grupo controle manteve-se com as características morfológicas tubulares dentro dos padrões normais (TS₀) (Tabela 3; Figura 1). No grupo exposto ao Cd 78,9% dos TS sofreram necrose do epitélio seminífero (TS₁) e 21,1% dos TS além eram necróticos e atrofiados e continham dentro e ao seu redor células inflamatórias (macrófagos)(TS₂). Proporções semelhantes foram observadas nos animais dos grupos CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ (Tabela 3; Figura 1).

Foi possível observar deposição de cálcio nos testículos dos animais dos grupos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ por meio da técnica de Von Kossa. Nestes grupos, cerca de 19% dos TS necróticos não apresentavam calcificação (TSC₁), 25% dos TS necróticos possuíam menos de 50% do material amorfo calcificado (TSC₂), 56% dos TS necróticos possuíam mais de 50% do material amorfo calcificado (TSC₃). O grupo controle apresentou TS íntegro e sem calcificação (TSC₀) (Tabela 3; Figura 2).

Tabela 3. Parâmetros tubulares e histopatológicos do testículo de ratos Wistar adultos dos grupos controle e expostos ao CdCl₂, associados ou não a diferentes dosagens de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	CdCl ₂	CdCl ₂ +EJ ₃₀₀	CdCl ₂ +EJ ₆₀₀	CdCl ₂ +EJ ₉₀₀
TS (%)	88,27±0,87 ^a	75,10±8,11 ^a	82,19±6,38 ^a	73,37±11,3 ^a	78,98±12,3 ^a
ITS _(%)	0,33±0,05 ^a	0,09±0,001 ^b	0,10 ±0,01 ^b	0,07 ±0,02 ^b	0,08 ±0,02 ^b
TP _(%)	1,02±0,53 ^a	3,57±0,51 ^b	3,01±0,77 ^{bc}	2,20±0,41 ^c	2,27±0,31 ^c
VTS _(mL)	1,29±0,09 ^a	0,41±0,03 ^b	0,37±0,06 ^b	0,28±0,08 ^c	0,29±0,05 ^c
VTP _(mL)	0,01±0,01 ^a	0,02±0,003 ^a	0,01±0,003 ^a	0,01±0,001 ^a	0,01±0,002 ^a
DT _(µm)	296,9±12,9 ^a	207,0±20,9 ^b	216,1±7,36 ^b	204,6±10,4 ^b	207,5±10,6 ^b
CT _(x10⁶)	18,69±0,76 ^a	12,39±3,01 ^b	10,10±1,32 ^b	8,36±2,31 ^c	8,70±1,75 ^c
TS _{0(%)}	100±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
TS _{1(%)}	0,00±0,00 ^a	78,9±5,86 ^b	74,2±8,14 ^b	75,1±10,16 ^b	78,0±16,8 ^b
TS _{2(%)}	0,00±0,00 ^a	21,1±6,61 ^b	25,8±6,52 ^b	24,9±8,71 ^b	22,0±9,06 ^b
TSC _{0(%)}	100±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
TSC _{1(%)}	100±0,00 ^a	18,2±3,90 ^b	20,1±5,91 ^b	17,9±7,52 ^b	18,9±5,90 ^b
TSC _{2(%)}	0,00±0,00 ^a	25,6±7,30 ^b	22,3±8,53 ^b	25,1±8,37 ^b	27,1±10,2 ^b
TSC _{3(%)}	0,00±0,00 ^a	56,2±10,3 ^b	57,6±8,35 ^b	57,0±7,03 ^b	54,0±8,96 ^b

CS=controle salina; CdCl₂= 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio; CdCl₂+EJ₃₀₀= CdCl₂+ 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₆₀₀= CdCl₂+600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₉₀₀= CdCl₂+900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. TS= percentual de túbulo seminífero; ITS= índice tubulossomático; TP= percentual de túnica própria; VTS= volume de túbulo seminífero; VTP= volume de túnica própria; DT= diâmetro de túbulo seminífero; CT= comprimento total de túbulo seminífero (X10⁶). TS₀ = percentual de túbulo seminífero com epitélio íntegro; TS₁ = percentual de túbulo seminífero necrótico; TS₂ = percentual de túbulo seminífero necrótico e atrofiado com células inflamatórias (macrófagos); TSC₀= percentual de túbulo seminífero íntegro e sem calcificação; TSC₁ = percentual de túbulo seminífero necrótico sem calcificação; TSC₂ =percentual de túbulo seminífero com menos de 50% do material amorfo calcificado; TSC₃= percentual de túbulo seminífero com mais de 50% do material amorfo calcificado. Dados expressos como média±dp. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

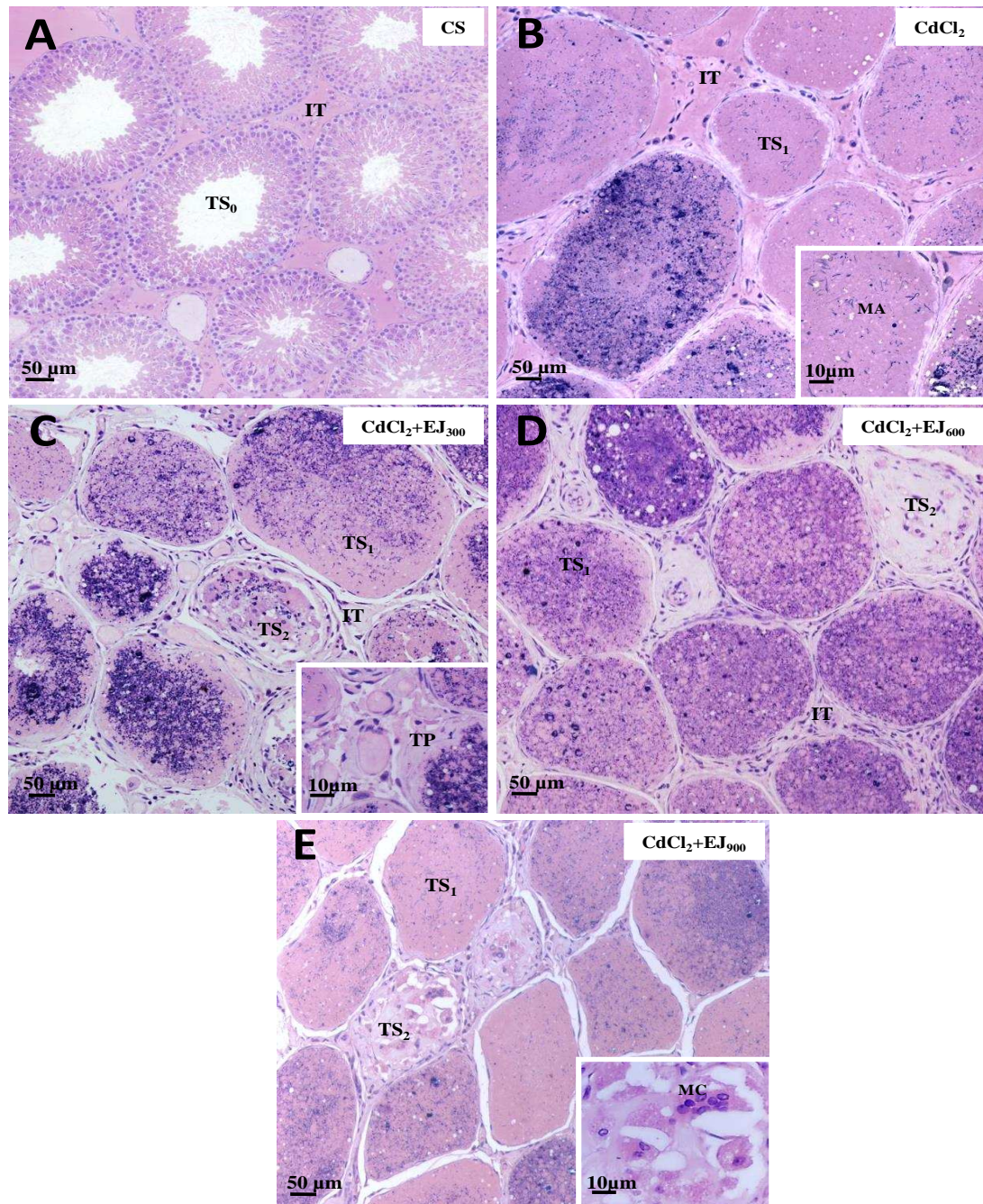


Figura 1. Fotomicrografias de secções do testículo de ratos Wistar adultos mostrando túbulo seminífero com epitélio seminífero íntegro (TS₀) no grupo controle (A), túbulo seminífero necrótico (TS₁) e túbulo seminífero necrótico atrofiado com células inflamatórias (TS₂) nos grupos expostos ao cádmio, independente da oferta do extrato de juçara (EJ) (B-E). Nestes grupos os túbulos seminíferos necróticos eram preenchidos com material amorfo (detalhe em B), apresentaram aumento de túnica própria (detalhe em C) e reação inflamatória no TS₂, podendo ser visualizada a formação de células gigantes multinucleadas pelos macrófagos (detalhe em E). TS: túbulo seminífero; IT: intertúbulo; MA: material amorfo; TP: túnica própria; MC: macrófago. Coloração: Hematoxilina-eosina e azul de toluidina.

