



**UNICAMP**

**CELINA DE ALMEIDA LAMAS**

**“EFEITO PROTETOR DO CONCENTRADO DE  
SUCO DE UVA NO TESTÍCULO E EM  
PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE RATOS  
INTOXICADOS COM CLORETO DE CÁDMIO.”**

**“PROTECTIVE EFFECT OF GRAPE JUICE  
CONCENTRATE IN THE TESTIS AND SPERM  
PARAMETERS OF RATS INTOXICATED WITH CADMIUM  
CHLORIDE.”**

**CAMPINAS  
2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**CELINA DE ALMEIDA LAMAS**

**“EFEITO PROTETOR DO CONCENTRADO DE SUCO DE  
UVA NO TESTÍCULO E EM PARÂMETROS  
ESPERMÁTICOS DE RATOS INTOXICADOS COM  
CLORETO DE CÁDMIO.”**

**“PROTECTIVE EFFECT OF GRAPE JUICE CONCENTRATE IN  
THE TESTIS AND SPERM PARAMETERS OF RATS  
INTOXICATED WITH CADMIUM CHLORIDE.”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Dissertation presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Structural and Cell Biology, in the area of Cell Biology.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Anne Heidi Dolder

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL  
DEFENDIDA PELA ALUNA CELINA DE ALMEIDA LAMAS  
E ORIENTADA PELA PROF<sup>a</sup> MARY ANNE HEIDI DOLDER.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. A. Dolder", is positioned below the text of the supervisor's name.

**CAMPINAS**  
**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L164e Lamas, Celina de Almeida, 1990-  
Efeito protetor do concentrado de suco de uva no testículo e em parâmetros  
espermáticos de ratos intoxicados com cloreto de cádmio / Celina de Almeida  
Lamas. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Mary Anne Heidi Dolder.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.

1. Reprodução. 2. Polifenóis. 3. Intoxicação por cádmio. I. Dolder, Mary Anne  
Heidi, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Grape juice concentrate effect in the testis and sperm profile of rats  
intoxicated with cadmium chloride

**Palavras-chave em inglês:**

Reproduction

Polyphenols

Cadmium poisoning

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Titulação:** Mestra em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Mary Anne Heidi Dolder [Orientador]

Odair Aguiar Junior

Juliana Castro Monteiro


**Data de defesa:** 25-07-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

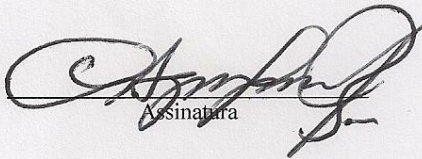
Campinas, 25 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

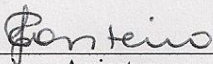
Dra. Mary Anne Heidi Dolder (Orientadora)

  
Assinatura

Dr. Odair Aguiar Junior

  
Assinatura

Dra. Juliana Castro Monteiro

  
Assinatura

Dra. Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dr. Mário Roberto Maróstica Junior

\_\_\_\_\_  
Assinatura



## RESUMO

O cádmio é um desregulador endócrino ressaltado por causar significativas disfunções fisiológicas e bioquímicas em animais e humanos. Está presente em pesticidas e no cigarro, sendo comum a contaminação de humanos. O testículo é um dos órgãos mais afetados pela toxicidade do cádmio, sendo muito suscetível ao seu acúmulo, que causa degeneração tubular, atrofia das células de Leydig, redução da qualidade espermática, entre outras alterações. Na tentativa de reverter ou amenizar os danos causados por este metal vários antioxidantes tem sido estudados, como os polifenóis, presentes na uva e seus derivados. Efeitos positivos destas substâncias têm sido relatados, como redução da pressão sanguínea, capacidade de modular enzimas e propriedade de quelar metais pesados. Já que essas substâncias quando ingeridas diariamente em determinadas quantidades podem modificar positivamente o metabolismo, neste estudo o concentrado de suco de uva foi administrado como um hábito alimentar, antes e após a intoxicação com o metal. Para isto, 24 ratos *Wistar* foram divididos em 4 grupos: GC (sem tratamento), GCd ( $\text{CdCl}_2$  - 1,2mg/Kg), GCdJ ( $\text{CdCl}_2$ +G8000<sup>®</sup> - 2g/Kg) e GJ (G8000<sup>®</sup> - 2g/Kg). O suco de uva foi administrado diariamente por gavagem desde os 50 dias até 136 dias de idade. O  $\text{CdCl}_2$  foi injetado intraperitonealmente em uma dose única quando os animais tinham 80 dias. Depois do tratamento, os animais foram eutanaziados sob anestesia (xilazina e cetamina, 10 e 80mg/kg, respectivamente). Para avaliar os efeitos do tratamento foram realizadas análises biométricas, morfológicas (morfometria, estereologia e microscopia eletrônica de transmissão), dosagem de marcadores antioxidantes (CAT, SOD, GSH, MDA), acúmulo de cádmio tecidual e análises da qualidade e contagem espermática. A resposta testicular ao cádmio foi um pouco diferente do regularmente encontrado na literatura, considerando que esta dosagem foi incapaz de alterar níveis das enzimas relacionadas com estresse oxidativo, mas isto pode ser devido ao tempo decorrido entre a contaminação e a realização das análises. Apesar disso, um efeito devastador na morfologia testicular e perfil espermático foram observados. O acúmulo de metal foi evidente no grupo GCd, reduzindo a contagem e qualidade espermática, destruindo a arquitetura testicular e ultraestrutura. O efeito positivo do consumo de suco de uva foi confirmado em nosso estudo, sendo capaz de proteger a morfologia testicular e desenvolvimento espermático, levando-se em consideração a produção e morfologia, alterados pelo metal. O suco de uva isoladamente foi capaz de

reduzir o ganho de peso, diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero, mas considerando nossas evidências, este efeito não foi devido à toxicidade. Em conclusão, o suco de uva é um agente positivo na proteção do sistema reprodutor masculino contra intoxicação por cádmio.

**Palavras Chaves: reprodução, polifenóis, intoxicação.**



## ABSTRACT

Cadmium is an endocrine disruptor, highlighted in that it causes significant physiological and biochemical dysfunction in animals and humans. This metal is present in pesticides and cigarettes, so that human contamination is common. In cadmium intoxication, the testis is one of the most strongly affected organs, being very susceptible to accumulation of this metal, which causes tubular degeneration, Leydig cell atrophy and decreases in semen quality, among other alterations. In order to reverse or diminish the modifications generated by this metal, various antioxidants have been studied, such as polyphenols, present in grapes, and its derivatives. Positive effects of these substances have been reported, such as reduction of blood pressure, capacity to modulate some enzymes, and metal chelating properties. Based on the fact that daily ingestion of polyphenols in certain quantities can favorably modify the metabolism, preventing changes that can lead to severe damage, grape juice was administered as an eating pattern, before and after injection of the metal, from the beginning of sexual maturity to the end of a full spermatogenic cycle. For this study, 24 *Wistar* rats were divided into 4 groups: GC (without treatment), GCd ( $\text{CdCl}_2$  - 1,2mg/Kg), GCdJ ( $\text{CdCl}_2$ +G8000<sup>®</sup> - 2g/kg) and GJ (G8000<sup>®</sup> - 2g/kg). The grape juice was administrated daily by gavage from 50 days of age until the rats were 136 days old. The  $\text{CdCl}_2$  was intraperitoneally injected when the animals were 80 days old. After the treatments, the animals were euthanized using a mixture of ketamine and xylazine (10 and 80mg/kg, respectively). In order to evaluate this effect, analyses were performed, including biometric analysis, morphological analyses, such as morphometry, stereology and transmission electron microscopy evaluation, dosage of antioxidant markers including CAT, GSH, SOD, MDA, dosage of cadmium accumulation in the testis and sperm quality analysis. Testis response to cadmium was different from that described in the literature, considering that this dosage did not alter enzymes related to oxidative stress, although a devastating morphological effect was observed. Metal accumulation was evident in GCd, reducing sperm count and quality, disrupting the architectural structure and ultrastructure of the testis. The positive effect of the grape juice administration was confirmed in our research considering it was able to protect testis morphology and sperm development, considering sperm production and morphology. Grape juice by itself reduced body weight gain, tubular diameter and seminiferous epithelium height, but considering our evidences

its effects were non toxic. In conclusion, grape juice administration is a confirmed positive agent in relation to reproductive cadmium toxicity.

**Key Words: reproduction, polyphenols, intoxication.**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Aspectos Gerais da Morfologia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Masculino .....	1
1.2 Contaminantes Ambientais e o Sistema Reprodutor Masculino .....	5
1.3 Cádmio e o Sistema Reprodutor Masculino .....	7
1.4 Cádmio e Compostos Antioxidantes Naturais: Destaque para Uva e seus Derivados.....	11
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivos Gerais .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	17
3.1 Grape Juice Concentrate Effect on the Sperm and Oxidative Status of Rats Exposed to CdCl <sub>2</sub> .....	18
3.2 Grape Juice Concentrate Protects Testis Morphology After CdCl <sub>2</sub> Induced Toxicity .....	38
4. CONCLUSÕES .....	60
5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	61
6. ANEXO: Certificado comissão de ética no uso de animais/UNICAMP.....	67



*Dedico esta dissertação aos meus pais que sempre acreditaram em mim, mesmo quando nem eu acreditei. À minha querida irmã Cíntia e meu companheiro Leonardo que me incentivaram em todos os momentos e nunca me pediram uma dieta.*



## Agradecimentos

*À Deus por ser a fortaleza onde encontro apoio, coragem e vontade de sempre realizar meu trabalho da melhor forma possível.*

*Aos meus queridos pais que sempre me estimularam nessa caminhada. Muito obrigada por sempre acreditarem na minha capacidade, me estimularem e comprarem meus sonhos, tornando-os parte dos seus. Agradeço especialmente a minha mãe pelas tantas vezes que me ouviu falar sobre assuntos que sequer sabia que existiam e, além disso, por sempre tentar arranjar uma solução! Gostaria de agradecer especialmente ao meu pai pelo exemplo de profissional que pretendo sempre seguir. Obrigada pelas tantas noites discutindo conteúdos que há tanto tempo não estudava e por sempre estar disponível para me ajudar. Muito obrigada pelo amor de vocês.*

*À professora Heidi Dolder que com carinho aceitou a tarefa de me orientar. Muito obrigada pela sua paciência, compreensão, pelos momentos de diversão e por além de ensinar aspectos acadêmicos, mostrar aos seus alunos como ser uma pessoa ética e generosa.*