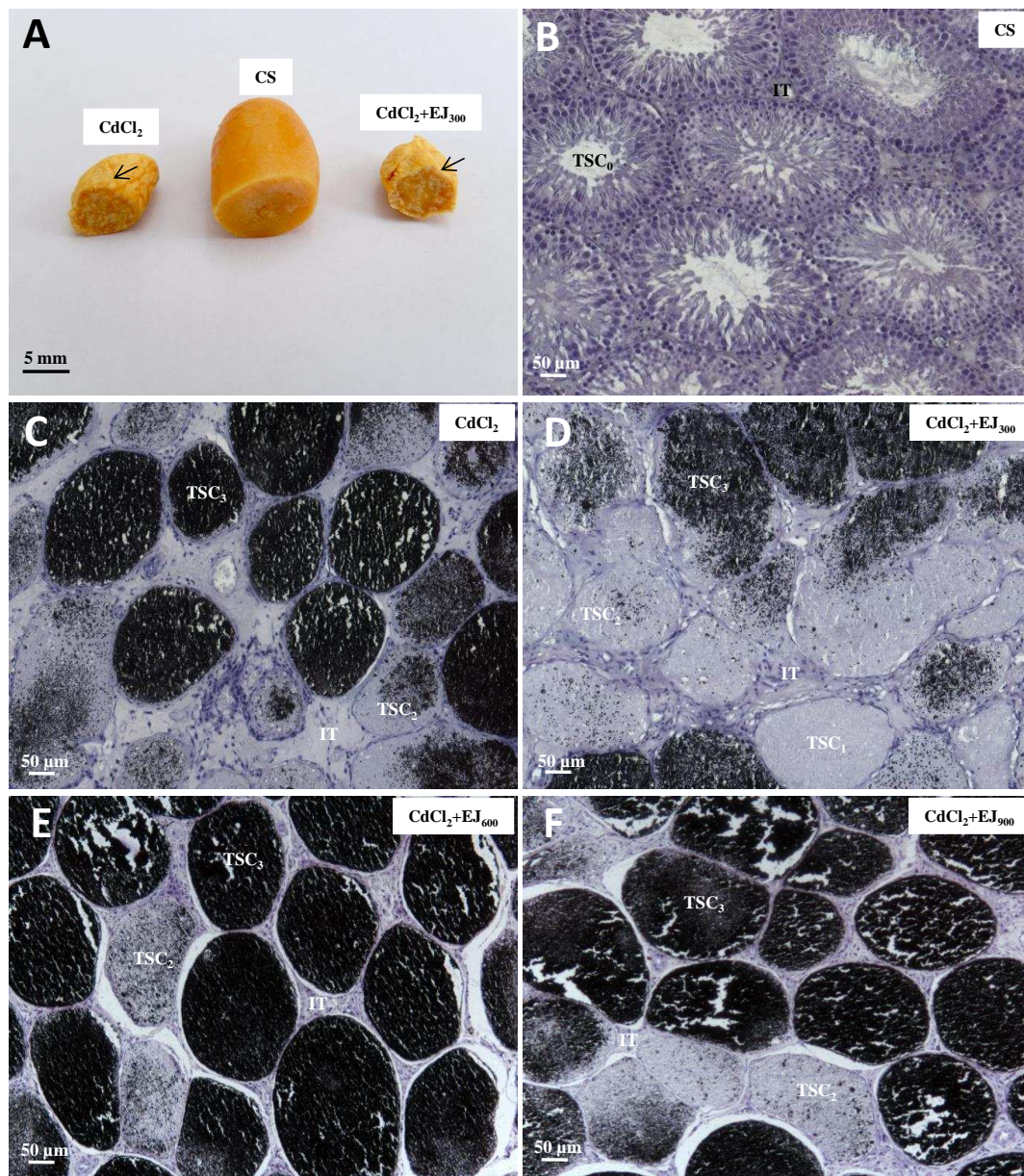


Figura 2. Morfologia externa e fotomicrografias de secções do testículo de ratos Wistar adultos evidenciando a deposição de cálcio (marcação em preto). A morfologia externa ilustra a redução do peso testicular e depósito de cálcio (marcação em preto) nos grupos expostos ao cádmio, independente da oferta do extrato de juçara (EJ) (A). Túbulo seminífero íntegro e sem calcificação (TSC₀) foi observado no grupo controle (B), túbulo seminífero necrótico sem calcificação (TSC₁), túbulo seminífero necrótico com menos de 50% do material amorfo calcificado (TSC₂) e túbulo seminífero necrótico com mais 50% do material amorfo calcificado (TSC₃) foram observados nos grupos expostos ao cádmio com e sem a oferta do EJ (C-F). TS: túbulo seminífero; IT: intertúbulo. Coloração: técnica de Von Kossa.

Morfometria e histopatologia intertubular

Para percentual de intertúbulo (IT) houve aumento em todos os grupos expostos ao CdCl₂, com oferta ou não do extrato de juçara. Por outro lado, o volume de IT (VIT) nestes grupos foi menor em relação ao controle (Tabela 4). Os grupos CdCl₂ e CdCl₂/EJ₆₀₀ apresentaram maiores percentuais de IT quando comparados aos grupos CdCl₂/EJ₃₀₀ e CdCl₂/EJ₉₀₀. Contudo, o VIT foi menor nos grupos CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ quando comparado ao grupo CdCl₂ (Tabela 4).

O percentual e o volume de fibras colágenas/fibroblastos (FCF) dos animais expostos ao CdCl₂, com ou sem a oferta do EJ aumentaram significativamente em relação ao controle (Figura 3). No entanto, o volume de fibras colágenas/fibroblastos (VFCF) dos grupos CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ foi menor que o VFCF do grupo CdCl₂ (Tabela 4). O percentual de vasos sanguíneos (VS) não apresentou diferença significativa dos grupos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ quando comparado ao controle, porém o seu volume (VVS) reduziu em todos os tratamentos. Ainda em relação ao VS, foram observados capilares com lume preenchido com hemácias densamente compactadas (Figuras 3B; 3C; 3E) e aumento de colágeno na parede de arteríolas (Figura 3D). Para espaço linfático (EL) e macrófago (MC) tanto o percentual quanto do volume, reduziu nos grupos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ em relação ao controle (Tabela 4).