*Ao meu companheiro, amigo e namorado Leonardo por sempre estar ao meu lado e acreditar em mim. Obrigada por todos os finais de semana que me acompanhou nas incansáveis gavagens e por toda a assessoria química! Agradeço por toda a compreensão e por ser meu porto seguro, onde encontro paz e felicidade.*

*À minha irmã e amiga Cíntia, que mesmo longe sempre torce por mim. Obrigado pelos momentos de diversão e por sempre estar disponível para corrigir meus erros de inglês!*

*À toda a minha família que sempre me apoiou e torceu por mim. Obrigado a todos pelos momentos de alegria! Gostaria de agradecer especialmente ao meu tio Eros que disponibilizou seu laboratório e seus materiais para análise de peroxidação lipídica, a*

*minha tia Regina por todas as caronas, a minha prima Fernanda por me ensinar com paciência como utilizar o Photoshop® e ao meu avô Manoel por sempre prezar pela educação de seus filhos e netos.*

*Às minhas queridas amigas Marina, Mariana, Mônica, Camila, Bauli, Natália, Luany, Janaína, Geovannia, Sophia, Ana Laura, Patrícia, Andreza. Obrigado pelo apoio, carinho e presença em todo esse período, por me permitirem sentir que a vida vai além das paredes do laboratório!*

*Às pessoas maravilhosas que conheci no laboratório da professora Heidi: Cidinha, Karine, Lívia, Michel, Débora e as estagiárias Maíra e Isabela. Obrigado pessoal por todo apoio e amizade!*

*À minha amiga Bruna Fontana Thomazini. Bruna obrigada por ser minha parceira, por ter acompanhado de perto todas as etapas deste trabalho, nas alegrias e nas tristezas. Tenho certeza que sem os ensinamentos e discussões proveitosas que tivemos a realização deste trabalho não seria possível.*

*À minha amiga Fabrícia de Sousa Predes. Fabrícia muito obrigada por ser minha amiga, pelas conversas, risadas e comilanças. Te admiro muito e agradeço por sempre estar disponível para me ajudar com todo seu carinho.*

*Ao professor Edson Rosa Pimentel pela atenção, ajuda, tempo e por disponibilizar toda a estrutura de seu laboratório.*

*Ao professor Odair Aguiar Junior, que foi o grande incentivador de minha vontade de pesquisar e guiou meus primeiros passos quando iniciei minha vida acadêmica. Obrigada por ser tão atencioso e pelos saberes que me foram transmitidos!*



*Aos colegas Letícia, Cristiano, Andréa e Marcos pelas discussões, companhia, risadas, cafés.*

*À Emanuelli da Silva do Nascimento por toda a parceria na realização das análises de concentração de metal. Obrigada por sempre me atender com paciência e gentileza, e pela amizade. Gostaria de agradecer também sua orientadora professora Solange Cadore, por ter me atendido com simpatia e disponibilizado seu laboratório para realização das análises.*

*À Andréia Gollücke por aceitar participar deste trabalho de prontidão, disponibilizando o concentrado de suco de uva e pela realização da análise de fenólicos. Obrigada Andréia pela agilidade e atenção com que responde minhas dúvidas.*

*Ao estatístico Henrique Ceretta Oliveira por disponibilizar parte de seu tempo para me auxiliar nas análises estatísticas.*

*Aos funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional e do Laboratório de Microscopia Eletrônica pela atenção e prestatividade. Agradeço especialmente ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta por todas as explicações minuciosas e disponibilidade para ajudar; e a secretária Líliam Panaggio pelo cuidado e atenção com que sempre me atendeu.*

*À todos os professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural por todos os ensinamentos e esclarecimentos durante o curso.*

*Aos membros da banca pela atenção, disponibilidade e por aceitarem o convite.*

*À Capes e a Fundação de Amparo da Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.*

*À todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.*

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.” Chico Xavier*



## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

O aumento da infertilidade em seres humanos e espécies animais tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos. Este quadro pode ser estimulado por diversos fatores entre eles doenças, estresse, variações hormonais, além da exposição a substâncias químicas (PETRELLI e MANTOVANI, 2002). Dessa forma, estas substâncias podem interagir diretamente com componentes do sistema reprodutor ou interagir na regulação endócrina, podendo inclusive induzir estresse oxidativo aumentando os danos (KAVLOCK *et al.*, 1996; GUPTA *et al.*, 2004). Assim, a terapia com produtos naturais tem sido cada vez mais estudada, atuando em diversas etapas destas disfunções (EL-MISSIRY e SHALABY, 2000; YANG *et al.*, 2006; BU *et al.*, 2011).

Para considerarmos a importância dos efeitos de substâncias tóxicas sobre o sistema reprodutor masculino, bem como da terapia com produtos naturais, torna-se necessário entender seu aspecto geral.

### **1.1. Aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino**

O sistema reprodutor masculino é formado pelos testículos, epidídimos, ductos deferentes, ductos ejaculadores, parte da uretra masculina, glândulas acessórias (que incluem as vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais) e pênis. É o responsável pela produção, nutrição e armazenamento dos gametas masculinos, conhecidos como espermatozoides. Além disso, nele também ocorre a síntese e secreção dos hormônios sexuais masculinos (andrógenos) (KIERSZENBAUM e TREE, 2008).

Os testículos são órgãos pares localizados no saco escrotal, fora da cavidade abdominal. A região posterior do testículo maduro encontra-se em contato com o epidídimo, ficando ambos suspensos no saco escrotal. Esta gônada é inervada pelos nervos espermáticos superiores e inferiores, do sistema nervoso autônomo. Os nervos espermáticos superiores se originam do gânglio mesentérico superior, enquanto que os nervos espermáticos inferiores originam-se do gânglio mesentérico inferior (SOSA *et al.*, 2009). O testículo é envolto por uma túnica, chamada de albugínea, que se espessa na região posterior para formar o mediastino do testículo. Septos partem deste mediastino e dividem o órgão em lóbulos. Cada lóbulo, apresenta cerca de 4 túbulos seminíferos, estrutura com

lúmen central revestido por um epitélio especializado conhecido como epitélio seminífero (KIERSZENBAUM e TREE, 2008).

O espermatozoide é produzido no epitélio seminífero presente nos testículos, sendo posteriormente lançado no epidídimo. Neste órgão ocorre o amadurecimento do gameta, permitindo que haja a estabilização da cromatina condensada, aquisição de novas proteínas e aquisição do padrão de motilidade “para frente” (essencial para a fertilização) (JONES, 1999). Há evidências de que este processo de maturação ocorra pela ação de proteínas do epidídimo produzidas e secretadas sob o controle de andrógenos (ORGEBIN-CRIST e JAHAD, 1978). Além disso, os espermatozoides ficam armazenados na cauda deste órgão até que haja o estímulo para a ejaculação (GUYTON e HALL, 2006; KIERSZENBAUM e TREE, 2008).

Após estímulo, os espermatozoides são conduzidos ao canal deferente, que se alarga formando a ampola do canal deferente (antes de entrar na glândula prostática). Nesta ampola também é liberado o fluído proveniente das vesículas seminais, que contribui para aumento do sêmem, além de apresentar substâncias como frutose, responsável por fornecer energia para os espermatozoides ejaculados. (MANN, 1974; GUYTON e HALL, 2006).

Este líquido passa então para o ducto prostático, sendo conduzido através da próstata, onde recebem o líquido proveniente desta glândula que contribui para a neutralização do pH vaginal, permitindo que o espermatozoide adquira motilidade necessária no sistema reprodutor feminino. Este líquido é então conduzido para o ducto ejaculatório e posteriormente para a uretra, que representa o último elo entre os testículos e o meio externo (ROY-BURMAN *et al.*, 2004; GUYTON e HALL, 2006).

O processo de formação dos gametas masculinos é também chamado de espermatogênese, sendo complexo e multi-temporal. Ele inclui os processos de proliferação e diferenciação das espermatogônias, meiose e espermiogênese. Sendo assim, alterações que afetem qualquer etapa deste processo pode levar a severos danos e até à infertilidade (WANG *et al.*, 2011).

O epitélio seminífero é considerado um epitélio estratificado, formado por células da linhagem espermatogênica conhecidas como espermatogônias (A e B, localização basal), espermatócitos (primários e secundários, localizados em região intermediária do epitélio) e espermátides (arredondadas e alongadas, localizadas região próxima ao lúmen tubular), que

estão dispostas sobre a parede tubular formada por uma membrana basal, colágeno, fibroblastos e células mioídes (responsáveis pela contração do túbulo, impulsionando os espermatozoides ainda sem motilidade) (KIERSZENBAUM e TREE, 2008; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012).

Entre as células da linhagem espermatogênica são encontradas as células de Sertoli que apresentam o núcleo basal, próximo as espermatogônias, e o citoplasma distendido da base até o lúmen tubular. São células cilíndricas, apresentando um grande nucléolo, com massas de heterocromatina associadas, contendo grande quantidade de retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias, lisossomos, gotículas de lipídeo, além de um extenso aparelho de Golgi. Na região basolateral destas células, há a formação de junções de oclusão com as células de Sertoli adjacentes (FOLEY, 2001). Isto leva a divisão do epitélio em duas importantes regiões: compartimento basal e compartimento adluminal, determinando a chamada barreira hemato-testicular, que protege os espermatócitos e espermátides de reações autoimunes. Entre as principais funções desta célula estão: sustentar, proteger e nutrir as células espermatogênicas; eliminar por fagocitose partes celulares em excesso (corpos residuais); facilitar a liberação de espermátides maduras para o lúmen do túbulo (espermição) e secretar fluido rico em proteínas e íons para o lúmen tubular. Além disso, esta célula também produz a proteína de ligação de andrógeno (ABP), sob o estímulo do hormônio folículo-estimulante (FSH), que se liga à testosterona ou à diidrotestosterona (DHT), sendo este complexo transportado até o epidídimo (FOLEY, 2001; GUYTON e HALL, 2006; KIERSZENBAUM e TREE, 2008; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012).