Através da análise histopatológica foi observada presença de mastócitos (MT) no intertúbulo dos grupos expostos ao CdCl₂, independente da oferta do EJ (Figura 3B; 3E). Não houve diferença significativa na densidade MT entre estes grupos (Tabela 4). No grupo controle, por sua vez, não foi verificada presença de MT no intertúbulo (Tabela 4; Figura 3A). O aumento de fibras colágenas/fibroblasto (FCF) nos grupos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ foi evidenciado pelo método de Picosirius em luz polarizada (Figura 4), sendo identificadas fibras colágenas do tipo I (FCI). Não houve diferença significativa do percentual e volume de FCI entre os grupos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros intertubulares e histopatológicos do testículo de ratos Wistar adultos dos grupos controle e expostos ao CdCl₂, associados ou não a diferentes dosagens de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	CdCl ₂	CdCl ₂ +EJ ₃₀₀	CdCl ₂ +EJ ₆₀₀	CdCl ₂ +EJ ₉₀₀
IT _(%)	11,73±0,87 ^a	24,90±3,11 ^b	17,81±1,64 ^c	26,63±3,27 ^b	21,02±7,85 ^c
FCF _(%)	3,82±2,49 ^a	39,76±5,40 ^b	45,66±6,27 ^b	42,36±7,23 ^b	38,68±5,38 ^b
VS _(%)	10,39±1,90 ^a	15,60±6,43 ^a	11,55±5,37 ^a	12,35±3,71 ^a	13,50±1,52 ^a
EL _(%)	26,95±4,47 ^a	22,20±7,43 ^b	19,61±7,19 ^b	19,20±7,05 ^b	23,81±3,09 ^b
MC _(%)	10,43±2,41 ^a	4,80±1,79 ^b	5,18±1,83 ^b	5,91±3,51 ^b	5,50±3,78 ^b
VIT _(mL)	0,17 ±0,02 ^a	0,13 ±0,02 ^b	0,08 ±0,01 ^c	0,10 ±0,01 ^c	0,08 ±0,05 ^c
VFCF _(mL)	0,06±0,04 ^a	0,22±0,06 ^b	0,20±0,03 ^{bc}	0,16±0,04 ^c	0,15±0,04 ^c
VVS _(mL)	0,15±0,03 ^a	0,08±0,03 ^b	0,05±0,03 ^b	0,05±0,02 ^b	0,05±0,01 ^b
VEL _(mL)	0,39±0,06 ^a	0,12±0,03 ^b	0,09±0,03 ^b	0,07±0,02 ^b	0,09±0,01 ^b
VMC _(mL)	0,15±0,04 ^a	0,03±0,01 ^b	0,02±0,01 ^b	0,02±0,01 ^b	0,02±0,01 ^b
DMT _(mm²)	0,00±0,00 ^a	1,28±0,77 ^b	1,14±0,27 ^b	1,12±0,61 ^b	1,39±0,17 ^b
FCI _(%)	0,99±0,19 ^a	7,57±3,82 ^b	8,32±4,53 ^b	8,83±0,70 ^b	9,00±0,82 ^b
VFCI _(mL)	0,01±0,001 ^a	0,04±0,02 ^b	0,04±0,02 ^b	0,03±0,01 ^b	0,03±0,01 ^b

CS=controle salina; CdCl₂= 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio; CdCl₂+EJ₃₀₀= CdCl₂+ 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₆₀₀= CdCl₂+600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₉₀₀= CdCl₂+900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. IT= percentual de intertúbulo; FCF = percentual de fibras colágenas/fibroblasto; VS= percentual de vaso sanguíneo; EL = percentual de espaço linfático; MC= percentual de macrófagos; VIT= volume de intertúbulo; VFCF = volume de fibras colágenas/fibroblasto; VVS= volume de vaso sanguíneo; VEL = volume de espaço linfático; VMC= volume de macrófagos. DMT= número de mastócitos por mm²; FCI= percentual de fibras colágenas tipo I; VFCI=volume de fibras colágenas tipo I. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

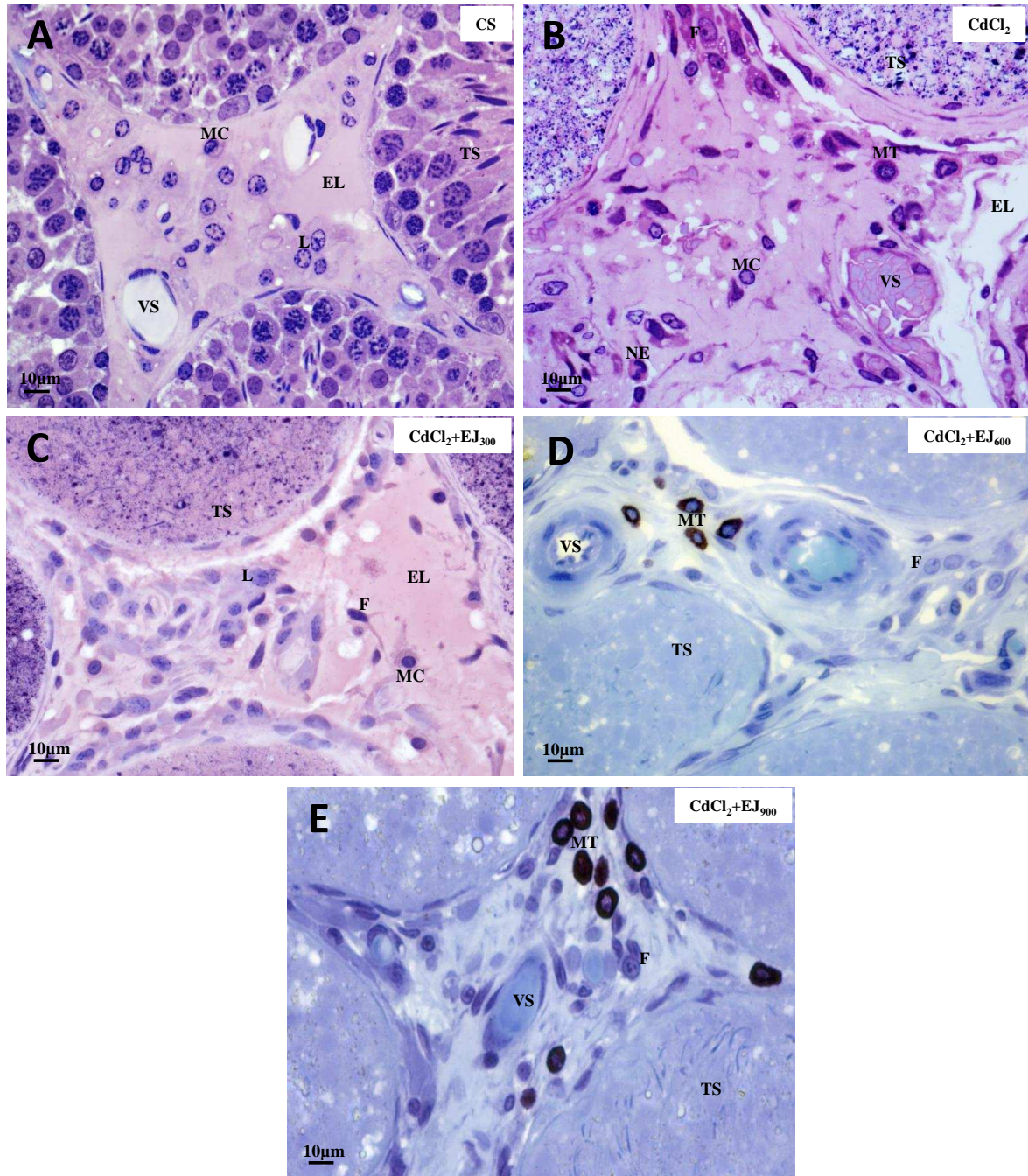


Figura 3. Fotomicrografias de secções do compartimento intertubular do testículo de ratos Wistar adultos, mostrando a integridade do intertúbulo de animais controle (A) e presença de mastócitos, aumento de fibras colágenas, vasos sanguíneos com aglutinação eritrocitária e com deposição de colágeno nos grupos expostos ao cádmio, independente da oferta do extrato de juçara (EJ) (B-E). TS: túbulo seminífero; L: célula de Leydig; MC: macrófago; F: fibroblasto; MT: mastócito; NE: neutrófilo; EL: espaço linfático; VS: vaso sanguíneo. Coloração: Hematoxilina-eosina e azul de toluidina.