Em humanos, o processo de espermatogênese tem início na puberdade. Nesta fase, uma pré-espermatogônia, localizada no compartimento basal, sofre divisão mitótica produzindo duas células-filhas. Destas, uma se mantém como célula-tronco (tipo A) e outra continua o processo de divisão (tipo B), completando a fase S e avançando para fase G2 do ciclo celular. Nesta etapa, estas células se translocam para o compartimento adluminal, onde tem início a meiose I. A síntese de DNA, que ocorre na fase S, assegura que o espermatócito primário que inicia a prófase I terá o dobro de DNA que uma espermatogônia do tipo B (46 cromossomos). Ao final da meiose I, são produzidos dois espermatócitos secundários (com 23 cromossomos), que sofrem rapidamente a meiose II

(AMANN, 1986; RUSSEL *et al.*, 1993). Cada espermatócito secundário forma duas espermátides (com 23 cromossomos) que amadurecem sem sofrerem outras divisões celulares, em um processo chamado de espermiogênese. Este processo permite que as espermátides arredondadas se tornem alongadas, com o desenvolvimento do flagelo e fagocitose de corpos residuais (excesso de citoplasma), desenvolvimento do acrossomo e condensação nuclear (CLERMONT, 1972; GUYTON e HALL, 2006; KIERSZENBAUM e TREE, 2008).

Quando completamente maduro, o espermatozoide adquire a estrutura clássica, apresentando cabeça, cauda e uma peça de conexão entre elas. A cabeça apresenta núcleo achatado e acrossomo na região apical. O acrossomo é uma vesícula, aderida ao envoltório nuclear, contendo enzimas hidrolíticas que serão liberadas após contato com o ovócito, facilitando a penetração do espermatozoide. Já a cauda é composta por um esqueleto central, formado por microtúbulos, chamado axonema; uma membrana celular fina que recobre este esqueleto. Um conjunto de mitocôndrias e nove fibras densas envolvem o axonema na região proximal da cauda (essas mitocôndrias fornecem energia na forma de ATP utilizada para o movimento flagelar) e em seguida as nove fibras densas se estendem paralelas até próximo ao final do axonema (GUYTON e HALL, 2006; KIERSZENBAUM e TREE, 2008).

O espaço entre os túbulos seminíferos é chamado de espaço intersticial e também apresenta características particulares. É ocupado por vasos sanguíneos e espaços linfáticos, além de apresentarem agregados de células de Leydig, algumas células do sangue e fibroblastos. As células de Leydig são produtoras de hormônio esteroide, apresentando gotículas de lipídeo, mitocôndrias com cristas tubulares, e retículo endoplasmático liso bem desenvolvido (RUSSELL *et al.*, 1993). Frequentemente, estas células se localizam próximo aos espaços linfáticos e se agrupam ao redor de vasos sanguíneos (FOLEY, 2001). Após a puberdade, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH), esta célula produz a testosterona, sendo responsável pela produção de cerca de 95% deste hormônio, que é de extrema importância para o metabolismo masculino. A testosterona é responsável pelas características que diferenciam o corpo masculino, pelo processo de descida dos testículos, pela distribuição de pelos, tem efeito sobre a voz, atua no desenvolvimento muscular, além



de regular o próprio processo de espermatogênese, entre outras ações (GUYTON e HALL, 2006; KIERSZENBAUM e TREE, 2008).

## **1.2. Contaminantes Ambientais e o Sistema Reprodutor Masculino**

Estima-se que 15% dos casais que tentam ter filhos têm problemas de fertilidade, sendo 50% destes casos relacionados ao sexo masculino (WONG e CHENG, 2011). Diferentes fatores podem influenciar a fertilidade masculina, tais como a genética, estado de saúde e emocional, e os relacionados ao ambiente. Dentre os fatores ambientais, destacam-se o contato com agrotóxicos, tabaco, praguicidas, solventes orgânicos e metais pesados (PETRELLI e MANTOVANI, 2002).

Estas substâncias, mesmo em pequenas quantidades, podem prejudicar a fertilidade por terem efeito citotóxico nas células germinativas masculinas, ou por interferirem na regulação endócrina. São agentes químicos, definidos como moléculas exógenas que podem afetar a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação, eliminação, ação e catabolismo de hormônios naturais do organismo, que são responsáveis por manter a homeostase (KAVLOCK *et al.*, 1996; MORAES *et al.*, 2008; PETRELLI e MANTOVANI, 2002; ROMANO *et al.*, 2009). Dessa forma, seus mecanismos de ação podem envolver: ligação em receptor hormonal, interação com enzimas que sintetizam ou metabolizam hormônios, alteração da liberação hipotalâmica-hipofisária de hormônios e/ou alteração da transdução de sinais (KAVLOCK *et al.*, 1996; MORAES *et al.*, 2008). Além disso, algumas destas substâncias desreguladoras podem apresentar atividade estrogênica ou antiestrogênica, tendo afinidade com os receptores estrogênicos citosólicos, sendo capazes de mimetizar a atividade deste hormônio (CONNOR *et al.*, 1997). Assim, a alteração na estabilidade de hormônios esteroides pode acarretar prejuízos à diferenciação sexual, deterioração da qualidade espermática, induzir malformações nos órgãos reprodutivos, levando a severos danos à fertilidade (SHARPE e SKAKKEBAEK, 1993; KELCE e WILSON, 1997; EERTMANS, 2003).

Mais, além de estarem associados aos efeitos no sistema endócrino, alguns são também persistentes, lipofílicos, bioacumulativos e tem baixa pressão de vapor, o que facilita a dispersão e difusão no meio ambiente (BILA e DEZOTTI, 2001).

A exposição humana a essas substâncias ocorre através de diversas vias, sendo alimentos, água, ar e pele, as mais comuns. No caso dos seres humanos, estima-se que mais de 90% desses poluentes ambientais são absorvidas por via digestiva, principalmente por meio de alimentos contaminados (REYS, 2001).

A exposição a esses agentes tóxicos pode alterar o perfil reprodutivo de diversas formas: diminuindo o número, alterando a forma, modificando motilidade e/ou a viabilidade dos espermatozoides. Podem também alterar síntese de importantes hormônios sexuais como testosterona e dos hormônios FSH e LH (PANDE *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2005). Também estão relacionados com degeneração e depleção de células germinativas, podendo, em uma exposição prolongada comprometer o epitélio seminífero o qual será reduzido somente a células de Sertoli (CREAZY, 2001). Agentes tóxicos podem também ser relacionados com aumento na incidência de câncer testicular, aumento de casos de criptorquidismo (permanência dos testículos na cavidade abdominal) e hispospadias (abertura da uretra na base do pênis) (EERTMANS, 2003).

Já são relatados na literatura danos específicos causados por desreguladores endócrinos no sistema reprodutor masculino. Sabe-se que exposição a 2,5-hexanediona leva a uma gradual degeneração das células germinativas, com formação frequente de espermátides multinucleadas (CHAPIN *et al.*, 1983; CREAZY, 2001). Já o 1,3-dinitrobenzeno leva a vacuolização das células de Sertoli, seguida por rápida degeneração e fagocitose de espermátócitos (BLACKBURN *et al.*, 1988; CREAZY, 2001). Também já foi relatada a ação danosa destas moléculas sobre o citoesqueleto. O monoetilexilfitalato, altera rapidamente as moléculas de vimentina, enquanto a 2,5-hexanediona interfere na montagem e formação de microtúbulos (RICHBURG e BOEKELHEIDE, 1996; CREAZY, 2001). A redução no número de espermatozoides e da produção espermática diária foi relatada por Elbetieha *et al.* (2001) e El-Aziz *et al.* (1994), em ratos expostos a cipermetrina e deltametrina, respectivamente.

Outros estudos demonstram a relação entre estes contaminantes ambientais e a ocorrência de infertilidade masculina. Evidenciou-se que a exposição ocupacional ao fenvalerato pode afetar a qualidade do sêmen de trabalhadores, especialmente a contagem e a motilidade espermática (TAN *et al.*, 2002). Oliva *et al.* (2001) observaram redução do número de espermatozoides e da concentração de LH, bem como aumento da concentração

de estradiol em homens expostos a pesticidas e solventes. Da mesma forma, Selevan *et al.* (2000) verificaram associação entre altos níveis de poluição e diminuição da qualidade do sêmen, incluindo redução do número de espermatozóides com morfologia e cromatina normais e diminuição da motilidade espermática. Além disso, Eibensteiner *et al.* (2005) verificaram diminuição na motilidade e viabilidade espermática em oficiais de tráfego expostos ao chumbo presente na gasolina. Também foi investigado por Sheiner *et al.* (2002) a influência das condições de trabalho no sistema reprodutor, observando que trabalhadores industriais que fumavam, estavam expostos a metais pesados e que permaneciam em locais muito barulhentos, apresentavam anormalidades espermáticas, alterações hormonais, varicocele e/ou criptorquidia. A dioxina, em estudo realizado por Brouwer *et al.* (1999), induziu diminuição da espermatogênese, do peso testicular e outras anormalidades que reduziram a fertilidade de ratos sexualmente maduros.

Também foi possível verificar este efeito nocivo após a ocorrência de uma catástrofe ambiental no Japão, onde houve despejo de dejetos industriais que continham metilmercúrio na Baía de Minamata. Este fato causou a contaminação da biota marinha e por meio da cadeia alimentar atingiu diretamente os consumidores de peixes, causando importantes alterações neurológicas e motoras, até mesmo nas gerações seguintes (BERINGHS-BUENO, 2005). Nos Estados Unidos, Colborn *et al.* (1996), descobriram que 16 espécies de predadores de diferentes classes de vertebrados, que vivem na área dos Grandes Lagos, apresentavam sérios distúrbios reprodutivos, fato decorrente da contaminação por agrotóxicos.

### **1.3. Cádmio e o Sistema Reprodutor Masculino**

Dentre os desreguladores hormonais descritos na literatura, o cádmio é destacado por ocasionar significativas disfunções fisiológicas e bioquímicas em animais e em humanos. Está presente principalmente em baterias, no processamento da borracha, corantes, plásticos, electroquímica, e pigmentos de tinta, podendo também ser encontrado em solos, pois pode estar presente em inseticidas e fungicidas (EL-SHAHAT *et al.*, 2009; ROBARDS e WORSFOLD, 1991). O cádmio não pode ser reciclado, o que faz com que se acumule cada vez mais no ambiente. As principais fontes de contaminação por este metal

são: na fabricação de fertilizantes fosfatados, na metalurgia de metais ferrosos, na incineração de resíduos de madeira e na combustão de gasolina (LA DOU, 1999).