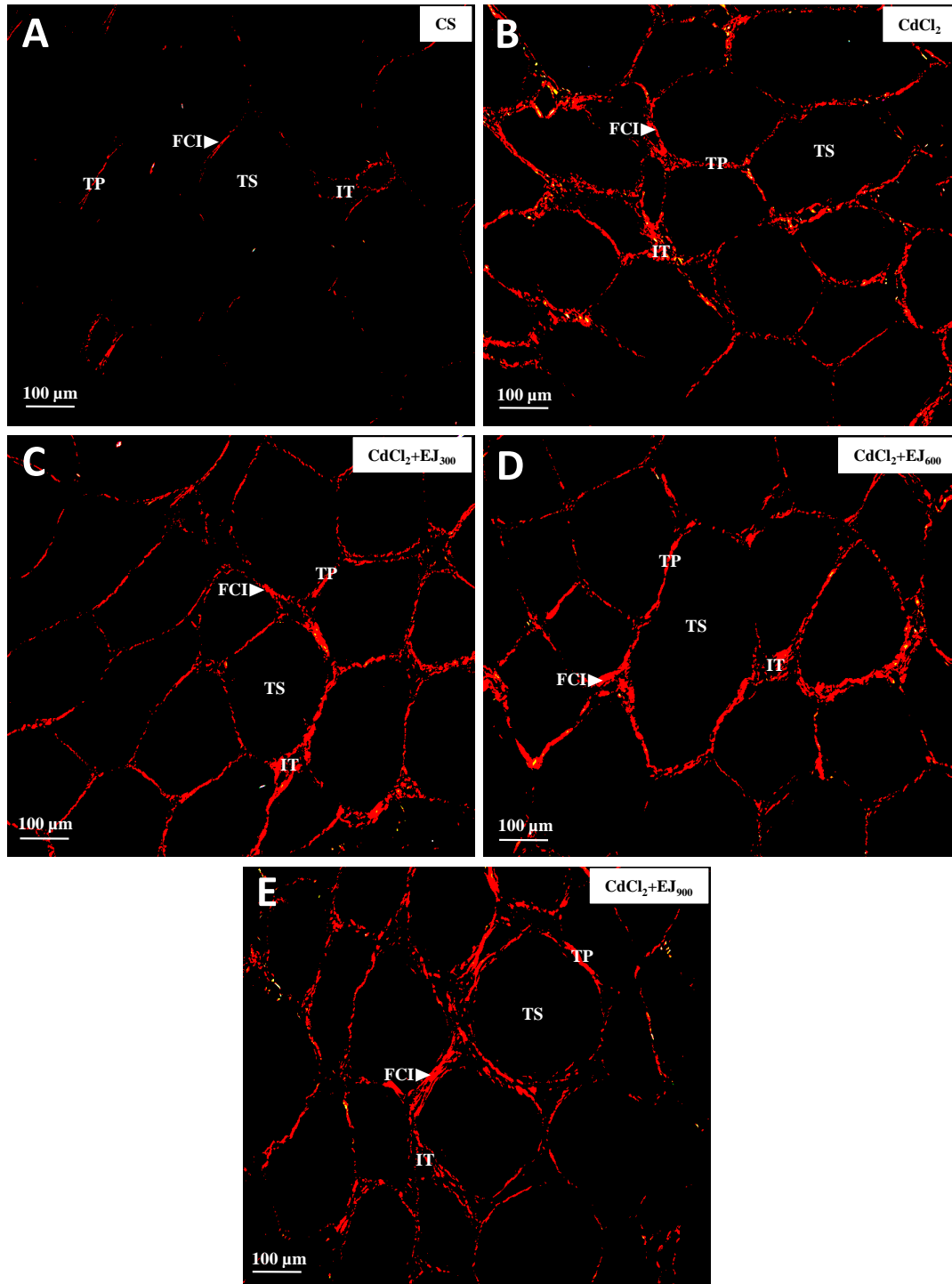


Figura 4. Fotomicrografias de secções do testículo de ratos Wistar adultos mostrando fibras colágenas do tipo I (em vermelho) em menor quantidade no grupo controle (A) e aumento de fibras colágenas do tipo I no intertúbulo e túnica própria dos grupos expostos ao cádmio, independente da oferta do extrato de juçara (EJ) (B-D). TS: túbulo seminífero; FCI: fibras colágenas tipo I; IT: intertúbulo; TP: túnica própria. Coloração: método de Picro sirius na luz polarizada.

Em relação aos dados morfométricos das células de Leydig, foram observadas reduções nos percentuais e volumes do citoplasma (CL), núcleo (NL) e no total de células de Leydig (L) nos grupos tratados em relação ao controle (Tabela 5). Houve ainda redução do índice Leydigossomático (ILS), do volume de células de Leydig por testículo (VLT), do diâmetro do núcleo das células de Leydig (DNL) e do número de células de Leydig por testículo (CLT) nos grupos tratados em relação ao controle. Contudo, os grupos CdCl₂/EJ₃₀₀ e CdCl₂/EJ₉₀₀ apresentaram menor CLT quando comparados ao grupo CdCl₂, não diferindo do grupo CdCl₂/EJ₆₀₀ (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros estereológicos das células de Leydig de ratos Wistar adultos dos grupos controle e expostos ao CdCl₂, associados ou não a diferentes dosagens de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius).

	CS	CdCl ₂	CdCl ₂ +EJ ₃₀₀	CdCl ₂ +EJ ₆₀₀	CdCl ₂ +EJ ₉₀₀
CL _(%)	39,16±6,50 ^a	13,40±3,36 ^b	13,74±4,90 ^b	14,58±2,51 ^b	13,25±0,88 ^b
NL _(%)	9,25±0,42 ^a	4,24±0,51 ^b	4,27±1,02 ^b	5,60±2,07 ^b	5,26±0,78 ^b
L _(%)	48,41±6,56 ^a	17,64±3,40 ^b	18,01±5,21 ^b	20,18±3,57 ^b	18,51±0,71 ^b
ILS _(%)	0,02±0,01 ^a	0,01±0,001 ^b	0,004±0,001 ^b	0,01±0,001 ^b	0,004±0,001 ^b
VCL _(μm³)	562,6±96 ^a	220,26±79 ^b	261,8±93 ^b	202,2±40 ^b	179,11±35 ^b
VNL _(μm³)	133,3±13 ^a	68,16±3,33 ^b	79,89±17 ^b	74,51±12 ^b	69,55±4,16 ^b
VL _(μm³)	695,9±99 ^a	288,4±82 ^b	341,7±99 ^b	276,9±32 ^b	248,7±35 ^b
VLT _(mL)	0,08±0,01 ^a	0,02±0,004 ^b	0,01±0,001 ^b	0,02±0,002 ^b	0,01±0,001 ^b
CLT _(x10⁶)	119,8±15 ^a	82,34±19 ^b	44,37±17 ^c	69,88±11 ^{bc}	59,76±28 ^c
DNL _(μm)	6,33±0,21 ^a	5,07±0,08 ^b	5,33±0,35 ^b	5,21±0,27 ^b	5,10±0,10 ^b

CS=controle salina; CdCl₂= 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio; CdCl₂+EJ₃₀₀= CdCl₂+ 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₆₀₀= CdCl₂+600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₉₀₀= CdCl₂+900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. CL= percentual de citoplasma de Leydig; NL = percentual de núcleo de Leydig; L= percentual de célula de Leydig; ILS = Índice Leydigossomático; VCL= volume de citoplasma de Leydig; VNL = volume de núcleo de Leydig; VL= volume de células de Leydig; VLT = volume de célula de Leydig por testículo; CLT (x10⁶)= número de célula de Leydig por testículo; DNL = diâmetro do núcleo da célula de Leydig. Dados expressos como média±dp. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

Enzimas antioxidantes e malondialdeído

Para atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foi observado aumento nos grupos tratados em relação ao controle. Contudo, a atividade de SOD nos grupos CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ foi maior que no grupo que recebeu somente CdCl₂ (Figura 5A). Para CAT, os grupos CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ apresentaram maiores valores quando comparado aos dos grupos CdCl₂ e CdCl₂+EJ₃₀₀ (Figura 5B). Quanto à atividade da glutationa-S-transferase (GST), não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5C). Para malondialdeído (MDA), produto de peroxidação lipídica, foi observado aumento nos grupos tratados em relação ao controle (Figura 5D).