A importância de seu estudo está relacionada ao aumento dos níveis deste metal na água, solo, ar e em diversos alimentos, sendo a contaminação cada vez mais comum (LAFUENTE *et al.*, 2001). Considera-se seguro a ingestão de 51 a 71µg de cádmio por dia em países industrializados (WHO, 1993), porém este pode ser encontrado em áreas industriais na concentração de 9,1 a 26,7 µg/m<sup>3</sup>, enquanto em áreas rurais esta concentração está em torno de 0,1 a 6 µg/m<sup>3</sup>. Estudos mostram que o cádmio pode permanecer até 300 dias no solo e que, atualmente, são encontrados valores de aproximadamente 1mg de Cd por g de solo. Além disso, também foi visto que rios contaminados podem conter até 0,14 mg/Cd por litro de água (ALARCON, 1994; RAMIREZ, 2002).

O cigarro é considerado outra fonte de contaminação por este metal. Fumantes ativos e passivos estão expostos a concentrações de cádmio presente na fumaça do tabaco, sendo um dos componentes importantes para os efeitos tóxicos do cigarro no organismo. Cada cigarro contém aproximadamente de 1 a 2 µg cádmio e fumantes absorvem pelo trato respiratório cerca de 1 a 3 µg de cádmio por dia a mais do que uma pessoa que não tem contato com cigarros. Sabe-se que 50% dessa quantidade é absorvida. Assim, os fumantes formam um grupo especial quando se estuda a exposição a este metal (LEVY e WEGMAN, 1998; WHO, 1992; ELLIS *et al.*, 1979).

Outra importante fonte de contaminação por cádmio é a alimentação. A absorção deste metal no trato gastrointestinal é de aproximadamente 50% e quando associado a uma dieta deficiente em cálcio, ferro ou proteína a velocidade de absorção pode ser aumentada. A utilização de fertilizantes é o principal motivo desta ocorrência. Alguns países como o Japão e o Canadá têm dietas com valores de Cd mais elevados. Organizações mundiais estabelecem como limite de tolerância médio a ingestão de 70 µg/Cd/semana (KJELLSTROM *et.al.*, 1985). Foi observado que a ingestão de dose elevada, por via oral, causou a necrose do ovário e dos testículos de inúmeros animais, além da não ovulação e vários danos no fígado (WHO, 1992).

Outra importante via de exposição ao metal é a perinatal. Sabe-se que este metal pode ser detectado no leite materno humano em concentrações significativas e que

provavelmente está relacionado à contaminação ambiental sofrida pelas mães (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Este metal apresenta meia-vida de aproximadamente 20 à 40 anos em humanos e superiores a 200 dias em ratos, acumulando-se principalmente no rim, fígado e testículo (WHO, 2000; WEB, 1975). Por esse motivo, efeitos adversos à saúde podem aparecer ou continuar mesmo após a redução ou a cessação da exposição ao cádmio. Segundo Blanco *et al.* (2007), um tratamento crônico com este metal desencadeia efeitos tóxicos nos órgãos reprodutivos, principalmente testículos, comprometendo regiões tubulares e intersticiais. Siu *et al.* (2009) sugeriram que essa sensibilidade do testículo em relação ao metal se dá devido à vascularização do órgão.

Nos testículos, o cádmio pode levar a danos irreversíveis nas células de Sertoli e de Leydig (PREDES *et al.*, 2010). As células de Sertoli são responsáveis pelo suporte físico e nutricional, pela fagocitose de corpos residuais formados durante a espermiogênese e pela secreção de proteínas e síntese e secreção de hormônios. Uma vez incorporado ao citoplasma dessas células, o cádmio pode induzir a apoptose e alterar as junções de oclusão, desestabilizando a barreira hemato-testicular (KUSAKABE *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2003). Já nas células de Leydig, o metal é capaz de reduzir a síntese e secreção de testosterona, principal função desse tipo celular, sem alterar sua viabilidade (GRISWOLD, 1998; GUNNARSSON *et al.*, 2007; MESSAOUDI *et al.*, 2010). Este metal também é capaz de causar danos endoteliais, principalmente em indivíduos no estágio pós-puberal, o que pode resultar em massivo edema intersticial e estase do sangue (AOKI e HOFFER, 1978). O cádmio apresenta capacidade de diminuir os níveis de receptores de LH, AMPc e de proteínas regulatórias (GUNNARSSON *et al.*, 2007). Além disso, pode também alterar os níveis hormonais afetando o eixo hipotálamo-hipófise, por exemplo, alterando a liberação de noradrenalina, regulador da secreção de hormônios pelo hipotálamo, resultando em alterações nos níveis de testosterona e LH no plasma (LAFUENTE *et al.*, 2004).

Além desses fatores, este metal também está relacionado com perda de células germinativas, edema, hemorragia e necrose testicular, esterilidade, diminuição do número de células haploides e aumento das células diploides em fase S, aumento da fragmentação do DNA, redução do peso testicular, redução do epitélio seminífero, redução da contagem e

motilidade espermática, aumento de espermatozoides com morfologia anormal, tumor nas células de Leydig, alteração na expressão gênica testicular, destruição das membranas basais, atrofia das glândulas sexuais acessórias e incorporação de cádmio na cromatina de gametas em desenvolvimento (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BLANCO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SIU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011). Foi visto por Pires *et al.* (2013) que este metal foi capaz de reduzir o peso testicular, induzir intenso processo inflamatório no epitélio seminífero, com presença de edema, infiltrados inflamatórios, atrofia, necrose e congestão vascular, além de reduzir a área tubular e aumentar a intersticial em ratos intoxicados com cádmio.

Estudos recentes têm demonstrado que o cádmio está diretamente associado à ocorrência de estresse oxidativo (AL-AZEMI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012). Este estresse é desencadeado devido a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres. O organismo apresenta dois grupos antioxidantes importantes na defesa contra estas EROs, sendo estes os não enzimáticos (glutationa, vitamina E e C) e os enzimáticos (catalase, superóxido dismutase, glutaciona peroxidase) (KEFER *et al.*, 2009). Em baixos níveis essas EROs participam de diversos processos no metabolismo (proliferação celular, diferenciação, apoptose e senescência), porém podem ser tóxicas quando em níveis elevados (GUPTA *et al.*, 2004). Esta alta exposição ocasiona uma diminuição dos níveis de glutaciona, levando ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e íons superóxido, provocando o aumento da peroxidação lipídica e conseqüentes alterações na estabilidade intracelular, degradação de proteínas e carboidratos, danos ao DNA, alterações na expressão gênica, induzindo a morte celular (STOHL *et al.*, 2001). A glutaciona não reage somente com radicais livres, mas também é capaz de se conjugar com metais pesados, formando uma molécula solúvel que é mais facilmente eliminada, promovendo a detoxificação (KARA *et al.*, 2005). Além disso, o cádmio apresenta forte afinidade a grupos thiol de aminoácidos, especialmente da cisteína, podendo assim, afetar a barreira antioxidante do organismo inibindo a função dos grupamentos thiol das enzimas antioxidantes (GUPTA *et al.*, 2004).

Estudos mostraram que animais expostos a baixas concentrações de cádmio tiveram suas enzimas antioxidantes estimuladas por indução de uma resposta adaptativa, tendendo a manter ou aumentar as atividades fisiológicas. Mas quando expostos a altas concentrações

houve uma redução da atividade antioxidante (enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) indicando que a função de detoxificação destas enzimas foi prejudicada (BLANCO *et al.*, 2007; MESSAOUDI *et al.*, 2010). Além disso, foi verificado por Sato e Takizawa (1982) que o cádmio também diminui os níveis de substâncias antioxidantes do organismo, como o selênio. A indução deste estresse pelo cádmio em animais foi ilustrada por Acharya *et al.* (2008) e Pires *et al.* (2013) que relataram aumento de peroxidação lipídica, redução dos níveis das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase e alteração no nível da enzima glutathione reductase, respectivamente.

De acordo com Jedlinska-Krakowska *et al.* (2006), esse estresse também contribui com a diminuição das camadas do epitélio seminífero, por inibir a mitose das espermatogônias B como resposta ao aumento da fase G1 do ciclo celular para reparo de possíveis danos ao DNA. Esse processo visa evitar mutações irreversíveis e estimula, quando necessário, a apoptose celular.

Os espermatozoides humanos também sofrem danos devido a esse estresse, pois contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, sendo suscetíveis à peroxidação lipídica, podendo causar efeitos deletérios à motilidade e à habilidade fecundatória. Além disso, estes gametas apresentam baixa capacidade antioxidante, favorecendo a fragmentação do DNA e danos relacionados à peroxidação da mitocôndria (VERNET *et al.*, 2004; SARADHA e MATHUR, 2006). Este efeito foi demonstrado por Ola-Mudathir *et al.* (2008) que observaram uma redução na concentração de espermatozoides no epidídimo, na motilidade espermática, além de aumento na porcentagem de espermatozoides anormais em ratos tratados com cádmio. Pires *et al.* (2013) verificaram redução da produção espermática diária e aumento da porcentagem de espermatozoides anormais em animais tratados com o metal, bem como Acharya *et al.* (2008).

#### **1.4. Cádmio e Compostos Antioxidantes Naturais: Destaque para Uva e seus derivados**

Diante dos efeitos deletérios deste metal, diversos compostos naturais tem demonstrado seus efeitos positivos. Foi demonstrado por Manna *et al.* (2008) que a taurina

foi capaz de prevenir diversos danos causados pelo cádmio no sistema reprodutor de ratos machos. Foi relatada redução no acúmulo de cádmio testicular, aumento nos níveis de testosterona, prevenção da peroxidação lipídica, necrose, fragmentação do DNA e degeneração de epitélio seminífero (MANNA *et al.*, 2008).

Efeito positivo do  $\beta$ -caroteno também foi verificado em relação à intoxicação por cádmio, sendo capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica, modulando os níveis das enzimas SOD e GSH (EL-MISSIRY e SHALABY, 2000). Da mesma forma, a administração de  $\alpha$ -tocoferol reestabeleceu o peso testicular e reduziu o nível e número de túbulos seminíferos necróticos (YANG *et al.*, 2006). Corroborando com estes resultados, o consumo de quercitina reestabeleceu a estrutura testicular e os níveis dos marcadores antioxidantes GSH, GSHpx e SOD, bem como reduziu a peroxidação lipídica e níveis de  $H_2O_2$  em ratos tratados com cloreto de cádmio (BU *et al.*, 2011).

Dentre estas substâncias antioxidantes destacam-se os compostos fenólicos, como importantes agentes neste processo. O termo compostos fenólicos refere-se a um amplo grupo de moléculas encontradas em frutas, legumes, verduras, grãos e derivados, sendo as uvas consideradas uma das maiores fontes destes compostos (MAXCHEIX *et al.*, 1990). Podem ser quimicamente definidos como substâncias que possuem um anel benzênico ligado a uma ou mais hidroxilas, podendo apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil-ésteres e glicosídeos (HO *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos são subdivididos em duas categorias, que abrangem compostos simples, como os ácidos fenólicos, e compostos altamente polimerizados, como os taninos, sendo eles flavonoides e não-flavonoides. Dentre a classe dos flavonoides podemos encontrar antocianina, catequina, epicatequina e a quercetina (ABE *et al.*, 2007; HO *et al.*, 2010). As antocianinas, em especial, são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho presente em flores e frutos. Em uvas tintas, as antocianinas contribuem para os atributos sensoriais e, principalmente, para a coloração. As catequinas e epicatequinas presentes, sobretudo em sementes de uvas, são os principais compostos fenólicos responsáveis pelo sabor e adstringência de vinhos e sucos de uva (ABE *et al.*, 2007; DOMENEGHINI e LEMES, 2011). Apesar da classe de flavonoides ser a mais estudada, o resveratrol pertence ao grupo de não flavonoides, e foi sendo apontado em estudos científicos como o principal fator de proteção à saúde encontrada em vinhos



(GIEHL *et al.*, 2007; DOMENEGHINI e LEMES, 2011). O tanino é outra substância polifenólica e quando apresenta alto peso molecular é responsável pelo sabor adstringente, enquanto os de baixo peso molecular tendem ao sabor amargo (ANJO, 2004).

Inicialmente estes fenóis atuam como protetores da uva e da videira. Cabe a eles, proteger essas plantas dos ataques físicos como a radiação ultravioleta do sol e dos ataques biológicos por fungos, vírus e bactérias. Dessa forma, estão distribuídos nas folhas da videira, nas sementes e, principalmente, na casca das uvas (ANDRADE, 2006; DOMENEGHINI e LEMES, 2011).

Os compostos fenólicos são encontrados em espécies *Vitis vinifera*, conhecidas como uvas finas como Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Merlot, Tannat, Sangiovese e também em *Vitis labrusca* que são uvas rústicas, Concord, Herbemont, Isabel e Niágara, de vinhos comuns, porém existem diferenças nas quantidades de resveratrol (ABE *et al.*, 2007; SAUTTER *et al.*, 2005). Na uva, essa substância é sintetizada na casca como resposta ao estresse causado por ataque fúngico na videira, por dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta. Dessa forma, quanto mais intensa a coloração da uva, maior conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante ela apresenta (ABE *et al.*, 2007; SAUTTER *et al.*, 2005; GUTIÉRREZ MAYDATA, 2002). As concentrações de resveratrol variam em função da infecção fúngica, cultivo da uva, origem geográfica e práticas enológicas (SAUTTER *et al.*, 2005; DOMENEGHINI e LEMES, 2011).

Essas substâncias exercem uma forte ação antioxidante em humanos e animais, melhorando a função endotelial e reduzindo a pressão arterial (ANDRADE, 2006), além de apresentar ação antiinflamatória e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares (HO *et al.*, 2010).

Os flavonoides e outros polifenóis encontrados nas uvas, apresentam capacidade de “limpar” as espécies reativas de oxigênio (MUSALLI *et al.*, 2009). Estudos em animais e em humanos mostraram que estes compostos apresentam propriedade de aumentar a retirada destes radicais do plasma. Eles também são capazes de quelar metais que promovem a peroxidação lipídica e modular a ação de enzimas antioxidantes (FREEDMAN *et al.*, 2001; MUSALLI *et al.*, 2009). Apresentam também capacidade de inibir a agregação plaquetária, reduzir a proliferação celular e estimular apoptose em

células cancerígenas e atuar como anticoagulante, apresentando também ação estrogênica e quimiopreventiva (FRANKEL *et al.*, 1993; SAUTTER *et al.*, 2005; ANDRADE, 2006).

Em parâmetros reprodutivos, foi visto por Khattab *et al.* (2010) efeito positivo do consumo de extrato de semente de uva em ratos intoxicados por alumínio, havendo aumento do ganho de peso total, peso testicular e prostático; melhora na contagem, motilidade e viabilidade espermática; redução de anormalidades espermáticas; aumento dos níveis de testosterona, bem como redução da peroxidação lipídica; além do restabelecimento da arquitetura histológica. Jiang *et al.* (2008) relatou aumento do peso testicular e melhora na morfologia dos túbulos seminíferos de ratos expostos a 2,4-hexanediona e tratados com resveratrol. Também foi verificado por Juan *et al.* (2005) a manutenção do peso testicular, diminuição do diâmetro com aumento da densidade dos túbulos seminíferos, aumento da contagem espermática e aumento nos níveis séricos de FSH, LH e testosterona em ratos saudáveis tratados com resveratrol.

Dentre os efeitos positivos apresentados pelos derivados da uva, o consumo de um concentrado de suco de uva também foi estudado por Pires *et al.* (2013), que associaram o consumo do concentrado de suco de uva após a intoxicação por cádmio em período crônico. Foram vistos efeitos positivos do tratamento curativo do concentrado de suco de uva em alguns parâmetros como na biometria, porcentagem de área e diâmetro tubular, porém em grande parte das análises realizadas, como no score de Johnsen, morfologia e produção espermática o concentrado de suco de uva não apresentou efeitos e os danos foram mantidos.

Diversas pesquisas relacionam a qualidade da alimentação e o aparecimento de doenças, como as cardiovasculares, onde também ocorre aumento do estresse oxidativo. Dessa forma foi visto que a população francesa, apesar de consumir maior quantidade de gorduras saturadas, fumar mais e ser mais sedentária, apresenta metade dos problemas cardiovasculares apresentados pelos norte-americanos, por exemplo. Este fato, chamado de paradoxo francês, foi intimamente relacionado com o consumo diário do vinho, que faz parte do hábito alimentar deste povo (ABE *et al.*, 2007; ANDRADE, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2005; GIEHL *et al.*, 2007). Além disso, foi visto que os compostos fenólicos presentes no vinho, estão no suco de uva em maior quantidade (GIEHL *et al.*, 2007).

Foi relatado por Anjo (2004), que o potencial destas substâncias quando ingeridas diariamente em certas quantidades pode modificar o metabolismo de maneira favorável a prevenção de alterações que podem levar a danos mais severos. Isto demonstra que o consumo de um alimento como hábito alimentar pode levar a maiores benefícios.

Além disso, Wang *et al.* (2009) verificaram que o tratamento contínuo com extrato de polifenóis de uva, 4 dias antes e 4 dias após indução de isquemia cerebral, contribuiu para redução na morte neuronal, fazendo com que 80% dos neurônios sobrevivessem, além de inibir a fragmentação, condensação e outras irregularidades em neurônios piramidais. Demonstrando melhor efeito de um tratamento contínuo com o extrato do que simplesmente antes ou após a indução da isquemia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Este estudo teve como objetivo identificar e avaliar os possíveis danos causados pelo cloreto de cádmio no processo de espermatogênese de ratos *Wistar*, a fim de verificar o efeito de um tratamento contínuo com concentrado de suco de uva, desde o início da maturação sexual até o término de um ciclo espermatogênico na fase adulta, quanto à possível amenização das alterações que o metal pode ocasionar. Dessa forma, pode-se avaliar seu efeito como hábito alimentar.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- I- Identificar danos morfológicos, estruturais, ultraestruturais, espermáticos e oxidativos ocasionados pelo cloreto de cádmio no sistema reprodutor masculino.
- II- Verificar a capacidade do concentrado de suco de uva de proteger o sistema reprodutor masculino contra os efeitos causados pelo cloreto de cádmio, avaliando as alterações espermáticas, morfológicas, estruturais e ultra-estruturais nos testículos de ratos *Wistar*.
- III- Avaliar a capacidade preventiva do concentrado de suco de uva na modulação de marcadores de estresse oxidativo nos testículos de ratos *Wistar* intoxicados com cloreto de cádmio.
- IV- Verificar o efeito da ingestão do concentrado de suco de uva como um hábito alimentar no ganho de peso e em parâmetros reprodutivos de ratos *Wistar* saudáveis.

### **3. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

- 3.1. Grape Juice Concentrate Effect on the Sperm and Oxidative Status of Rats Exposed to CdCl<sub>2</sub>.
- 3.2. Grape Juice Concentrate Protects Testis Morphology After CdCl<sub>2</sub> Induced Toxicity.

### **3.1. Grape Juice Concentrate Effect on the Sperm and Oxidative Status of Testes Exposed to CdCl<sub>2</sub>.**

Celina de A. Lamas<sup>a</sup>, Bruna F. Thomazini<sup>a</sup>, Emanuelli do N. da Silva<sup>b</sup>, Andrea P.B. Gollücke<sup>c</sup>, Heidi Dolder<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Structural and Functional Biology, State University of Campinas, Campinas - SP, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, State University of Campinas, Campinas - SP, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Biosciences, Federal University of Sao Paulo, Santos – SP, Brazil.

## **Abstract**

The present study was performed to evaluate the protective effect of continuous grape juice concentrate (G8000<sup>®</sup>) consumption against cadmium induced damage in rat sperm. Considering that cadmium, known for its genotoxic and spermiotoxic effect, is a common contaminant, the development of natural therapies to diminish the damages it can cause is considered highly important. Twenty-four male *Wistar* rats were divided into groups: GC (without treatment); GCd (CdCl<sub>2</sub>), GCdJ (CdCl<sub>2</sub>+G8000<sup>®</sup>-2g/Kg) and GJ (G8000<sup>®</sup>-2g/Kg). A single dose of CdCl<sub>2</sub> (1,2mg/Kg) was intraperitoneally injected when the animals became adults (80 days old) and G8000<sup>®</sup> was administered daily by gavage from the beginning of sexual maturity (50 days old) to the end of a spermatogenic cycle (136 days old). Analyses of sperm quantification, production, morphology and transit time, as well as metal accumulation and the testis antioxidant status were performed. The devastating effect of cadmium on sperm development was registered by reduction of sperm count in the testis and epididymis, testicular sperm production and normal sperm percentage. A vast number of head alterations were found in GCd. Although no alteration was found in the antioxidant markers analyzed (MDA, CAT, GSH, SOD), we described a rise in testicular cadmium accumulation responsible for the alterations observed. The consumption of G8000<sup>®</sup> was able to attenuate these cadmium-induced alterations of rat sperm, reducing the metal accumulation level and improving sperm output and development. Our study indicates grape juice concentrate as a promissory therapy against intoxication damage.