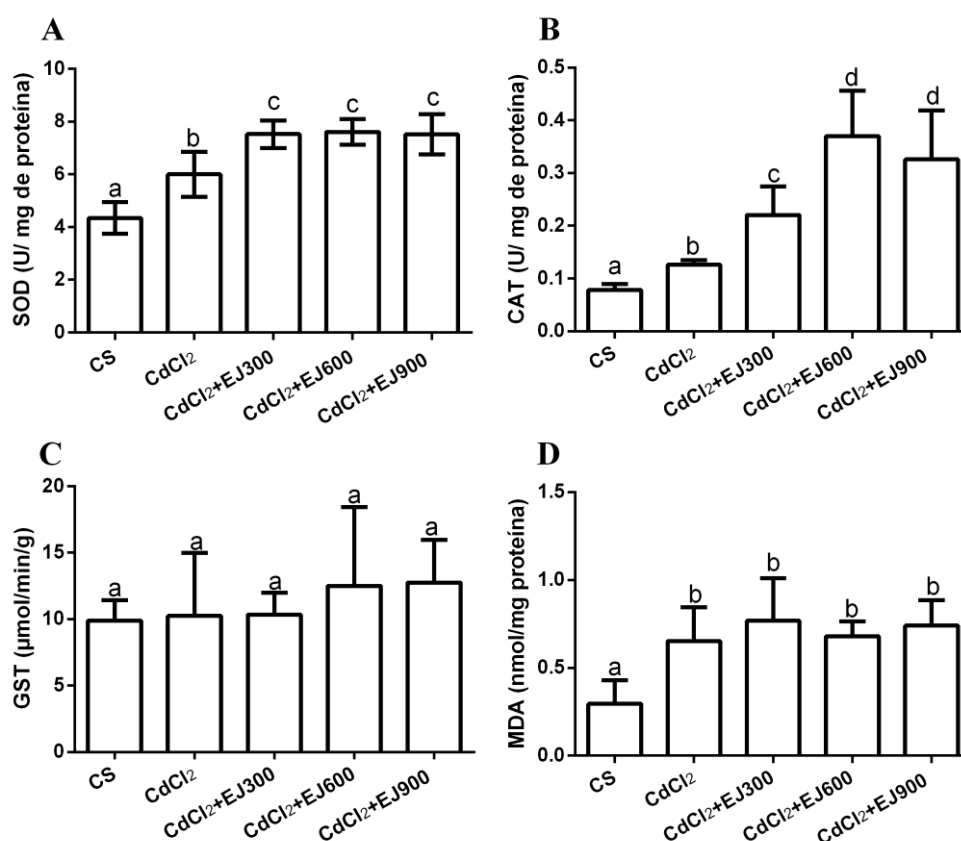


Figura 5. Atividade de enzimas antioxidantes e produto de peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA) no tecido testicular de ratos Wistar. A= superóxido dismutase (SOD), B= catalase (CAT), C= glutationa-S-transferase (GST), D= produto de peroxidação lipídica (MDA). CS=controle salina; CdCl₂= 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio; CdCl₂+EJ₃₀₀= CdCl₂+ 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₆₀₀= CdCl₂+600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₉₀₀= CdCl₂+900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (p ≤ 0,05).

Testosterona sérica

Houve redução dos níveis de testosterona sérica em todos os grupos que receberam Cd, independente de terem sido tratados com EJ. Contudo, o grupo CdCl₂+EJ₃₀₀ obteve menor valor quando comparado aos demais grupos (Figura 6).

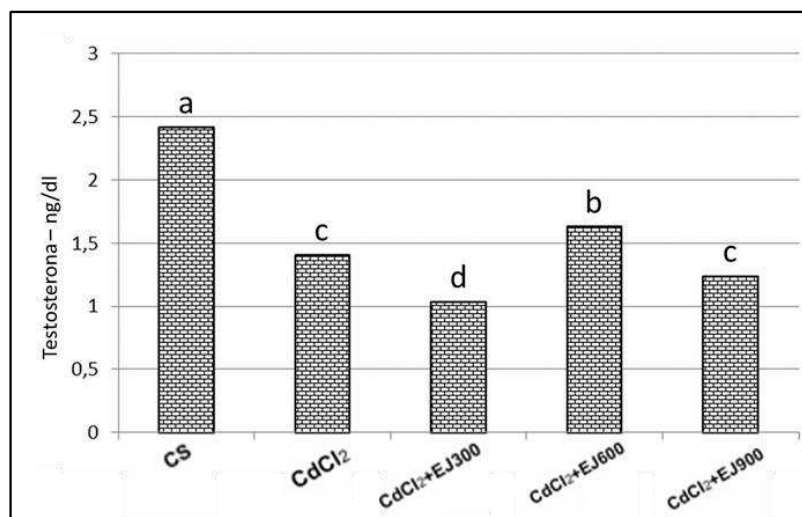


Figura 6. Níveis de testosterona sérica em ratos Wistar adultos dos grupos controle e expostos ao CdCl₂, associados ou não a diferentes dosagens de extrato de juçara (EJ) (*Euterpe edulis* Martius). CS=controle salina; CdCl₂= 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio; CdCl₂+EJ₃₀₀= CdCl₂+ 300mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₆₀₀= CdCl₂+600 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara; CdCl₂+EJ₉₀₀= CdCl₂+900 mg/kg de extrato hidroalcoólico de juçara. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

Estudos têm mostrado que extratos vegetais com propriedades antioxidantes podem ser uma alternativa na proteção ou atenuação contra os danos oxidativos e morfológicos induzidos pela exposição ao cádmio (Cd) (Pires et al. 2013; Arafa et al. 2014; Sönmez e Tascioglu 2015). O extrato hidroalcoólico de juçara (EJ) apresenta alto conteúdo de antocianinas, um dos polifenóis mais abundantes nas frutas e vegetais, e que possui propriedades antioxidante e anti-inflamatória (He e Giusti 2010; Sant'Ana 2014; Novello et al. 2015). Neste estudo, os rendimentos de extração das antocianinas cianidina 3-O-glucosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo do EJ foram similares aos encontrados por Brito et al (2007) e Novello et al (2015). De acordo com Brito et al (2007), as cianidina 3-O-glucosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo correspondem a 90% dos tipos de antocianinas presentes no EJ. Estudos

preliminares, em nosso laboratório, mostraram que a administração das doses 300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg do EJ durante 56 dias não causou danos testiculares em ratos Wistar. Sant'Ana (2014) e Novello et al (2015), avaliando outros órgãos, tais como rim e fígado, também não encontraram efeitos tóxicos do EJ. Com isto, o uso do EJ foi considerado seguro uma vez que não alterou parâmetros biométricos e histológicos testiculares que indicassem comprometimento do processo espermatogênico.

O parênquima testicular de mamíferos eutérios sexualmente maduros é composto por 70 a 90% de túbulos seminíferos e, deste modo, o peso testicular pode fornecer diagnóstico inicial de danos ao processo espermatogênico causados por agentes tóxicos (Russell et al. 1990), como o Cd. Neste estudo, os animais do grupo CdCl₂ apresentaram redução do peso testicular (PT), do parênquima testicular (PPAR) e do índice gonadossomático (IGS) como consequência da redução de maior parte dos parâmetros tubulares. Junto a estas alterações, houve aumento da peroxidação lipídica (MDA) e aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), embora a atividade da glutathione S-transferase (GST) tenha sido semelhante à do grupo controle. Estes dados estão de acordo com os encontrados na literatura, onde as atividades de CAT, SOD e GST são mantidas ou aumentadas, em baixas concentrações de Cd (Pires et al. 2013), enquanto que altas dosagens e a exposição frequente ao Cd inibem estas enzimas no tecido testicular (Arafa et al. 2014). Em conjunto, estas alterações mostraram que a exposição ao Cd causou danos no tecido testicular provavelmente pela indução do aumento de espécies reativas de oxigênio, comprovado pelo aumento de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica e pelo aumento das enzimas antioxidantes endógenas CAT e SOD.