**Keywords: Metal, Intoxication, Polyphenols, Reproduction, Protection.**

## INTRODUCTION

In recent years, the therapeutic effect of natural products has been widely studied. It is known that high fruit and vegetable consumption contributes to the prevention of some metabolic disorders. The capacity of some natural compounds to reduce the risk of these disorders, which include obesity, intoxication and others are, in part, associated with bioactive compounds present in vegetables and fruits (Dragano et al., 2013; Hu, 2003).

Among these bioactive molecules, the phenolic compounds have been highlighted and are present in the grape and its derivatives. They include the flavonoids anthocyanin, catechin, epicatechin and quercetin; and an important molecule among non-flavonoids is resveratrol (Domeneghini and Lemes, 2011; Ho et al., 2010). Some properties of grape products have already been described in the literature, such as the reduction of blood pressure, anti-inflammatory action, reduction in cell proliferation and modulation of some enzymes (Ho et al., 2010; Andrade, 2006).

Cadmium is a toxic metal, occurring as a common environmental contamination (present in pesticides and cigarettes) that induces cellular damage mainly due to the production of free radicals (Wang et al., 2011; El-Shahat et al., 2009). Tissues normally have an antioxidant defense mechanism to ensure the removal of reactive oxygen species. But in some conditions, it is not a strong enough response to avoid oxidative stress. In cadmium intoxication, the testis is one of the most strongly affected organs, since they are very susceptible to the accumulation of this metal, which causes lipid peroxidation, destroying the body's antioxidant barrier, causing spermatogenic damages, among other alterations (Messaoudi et al., 2010; Gupta et al., 2004; WHO, 1992). Recent studies have demonstrated that this metal accumulates in the testis and can reduce epididymis sperm concentration, sperm motility, and increase abnormal sperm percentage. Cadmium can also increase peroxidation levels and decrease antioxidant markers such as catalase, glutathione and superoxide dismutase, affecting the antioxidant status (Wang et al., 2012; Olamudathir et al., 2008).

The benefits of grape compounds in the male reproductive system have also been described. Juan et al. (2005) demonstrated that resveratrol increased sperm count and levels of FSH, LH and testosterone in healthy rats. Pires et al. (2013) related the consumption of



grape juice concentrate and cadmium intoxication in a chronic assay. In this research, few positive effects were visualized but the improvement of spermatic production was evident.

High-quality food intake has been related to the prevention of some diseases (Abe et al., 2007; Andrade, 2006). Anjo (2004) suggests that the potential of these bioactive substances improves when consumed daily. Furthermore, Wang et al. (2009) verified that the continuous ingestion of grape polyphenol extract 4 days before and 4 days following induction of cerebral ischemia, contributed to reduction of neuronal death, inhibited neuronal fragmentation, condensation and other irregularities in pyramidal neurons. A better effect was demonstrated by continuous therapy with the extract rather than just before and after ischemia.

The study of the benefits of grape product ingestion, especially as an eating pattern, in relation to its action against oxidative stress and the harm caused by metals that can occur commonly in contamination, prompted us to evaluate the protective effect of grape juice concentrate against cadmium induced toxicity.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Grape juice concentrate (GJC)**

The grape juice concentrate used in the present research was G8000<sup>®</sup> provided by Golden Sucos (Farroupilha-RS, Brazil). This concentrate was obtained by nanofiltration and evaporation concentration of a juice that contains *Vitis labrusca* grapes. This process permits that the juice contains more polyphenols than a common grape juice (Aguiar et al., 2011).

### **Determination of GJC total phenols and dosage**

In order to calculate the grape juice concentrate dosage, the total phenols were measured by the Folin–Ciocalteu assay (Singleton and Rossi, 1965), using gallic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for the standard curve, and the results were expressed as mg EAG/kg. The readings (in triplicate) were taken at 740 nm, using a Genesis 2 spectrometer.

This analysis revealed the percentage of phenols in G8000<sup>®</sup>. It is known that an effective amount of polyphenols for an adult human is 2g/day (Ada, 2004). The proportion of this recommendation for a rat was 16mg/day, considering that its metabolism is faster than human metabolism (Scollon et al., 2009; Zorzano and Herrera, 1990). According to this higher metabolism and based on the positive effects of the second dosage used by Pires et al. (2013), the dose of 2g G8000<sup>®</sup>/Kg/day was chosen for the present study. Also, the percentage of phenols in the present study was higher than was found in Pires et al. (2013), which explains the dose used in the present study, that is smaller than in the study cited.

### **Animals and experimental design**

For the present study, 24 *Wistar* rats (50 days old) were obtained from the Central Animal Raising Unit of Unicamp (State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil). The animals were housed three per cage, with a 12h light-dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*. Furthermore, all the procedures were developed according to the Guide of Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Committee for Ethics in Animals Experimentation of UNICAMP (#2900-1).

The rats were randomly divided in 4 groups (n=6), that received the following treatments. The control group (GC) received only water by gavage. The cadmium group (GCd) also received a CdCl<sub>2</sub> injection. The grape juice group (GJ) received 2g G8000<sup>®</sup>/Kg/day. The fourth group received the same GJC dose and the CdCl<sub>2</sub> injection (GCdJ).

The GJC was administered daily by gavage to 50 day old rats (beginning of sexual maturity, according to Zanato et al. (1994)) until the end of one spermatogenic cycle (136 days old) and the CdCl<sub>2</sub> was injected intraperitoneally in a single dose of 1.2 mg/Kg when the rats were 80 days old (Predes et al., 2010). The groups GC and GJ received an intraperitoneal injection of saline 0.9% and groups GC and GCd received water by gavage, to maintain the same experimental conditions. At the end of the experiment, animals were anesthetized using a mixture of ketamine and xylazine (10 and 80mg/kg, respectively).

## **Collection of the Sample**

After sacrifice the left testis and epididymis were removed. A portion of this testis was frozen at 20°C for sperm counts, as well as the entire epididymis, and the other half was frozen at -80°C for biochemical analyses. One centimeter of the deferens duct, proximal to the epididymis, was removed and then twisted and compressed in PBS buffer (pH=7) where it remained for about 15 minutes to diffuse the spermatozoa for morphological analysis.

## **Sperm Parameters**

To analyze the Daily Sperm Production (DSP), ½ of the testis that was frozen at -20°C was used. The technique followed Robb et al. (1978) and sperm production value was corrected as proposed by Pires et al. (2013). The Sperm Transit Time (STT) was performed using the frozen epididymis. The sperm from the caput/corpus and cauda portions were counted in a Neubauer chamber according to Robb et al. (1978). The STT was calculated according to Kempinas et al. (1998).

In order to determine sperm abnormalities, the suspension of spermatozoa from the deferens duct was examined on a histological slide (Seed et al., 1996). Two hundred spermatozoa per animal were microscopically analyzed at 400x magnification, and separated in two categories: normal and abnormal (Favareto et al., 2011; Oliveira et al., 2009; Seed et al., 1996).

## **Determination of cadmium tissue concentration**

In order to determine cadmium concentration in testicular tissue, 4mL of deionized water were added to 0,15g of homogenized sample and was allowed to stand for 5 minutes. Subsequently, 0.5mL of tetramethylammonium hydroxide was added and again the mixture was allowed to stand for 5 minutes. The total volume was completed to 10mL and analysis was performed by atomic absorption spectrometry in a graphite furnace (GF AAS). The analytical calibration curve was obtained at concentrations of 1-9 µg L<sup>-1</sup> using aqueous metallic element standards and NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was used as a chemical modifier. The pyrolysis

and atomization temperatures were 500°C and 1500°C, respectively. All readings were performed in triplicate.

### **Oxidative Stress Markers**

To perform these analyses, testis tissue stored at -80°C was used. Part of the testis was homogenized and then centrifuged according to the recommendations of the respective commercial diagnostic kit used. The supernatant was removed and used for the assays. The lipid peroxidation level was measured according to Malondialdehyde (MDA) amount, using TBARS Assay Kit from Cayman Chemical<sup>®</sup> (cat n° 10009055; lot n° 0452078). The enzyme, Catalase (CAT) was determined spectrophotometrically following the decomposition of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), using Catalase Assay Kit from Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (cat n° CAT100; lot n° 110M4055). Superoxide dismutase (SOD) assay was performed using Superoxide Dismutase Assay Kit from Cayman Chemical<sup>®</sup> (cat n° 706002; lot n°0447900), which uses a tetrazolium salt for superoxide radical detection, generated by xantine oxidase and hypoxanthine. In order to evaluate Reduced Glutathione (GSH), the Glutathione Assay Kit from Sigma-Aldrich<sup>®</sup> was used (cat n° CS0260; lot n° 082M4089).

### **Statistical analysis**

The comparison of control values and other groups was done using the Kruskal-Wallis non-parametric test, followed by Dunn's post-test (Minitab<sup>®</sup>). The results were considered significant for p<0.05. Moreover, for all values, the means ± standard deviation was calculated.

## **RESULTS**

### **Total phenol content of G8000<sup>®</sup>**

The results of the total phenol content of GJC showed a concentration of 54.3 g EAG/kg, with a standard deviation of 0.7. This value is equivalent to a percentage of 5.4% of polyphenols in the GJC used. The spectrum of G8000<sup>®</sup>, revealing the major components, can be found in Aguiar et al. (2011).

## **Sperm Parameters**

The DSP was reduced in the group treated only with the metal, in relation to GC and GJ. The positive effect of GJC with respect to sperm production is demonstrated by a significantly enhanced sperm count in GCdJ relative to GCd (Figure 1). When considering the number of sperm per testis, the GCd group showed significantly lower values than the other groups. The same happened in relation to sperm number per g of testis (Figure 2).

Considering the STT, no significant differences were seen between the groups (Table 1). Instead, the number of sperm on caput/corpus and cauda were reduced in the group treated only with the metal compared to GC and GJ (Figure 3). The GCdJ clearly exhibited an improvement in epididymis sperm count with respect to GCd, although this result is not statistically significant.

Moreover, the normal sperm percentage was lower in GCd when compared to GC and GJ (Figure 4). Nonetheless an improvement in the percentage of normal sperm in group GCdJ relative to GCd was noted, although not significantly different. A qualitative analysis of the sperm profile revealed the most prevalent alterations, which are illustrated in Figure 5.

## **Determination of tissue cadmium concentration and stress oxidative markers**

The accumulation of cadmium was significantly higher in GCd, when compared to groups GC and GJ. A modest reduction in metal accumulation was observed in GCdJ mean values, although this result is not statistically significant. These differences can be seen in Figure 6. Data regarding stress oxidative markers are displayed in Table 2. Considering the analyses of CAT, SOD, GSH and MDA no alterations were seen between the groups.

## **DISCUSSION**

Considering that an important part of the human population is chronically exposed by inhalation or food and water intake to cadmium (Satarug et al., 2003), the study of its action mechanisms, as well as its effects have been highlighted in literature (Wang et al., 2012; Oliveira et al., 2009; Monsefi et al., 2008). In most cases the damage caused by this

metal are related to induction of oxidative stress which is illustrated by alterations in the level of enzymes responsible for the endogenous antioxidant mechanism and lipid peroxidation levels (Wang et al., 2012; Al-Azemi et al., 2010). In our research, cadmium was not able to cause significant differences in their levels, but a devastating effect on rat sperm was observed. Moreover, the ability of the organism to reestablish stress oxidative markers levels is known to be time-dependent. Casalino et al. (2002) revealed that 48 hours after cadmium exposure the lipid peroxidation, SOD and CAT in liver and kidney showed values close to controls.

It is known that cadmium can diffuse rapidly in the body after contamination (Monsefi et al., 2008), having a long biological half life (10 – 30 years in humans) (Oliveira et al., 2009). This metal accumulates especially in the liver and kidney (Monsefi et al., 2008), but some studies have reported its accumulation also in reproductive organs (Wang et al., 2012; Oliveira et al., 2009), which can be another cause for the resulting damage. We demonstrated this accumulation in the testis, a fact that could be responsible for the reduction in sperm production as well as viability. This accumulation is related to metallothionein levels, which are endogenous proteins that bind cadmium, protecting the tissue. Its production is stimulated by cadmium and it is produced up to a maximum level, after which there is insufficient metallothionein to couple with the metal, promoting its accumulation (Siu et al., 2009; Xu et al., 2005). Cadmium can be captured by facilitated diffusion or an active transport process, and it may also be internalized by receptors or transporters complexed with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$ . The ion's similarity permits substitution of cadmium for these molecules, using the same mechanisms, stimulating or inhibiting their pathways (Siu et al., 2006). The protein ZIP8 has been studied as a potential cadmium transporter in the testis (Siu et al., 2009). It commonly transports  $\text{Zn}^{2+}$  in kidney and lung epithelium (Besecker et al., 2008), but the expression of ZIP8 in cadmium-induced testicular damage, makes it a potential cadmium transporter for testicular cells (Siu et al., 2009).

Cadmium's ability to mimic ions contributes to the appearance of alterations mediated by signaling pathways instead of general cell cytotoxicity (Siu et al. 2006). Although this mechanism is not completely elucidated yet, it is known that cadmium can increase TGF- $\beta$ 3 production in the blood-testicular barrier, which activates the MAPK

pathway. This leads to reduction of integral membrane proteins, compromising the barrier. The consequent disruption of cell adhesion, promotes germ cell loss, altering sperm production and their liberation after complete spermiogenesis (Wong and Cheng, 2005; Wong et al., 2004). This process could have contributed to reduced sperm count as well as to their abnormal morphology. Moreover, cadmium has a direct effect associated with inflammatory process induction, with an increase in pro inflammatory cytokine levels, contributing to epithelium disruption (Al-Azemi et al., 2010) and triggering a permanent spermatogenesis loss (Abd-Allah et al., 2009). Pires et al. (2013), described an extensive inflammatory process and epithelium damage caused by the same cadmium dosage used in the present research. According to Abd-Allah et al. (2009) DNA damages can contribute to the development of this process.

At the end of spermatogenesis the spermatid nucleus is remodeled and the chromatin is condensed (Zini et al., 2009), exchanging histones for specific proteins, called protamines (Zini et al., 2009; Ward and Coffey, 1991). This modification permits a very tight association with DNA, including the formation of covalent disulfide linkages between protamines on adjacent DNA strands, resulting in a strong stabilization and condensation of chromatin (Eddy, 2006). Aikten and Curry (2011) reported that some molecules can bind sperm DNA in sites generally occupied by protamines triggering poor chromatin remodeling, loose and fragmented DNA. Because of these alterations, some regions continue associated with histones, being more vulnerable (Aikten and Curry, 2011). Recent research has associated cadmium accumulation, DNA damage and alteration in sperm number and morphology (Wang et al., 2012; Zini et al., 2009; Oliveira et al., 2009). The correct development of this process is very important, considering that a mature sperm cannot repair DNA damage (Laberg and Boissonneault, 2005). This process could also alter the gene expression pattern triggering the reduction of sexual hormone levels, being crucial to sperm production. Using the same dose as in the present research, Pires et al. (2013) related a reduction in testosterone levels.

We considered that cadmium accumulation could have triggered DNA damage (not analyzed), causing the sperm reduction and altered morphology. Alterations in head morphology were very common in the present study and are also related to DNA modifications. Tanaka et al. (2005) and Cho et al. (2001), considered uncondensed

chromatin the major cause of sperm head alterations. On the other hand, cadmium has some direct effect on microtubules which could be related to the defects observed in sperm flagella. The metal was able to inhibit microtubule formation (Brunner et al., 1991) and microtubule sliding, important for sperm motility (Kanous et al., 1993). Cadmium accumulation in mitochondria also collaborates to increase flagellum alterations (Brunner et al., 1991).

In spite of the morphological alterations found in cadmium affected epididymis, no alteration of sperm transit time was observed in the present study. The lower accumulation of cadmium in epididymis, compared to the testis, as well as its less abundant vasculature (Siu et al., 2009) prompted us to consider the epididymis a less vulnerable organ. Moreover, is in this organ that occur sperm maturation and liberation to fecundation, its action is extremely important to the formation of individuals without abnormalities. Assigned to it a wide range of enzymes and proteins that protect sperm and compensate each other, more comprehensively than in other organs of the male reproductive system (Noblanc et al., 2012; Chabory et al., 2010).

The injury caused by this metal was considered untreatable by Jones and Cherian (1990), but recently many natural products have been tested to prevent or mitigate the damages of its contamination (Pires et al., 2013; Ola-Mudathir et al., 2008; Eybl et al., 2006). Polyphenols from grapes are considered a potent metal chelating agent, mainly because of their high affinity for metal ions (Fraga et al., 2010). Although no significant difference was observed for GJC administration in relation to cadmium accumulation, we considered that the polyphenols exerted some positive action, considering that GJC was able to reduce the cadmium level in the testis when compared to the group treated only with the metal.

Moreover, these active compounds from grapes can interact with cell membranes changing their structure as well as their physical properties, altering signal transduction (Fraga et al., 2010). These molecules are also able to interact with transcription factors involved in an inflammation process (Fraga et al., 2010; Makenzie et al., 2009). Properties related to hormonal regulation have been described for polyphenols (Pires et al., 2013; Juan et al., 2004). Trans-Resveratrol was able to increase levels of LH, FSH and testosterone in healthy rats and improve their sperm production (Juan et al., 2004).



Pires et al. (2013) demonstrated a positive effect of GJC on testis inflammatory processes, histological architecture and increased testosterone levels of rats that received cadmium. The improvement of testicular morphology and inflammation as well as increased hormonal levels, as stated in the literature (Pires et al., 2013; Juan et al., 2004) could be responsible for improvement of sperm count and production in the testis of rats intoxicated with cadmium. Observing sperm morphology, GJC diminished the level of sperm abnormalities compared to the GCd. We described 50% more normal sperm in GCdJ than GCd, a similar result was observed for the epididymis sperm count.

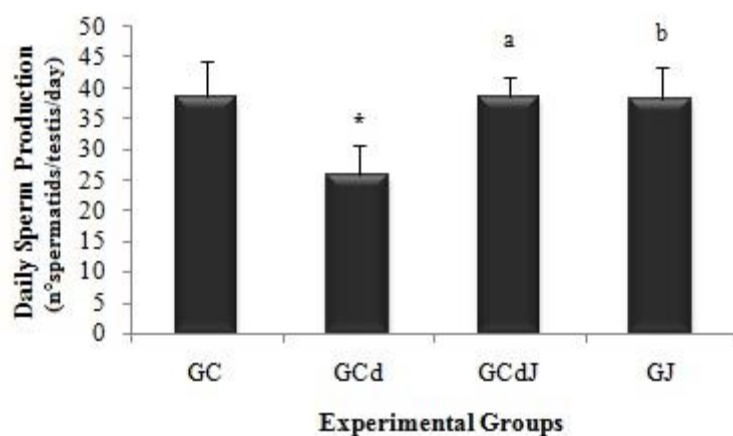
Although GJC was considered beneficial to testis morphology, Pires et al. (2013) also described that the improvement of tissue architecture should not be extended to the entire organ. We considered that possible alterations of myoid cell physiology caused by cadmium, could contribute to the reduced number of sperm that reach the epididymis in those groups treated with the metal. Again, the advantageous G8000<sup>®</sup> effect was maintained, since it prevented sperm reduction to reach the GCd level.

The GJC by itself did not modify sperm development. Juan et al. (2004) described an improvement of sperm count and hormone levels of rats treated with trans-resveratrol. This was not verified by Pires et al. (2013), which also used a grape juice concentrate that corroborated with ours. Possibly, these substances when isolated are administered in higher values, exerting the effects observed by Juan et al. (2004). Considering metal concentration in testis, the administration of the G8000<sup>®</sup> in GJ could have contributed to maintain the cadmium levels as zero, reducing it even in small level of contamination.