Todavia, os animais dos grupos que receberam diferentes doses do EJ após a exposição ao Cd não apresentaram atenuação dos danos teciduais citados anteriormente. Os grupos CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ alcançaram menores valores de PT, PPAR e dos parâmetros tubulares como volume de túbulo seminífero (VTS) e comprimento total de túbulo seminífero (CT), e maior atividade de SOD e de CAT quando comparados ao grupo CdCl₂. Considerando as propriedades antioxidantes atribuídas ao EJ, este aumento da atividade das enzimas SOD e CAT não era esperado,. Em trabalhos com camundongos-modelo para estudo da aterosclerose foi observada redução da atividade das enzimas SOD e CAT

hepáticas, sugerindo-se que a atividade enzimática foi suprimida pela presença de antioxidantes do extrato de juçara (Novello et al. 2015). Pesquisas tem mostrado que os polifenóis, como as antocianinas, podem ter ação antioxidante direta através da captura de espécies reativas de oxigênio, ou indireta por inibirem a ativação do fator de transcrição nuclear, NF- κ B, o que reduziria os níveis de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão, atenuando o estresse oxidativo (Lee et al. 2013). Deste modo, independente das propriedades antioxidantes do EJ, sua administração, nas dosagens e formas utilizadas, não atenuou os danos teciduais.

É provável que o uso do EJ após a exposição ao Cd tenha, até mesmo, agravado os danos testiculares. Existe a possibilidade que polifenóis atuem como pró-oxidantes, sob certas condições, como em altas doses ou na presença de íons metálicos (Yordi et al. 2012; Eghbaliferiz e Iranshahi 2016). Já foi demonstrado que polifenóis formam um complexo com cobre (Cu) ou ferro (Fe), reduzindo-os e, ao mesmo tempo, formando uma ou mais espécies oxidadas de polifenóis. Estes metais no estado reduzido formam radical hidroxila via reação de Fenton, enquanto as espécies oxidadas de polifenóis, na presença de oxigênio, podem formar radical superóxido. Este último pode reagir com outra molécula intacta de polifenol e formar peróxido de hidrogênio (Li e Trush 1995; Yamanaka et al. 1997; Ahmad et al. 2000; Sakihama et al. 2002; Eghbaliferiz e Iranshahi 2016). Satué-Gracia et al (1997) demonstraram que as antocianinas, delphinidina e cianidina, têm propriedades pró-oxidantes em lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDL) e estruturas de lecitina-lipossoma, quando se utiliza cobre como catalisador. Considerando que íons metálicos como Cu e Fe ficam livres devido à ocupação do Cd nos seus sítios ativos em enzimas e proteínas (Maret e Moulis 2013), é possível inferir que o EJ tenha exercido efeito pró-oxidativo devido às interações das antocianinas com metais essenciais livres, agravando os danos testiculares. Além disto, as duas maiores doses do EJ podem ter exacerbado este quadro como bem observado na piora de alguns parâmetros nos grupos CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀.

Em ratos, os túbulos seminíferos são envolvidos pela túnica própria, que consiste de células mióides ou peritubulares, membrana basal e fibras colágenas (Russell et al. 1990). Neste estudo, houve aumento do percentual de TP nos grupos tratados em relação ao grupo controle, sendo que nos grupos CdCl₂ e CdCl₂+EJ₃₀₀, o percentual foi maior quando comparado com os grupos CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀. Até o momento não foi determinado se o aumento de TP é secundário aos danos na

espermatogênese ou se desenvolve primariamente, induzindo a disfunção espermatogênica. Porém é sugerido que o aumento de TP em amostras testiculares de homens inférteis seja resultado da elevada produção de fibras colágenas, provavelmente estimulada por uma glicoproteína, a decorina, envolvida na fibrilogênese (Bhide et al. 2005; Orgel et al. 2009; Adam et al. 2011). Em adição, Kampfer et al (2012) observaram, também em amostras testiculares de homens inférteis, que as células peritubulares aumentaram a produção de CAT como resposta adaptativa ao aumento de H₂O₂. Com base nisto, o aumento de TP nos grupos expostos ao Cd, independente da oferta do EJ, pode ter relação com o aumento do estresse oxidativo, o qual induziu modificações na túnica própria.

Como visto anteriormente, os animais expostos ao Cd, com e sem a oferta do EJ, apresentaram redução significativa dos parâmetros tubulares e aumento dos danos oxidativos. Estas alterações foram reflexos da necrose tubular generalizada observada nestes animais. Estudos utilizando a mesma dose de CdCl₂, o mesmo período de experimental e a mesma linhagem de rato que os deste estudo, observaram danos tubulares tais como atrofia, grandes vacúolos e túbulos com apenas células de Sertoli e algumas regiões com necrose (Predes et al. 2010, Cupertino 2012, Pires et al. 2013; Lamas et al. 2015). No entanto, neste trabalho, o grupo CdCl₂ apresentou além de necrose tubular, calcificação de maior parte dos túbulos seminíferos. É discutido que a sensibilidade ao Cd possa estar principalmente ligada a fatores genéticos (Liu et al. 2001; Dalton et al. 2005). Liu et al (2001), estudando diferentes linhagens de camundongos, constataram que algumas, mesmo em doses altas de CdCl₂, não manifestavam danos testiculares visíveis, sendo a base genética apontada como uma das causas possivelmente relacionadas com o nível de alterações. Atenuação dos danos tubulares não foi observada nos grupos CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀, e da mesma forma que o grupo CdCl₂ apresentaram necrose tubular generalizada e calcificação tubular. A causa da calcificação de tecidos moles não é perfeitamente compreendida. Todavia, a deposição anormal de sais de cálcio é um processo observado em tecidos mortos ou que estão morrendo (Doherty et al. 2003; Khan et al. 2010). Quando este processo ocorre na ausência de perturbações no metabolismo do cálcio, é denominado de calcificação distrófica (Kumar et al 2010). Em condições patológicas, tem-se discutido que a mineralização é um processo que ocorre em resposta à perda de

moléculas inibitórias osteogênicas, em vez de uma precipitação mineral passiva (Chihara et al. 2014).

A dinâmica e a frequência dos componentes intertubulares também foram afetadas após a exposição ao Cd. O compartimento intertubular de ratos é constituído de vasos sanguíneos e linfáticos, células de Leydig e células do tecido conjuntivo, como macrófagos, fibroblastos e suas fibras colágenas (Gaytan et al. 1994). No intertúbulo do grupo CdCl₂ foi observado aumento de fibroblastos e fibras colágenas. Outros trabalhos também encontraram essas variações no intertúbulo de ratos Wistar após 56 dias da exposição à dose única de 1,2 mg/kg de CdCl₂ (Predes et al. 2010; Cupertino 2012). O tratamento com o EJ, por sua vez, não promoveu a redução de fibras colágenas. Embora os grupos CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ tenham apresentado menores volumes de fibras colágenas quando comparados aos grupos CdCl₂ e CdCl₂+EJ₆₀₀, o percentual e volume de fibras colágenas do tipo I não diferiu entre estes grupos. A proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno tipo I tem sido associada ao aumento de mastócitos (MT) no intertúbulo de ratos e homens com problema de infertilidade (Gaytan et al. 1986; Frungieri et al. 2002; Adam et al. 2011). Com efeito, mastócitos foram apenas observados no intertúbulo dos animais dos grupos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ não havendo, entretanto, diferença entre estes grupos. Dentre as várias moléculas acumuladas no citoplasma dos mastócitos, a triptase é sugerida estimular a proliferação de fibroblastos pelo aumento da produção de prostaglandina (PGE₂) e da expressão da glicoproteína decorina em amostras testiculares de homens inférteis (Adam et al. 2011; Adam et al. 2012).

O aumento de fibras colágenas tem grande impacto na sinalização entre componentes de túbulo e intertúbulo, uma vez que pode afetar o movimento de fluidos e hormônios (Predes et al. 2010; Adam et al. 2012). Neste trabalho, todos os grupos expostos ao Cd, com e sem oferta do EJ, tiveram redução do percentual e volume do espaço linfático, além de perda de água no tecido testicular. Em ratos, o compartimento intertubular consiste em grandes espaços linfáticos e pouca quantidade de colágeno e, com isto, as substâncias são difundidas nos espaços linfáticos e entregues aos túbulos seminíferos (Foley, 2001). Isto implica que o aumento de colágeno possivelmente afetou a comunicação parácrina entre as células e a entrega de substâncias aos túbulos seminíferos. Redução do volume de vasos sanguíneos (VVS) foi também observado nos animais dos grupos CdCl₂,

CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀. Os VS, além de apresentarem hemácias aglutinadas no lume, mostraram aumento de colágeno, o que permite inferir que houve dano endotelial. De modo geral, lesão das células endoteliais resulta em extravasamento de glóbulos vermelhos e obstrução plaquetária, causando em última instância, isquemia seguida de necrose tecidual (Kumar et al., 2010). Estes danos, por sua vez, não foram atenuados com o uso do EJ. Há uma linha de pesquisa que tenta demonstrar que a célula endotelial é o alvo primário do Cd, uma vez que é sugerido que este metal pode substituir o cálcio nos locais de ligação com as caderinas, o que pode alterar a permeabilidade endotelial, e assim contribuir para o aumento da entrada do Cd no tecido (Aoki e Hoffer 1978; Aoyagi et al. 2002; Prozialeck et al 2008). Além disto, foi demonstrado que o Cd pode ser acumulado nas células endoteliais devido à sua importação por uma proteína (ZIP8- codificada pelo gene Slc39a8) expressa somente nas células endoteliais de linhagens de camundongos sensíveis ao Cd (Dalton et al. 2005).

Vários trabalhos têm descrito as relações entre células de Leydig e macrófagos (Gaytan et al. 1994; Schlatt et al. 1995; Hutson 2006). Gaytan et al (1994) verificaram em ratos que a atividade mitótica dos macrófagos só atingiu seu pico quando se iniciou o período de proliferação das células de Leydig. Com base nestas interações, pode-se inferir que a redução de macrófagos nos grupos CdCl₂, CdCl₂+EJ₃₀₀, CdCl₂+EJ₆₀₀ e CdCl₂+EJ₉₀₀ pode ter relação, pelo menos em parte, com o menor percentual e volume de células de Leydig. Especula-se também, em estudos *in vitro*, a possibilidade do Cd afetar diretamente os macrófagos (Chakraborty et al. 2014) e as células de Leydig (Yang et al. 2003), reduzindo a viabilidade das mesmas. Nos macrófagos, em particular, foi observada atividade pró-inflamatória (Chakraborty et al. 2014), a qual em condições normais é suprimida pela ação conjunta das células de Sertoli e células de Leydig (Gaytan et al. 1994). De fato, os animais dos grupos CdCl₂ e tratados com EJ apresentaram macrófagos dentro e na periferia de túbulos seminíferos atrofiados, sendo também observada fusão de macrófagos formando células gigantes multinucleadas.

A queda geral nos parâmetros das células de Leydig foi registrada em todos os grupos expostos ao CdCl₂, independente da oferta do EJ. Redução dos parâmetros de células de Leydig foi também observado por Cupertino (2012) e por Pires et al (2013) em ratos, após 56 dias de exposição à dose única de 1,2 mg/kg CdCl₂. Contudo, o número de células de Leydig por testículo (CLT) nos grupos CdCl₂+EJ₃₀₀

e CdCl₂+EJ₉₀₀ foi menor que o grupo CdCl₂. Com efeito, a redução geral dos parâmetros de célula de Leydig foi consistente com a diminuição dos níveis de testosterona nestes grupos. Pires et al (2013), expondo ratos Wistar ao mesmo período experimental e à mesma dosagem de CdCl₂ que os utilizados neste estudo, observaram redução dos níveis plasmáticos de testosterona. Estes autores ainda relataram que 2,36 g/kg de suco concentrado de uva foi capaz de recuperar os níveis de testosterona e atenuar os danos causados pelo Cd, o que não foi verificado para os animais que receberam o extrato de juçara.

Neste trabalho, o extrato da polpa de juçara, nas doses utilizadas, não atenuou os danos causados pelo Cd e, provavelmente sua utilização após a exposição ao Cd agravou os danos testiculares dos ratos Wistar, como bem mostrado pela redução do peso testicular e seu parênquima, pela redução do volume e comprimento de túbulo seminífero e pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase e catalase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam M, Schwarzer JU, Köhn FM, et al (2011) Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: Possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Hum Reprod* 26:2613–2625
- Adam M, Urbanski HF, Garyfallou VT (2012) High levels of the extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular function. *Int J Androl* 35:550–561
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126
- Ahmad A, Asad SF, Singh S, Hadi SM (2000) DNA breakage by resveratrol and Cu(II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation *Cancer Lett* 154: 29–37
- Amann RP (1970) Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR., VanDemark NL (Ed.) *The Testis*, Academic Press, New York Vol. 1, 433 p
- Aoyagi T, Ishikawa H, Miyaji K, et al (2002) Cadmium-induced testicular damage in a rat model of subchronic intoxication. *Reprod Med Biol* 1:1434–1443
- Aoki A, Hoffer AP (1978) Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol Reprod* 18:579–591
- Arafa MH, Mohammad NS, Atteia HH (2014) Fenugreek seed powder mitigates cadmium-induced testicular damage and hepatotoxicity in male rats. *Exp Toxicol Pathol* 66:293–300
- Bhide VM, Laschinger CA, Arora PD, et al (2005) Collagen Phagocytosis by Fibroblasts Is Regulated by Decorin. *J Biol Chem* 280: 3103–23113
- Blanco A, Moyano R, Vivo J, et al (2007) Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:96–101
- Brito ES, Araujo MC, Alves RE, et al (2007) Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolao, jussara, and guajiru. *J Agric Food Chem* 55:9389-9394
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymol* 52: 302 – 310

- Carson FL, Hladik C (2009) *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, 3rd Edition, American Society for Clinical Pathology, 400 p
- Chakraborty S, Sengupta M (2014) Alteration of testicular macrophage morphology and associated innate immune functions in cadmium intoxicated swiss albino mice. *British Br J Med Med Res* 4:451-467
- Chihara M, Nakamura T, Sakakibara N, et al (2014) The onset of heat-induced testicular calcification in mice: Involvement of the telomeric locus on chromosome 1. *Am J Pathol* 184:2480–2492
- Creasy D, Bube A, Rijk E, et al (2012) Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol Pathol* 40:40–121
- Cupertino MC (2012) Danos oxidativos e histológicos crônicos causados pelo cádmio no fígado e na espermatogênese de ratos. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil
- Cupertino MC, Costa KLC, Santos DCM, et al (2013) Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. *Int J Exp Pathol* 94:343-51
- Cuypers A, Plusquin M, Remans T, et al (2010) Cadmium stress: an oxidative challenge *23:927–940*
- Dalton TP, He L, Wang B, et al (2005) Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3401-3406
- Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, et al (2000) Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101:33-39
- Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA et al (2003) Calcification in atherosclerosis: Bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11201–11206
- Eghbaliferiz S, Iranshahi M (2016) Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother Res* 30:1379–1391
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2010) Sistema e produção do açaí. [https:// sistemas deproducao .cnptia. embrapa.br /Fontes HTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/processamento.htm](https://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/processamento.htm). Acesso Junho de 2010
- Fisch STV, Nogueira LR, Mantovani W (2000) Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na Mata Atlântica (Reserva Ecológica do Trabiju , Pindamonhangaba – SP. *Rev biociências* 6:31–37
- Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, et al (2002) Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR: Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15072-15077
- Foley GL (2001) Overview of Male Reproductive Pathology. *Toxicol Pathol* 29:49–63
- Gaytan F, Bellido C, Lucena MC, Paniagua R (1986) Increased mast cell number in the testis of neonatally estrogenized rats. *Arch Androl* 16:175-181
- Gaytan F, Bellido C, Aguilar E, et al (1994) Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *J Reprod Ferti* 102:393–399
- Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc, p 19–31
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione-S-Transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *J Biol Chem*. 249:7130-7139
- He J, Giusti MM (2010) Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting

- Properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 1:163–187
- Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, et al (2007) House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ Res* 103:30–37
- Hutson JC (2006) Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp Biol Med* 231:1-7
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB (1981) A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol Reprod* 25:217-226
- Kampfer C, Spillner S, Spinnler K, et al (2012) Evidence for an adaptation in ROS scavenging systems in human testicular peritubular cells from infertility patients. *Int J Androl* 35:793–801
- Khan NA, Al-Jahdali HH, Allen CM et al (2010). The calcified lung nodule: What does it mean? *Ann Thorac Med* 5: 67–79
- Karnovsky MJ (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-138
- Kulka M, Metcalfe DD (2010) Isolation of tissue mast cells. *Curr Protoc Immunol*. Capítulo 7:Unidade 7.25
- Kumar V, Abbas, AK, Fausto N, Aster JC (2010) *Robbins & Cotran:Patologia -Bases Patológicas das Doenças*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier
- Lamas CA, Gollücke APB, Dolder H (2015) Grape juice concentrate (G8000®) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. *Int J Exp Pathol* 96:301–310
- Lane TW , Morel FM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci* 97:4627-4631
- Lee WL, Huang JY, Shyur LF (2013) Phytoagents for Cancer Management: Regulation of Nucleic Acid Oxidation, ROS, and Related Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 2013:1-22
- Li Y, Trush MA (1994) Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res* 54: 1895s–1898s
- Liu J, Corton C, Dix DJ, et al (2001) Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicol Appl. Pharmacol* 176:1–9
- Llobet JM, Falco G, Casas C, et al (2003) Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. *J Agric Food Chem* 51:838–842.
- Lourenço JA, Pitangui CP, Jordão, AA et al (2010) Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.]. *Rev bras plantas med* 12:414-420
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Maret W, Moulis JM (2013) The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity. In: Sigel A, Sigel H, Sigel, RKO (eds). *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*. Volume 11, Dekker/Taylor & Francis, pp 1-26
- Nigam D, Shukla GS, Agarwal AK (1999). Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicology letters* 106:151–157.
- Novello AA, Conceição LL, Dias MMS, et al (2015) Chemical characterization, antioxidant and antiatherogenic activity of anthocyanin-rich extract from *Euterpe edulis* mart in mice. *J Food Nutr Res* 54:101–112
- Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, et al (2002) Cadmium in blood and urine impact of sex,

- age, dietary intake, iron status, and former smoking-association of renal effects. *Environ Health Perspect* 110:1185–1190
- Orgel JPRO, Eid A, Antipova O, Bella J, Scott JE (2009) Decorin pore protein (Decoron) Shape Complements Collagen Fibril Surface Structure and Mediates Its Binding. *PLoS ONE* 4: e7028
- Pires VC, Gollücke APB, Ribeiro DA, Lungato L, et al (2013) Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: a chronic assay. *Br J Nutr* 110:2020–2029
- Predes SF, Diamante MA, Dolder H (2010) Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *Int J Exp Pathol* 91:125–131
- Prozialech WC, Edwards JR, Nebert DW, et al (2008) The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol Sc* 102:207-128
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha HAP, et al (1990) Mammalian spermatogenesis. In: Russell, LD, Ettlín RA, Sinha HAP, Clegg ED.(eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Saint Louis, pp 1-40
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67–80
- Salem A, Hafedh A, Catherine G, et al (2008) Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *J Reprod Dev* 54:129–134
- Sant’Ana MR (2014) Avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante da casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), do açaí jussara (*Euterpe edulis* Martius) e do jambolão (*Syzygium cumini*) em camundongos submetidos à dieta de cafeteria. Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil
- Satué-Gracia MT, Heinonen M, Frankel EN (1997) Anthocyanins as antioxidants on human low-density Lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J Agric Food Chem* 45: 3362-3367
- Schauss AG, Wu X, Prior RL, et al (2006) Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J Agric Food Chem* 54:8598–8603
- Schlatt S, Kretser DM, Hedger MP (1995) Mitosis of resident macrophages in the adult rat testis. *J Reprod Fertil* 116:223-228
- Silva ABL, Dias KS, Marques MS et al (2006) Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. *Rev Bras Farmacogn* 16: 475-479
- Smith N, Wei W, Lee J (2013) Cadmium Transport in Eukaryotes. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* 1:1-12
- Sönmez MF, Tascioglu S (2015) Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. *Toxicol Ind Health* 1:1-9
- Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer AO, et al (2003) *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. 2ª ed. Manole, São Paulo, 331 p
- Wang Y, Fang J, Leonard SS et al (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 36:1434–1443
- WHO -World Health Organization (2010) Exposure to cadmium: A major public health concern. Disponível em < <http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf?ua=1> >
- Xu DX, Shen HM, Zhu QX, et al (2003) The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 534:155–163
- Yamanaka A, Oda O, Nagao S (1997) Green tea catechins such as epicatechin and

- epigallocatechin accelerate Cu²⁺ induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. FEBS Lett 401: 230–234
- Yang JM, , Arnush M, Chen QY (2003) Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reprod Toxicol* 17:553-560
- Yordi EG, Pérez EM, Matos MJ, Villares EU (2012) Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In: *Nutrition, Well-Being and Health*, Jaouad Bouayed (Ed.), ISBN: 978-953-51-0125-3, InTech, 224 pp.

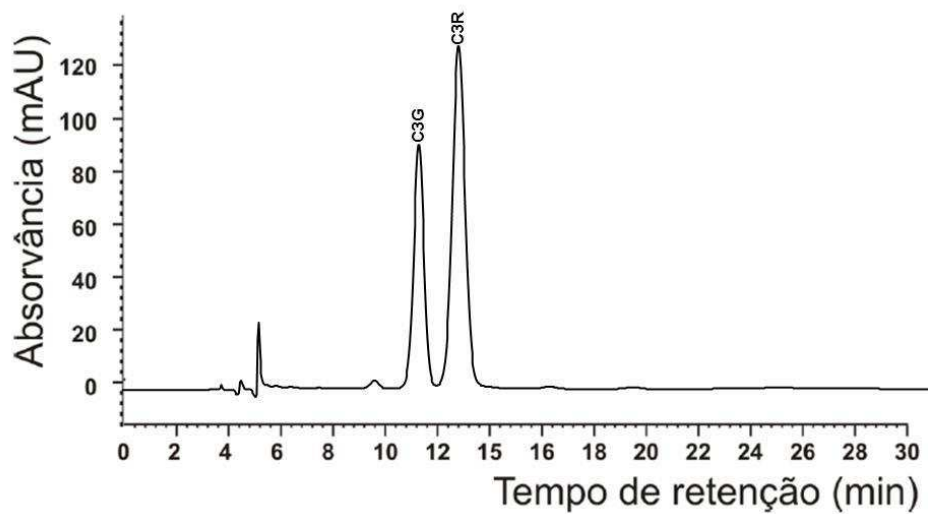
DADOS SUPLEMENTARES

- ✓ Quantidade de antocianinas totais obtidas pela extração com álcool 70° com ácido cítrico 0,3% em relação à 100g de extrato de juçara liofilizado.

Amostras	300mg	600mg	900 mg
Amostra 1	68,47	113,55	126,91
Amostra 2	71,81	116,9	140,27
Amostra 3	70,14	128,58	133,60
Média	70,14	119,68	133,60

300 mg= 300mg/100g de extrato hidroalcoólico da polpa de juçara; 600 mg = 600 mg/100g de extrato hidroalcoólico da polpa de juçara; 900 mg = 900 mg/100g de extrato hidroalcoólico da polpa de juçara.

- ✓ Cromatograma das antocianinas do extrato de açaí liofilizado. C3G: cianidina 3-O-glucosídeo e C3R: cianidina 3-O-rutinosídeo



CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ O extrato hidroalcoólico da polpa de juçara, nas doses de 300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg, não apresentou efeitos negativos sobre a morfologia e morfometria tubular e intertubular no testículo de ratos Wistar adultos saudáveis;
- ✓ O extrato hidroalcoólico da polpa de juçara, nas doses de 300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg, não aumentou peroxidação lipídica (MDA) e não alterou a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase no testículo de ratos Wistar adultos saudáveis;
- ✓ O uso do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara após a exposição à dose única de 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio não atenuou os danos tubulares e intertubulares induzidos pelo metal no testículo de ratos Wistar adultos;
- ✓ O uso do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara após a exposição à dose única de 1,2 mg/kg de cloreto de cádmio não atenuou a peroxidação lipídica induzida pelo metal no testículo de ratos Wistar adultos;
- ✓ O uso do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara potencializou os danos causados pelo cádmio, reduzindo o peso e parênquima testicular, o volume e comprimento tubular e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes de ratos Wistar adultos.