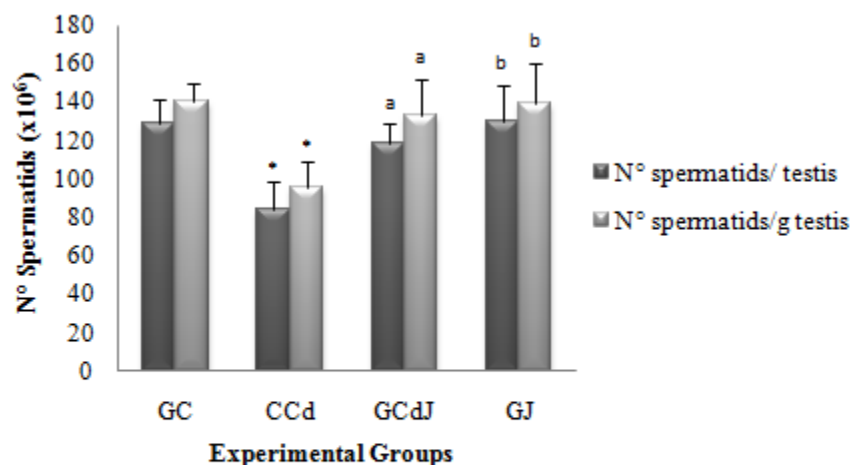
## **CONCLUSION**

The present study demonstrated that even without significant alterations in stress oxidative markers, cadmium devastating effect on sperm development and production are present. Its accumulation which trigger its directed mechanisms are enough to develop spermatogenesis disruption. Furthermore, grape juice concentrate continuous administration provided positive effect on all parameters analyzed.

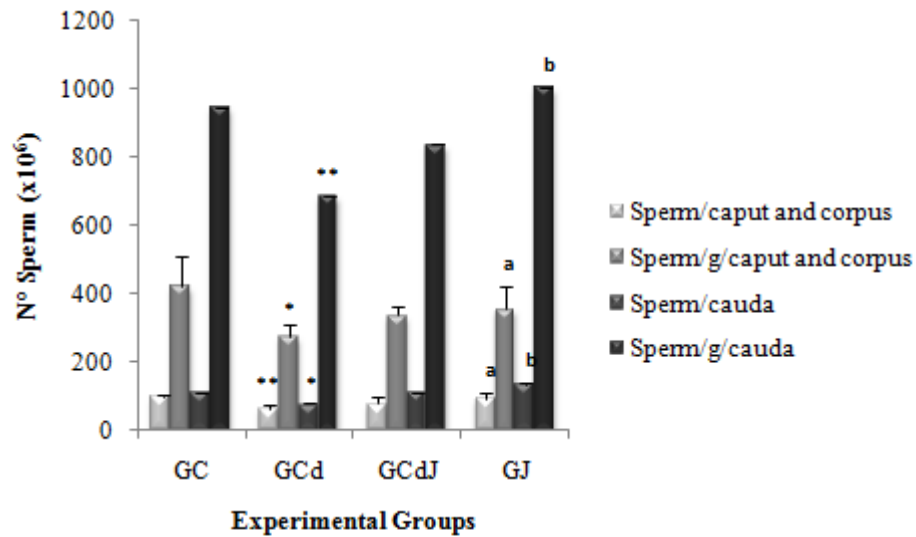
## FIGURES AND TABLES



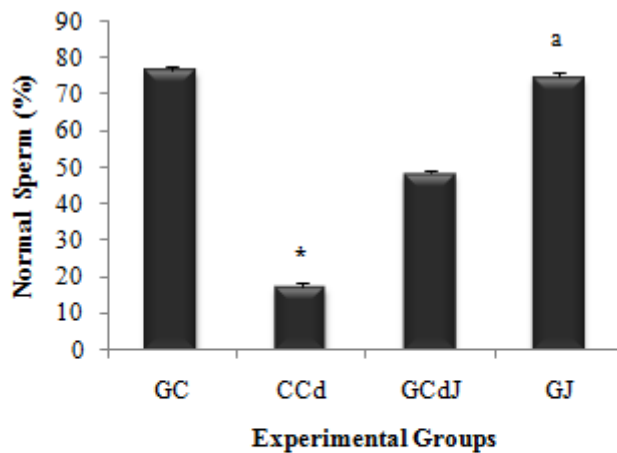
**Figure 1. Daily sperm production.** \* $p < 0,001$  with GC group; <sup>a</sup> $p < 0,05$  with GCd; <sup>b</sup> $p < 0,01$  with GCd group. According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.



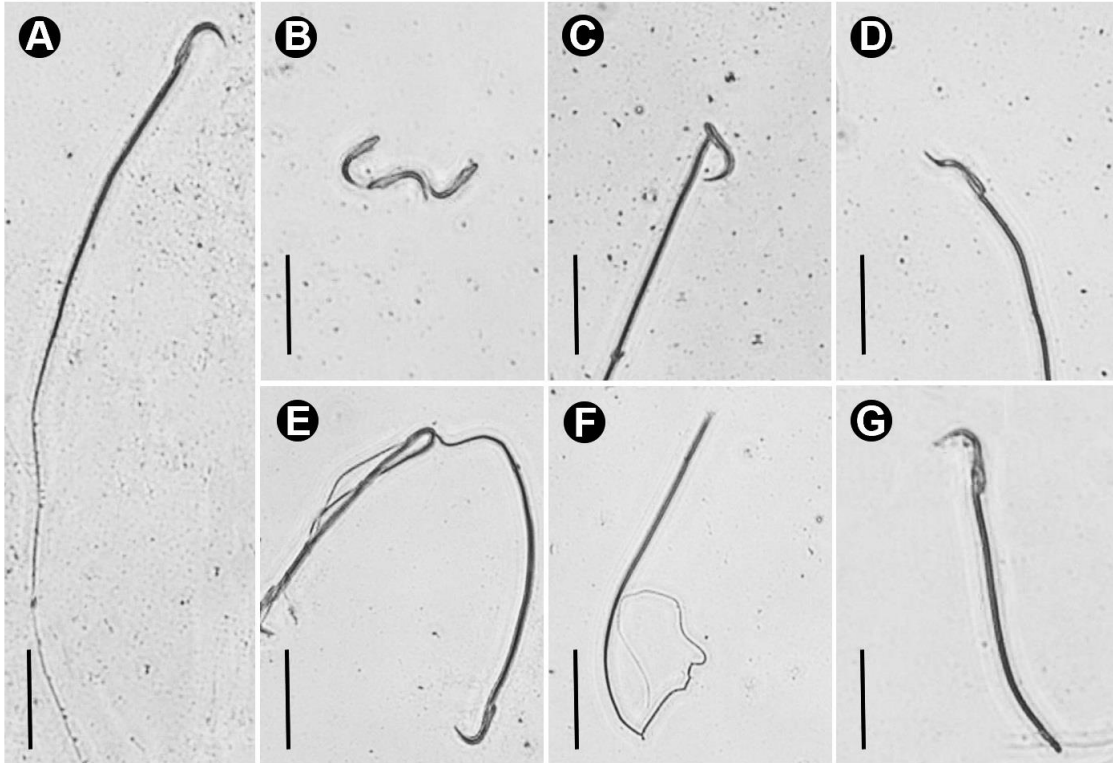
**Figure 2. Sperm count in testis.** \* $p < 0,001$  with GC group; <sup>a</sup> $p < 0,05$  with GCd; <sup>b</sup> $p < 0,01$  with GCd group. According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.



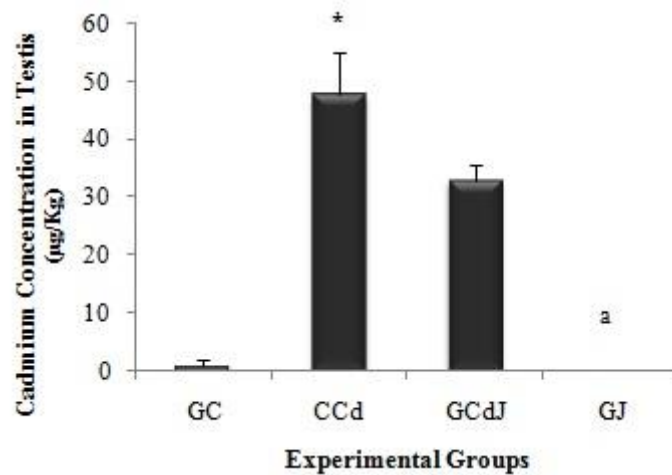
**Figure 3. Sperm count in epididymis portions.** \* $p < 0,01$  with GC group, \*\* $p < 0,001$  with GC group; <sup>a</sup> $p < 0,05$  with GCd; <sup>b</sup> $p < 0,01$  with GCd group. According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.



**Figure 4. Normal Sperm Percentage.** \* $p < 0,001$  with GC group, <sup>a</sup> $p < 0,001$  with GCd group. According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.



**Figure 5. Illustration of sperm standard found in GCd.** (A) Normal sperm morphology. Head alterations: (B) Isolated head. (C) Broken head. (D) Amorphous head. Flagellum alterations: (E) Winding flagellum. (F) Isolated flagellum. (G) Broken flagellum. Bar=20 $\mu$ m



**Figure 6. Cadmium concentration on testis tissue.** \* $p < 0,05$  with GC group, <sup>b</sup> $p < 0,01$  with GCd group. According to Kruskal-Wallis statistical test and Dunn's post-test, followed by Dunn's post-test.

**Table 1. Sperm Transit Time.** (mean value  $\pm$  standard deviation)

PARAMETERS	GC	GCd	GCdJ	GJ
STT ( $\times 10^6$ cells/day/caput and corpus)	2.11 $\pm$ 0.21	2.40 $\pm$ 0.46	1.94 $\pm$ 0.58	2.11 $\pm$ 0.55
STT ( $\times 10^6$ cells/day/cauda)	2.38 $\pm$ 0.41	2.95 $\pm$ 0.87	2.76 $\pm$ 0.96	3.04 $\pm$ 0.61

According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.

**Table 2. Oxidative stress markers.** (mean values  $\pm$  standard deviation)

PARAMETERS		GC	GCd	GCdJ	GJ
CAT	(U/mL)	432 $\pm$ 36.85	369 $\pm$ 66.67	376 $\pm$ 103.81	400 $\pm$ 79.90
SOD	(U/mL)	0.12 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01
MDA	( $\mu$ Mol/mL)	21.47 $\pm$ 5.48	24.34 $\pm$ 6.64	20.31 $\pm$ 8.04	22.23 $\pm$ 4.05
GSH	(nMol/mL)	86.68 $\pm$ 11.97	98.74 $\pm$ 9.00	104.56 $\pm$ 9.54	97.88 $\pm$ 5.28

According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.

## REFERENCES

- Abe, L.T., Mota, R.V., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., 2007. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 394-400.
- Abd-Allah, A.R.A., Helal, G.K., Al-Yahya, A.A., Aleisa, A.M., Al-Rejaie, S.S., Al-Bakheet, S.A., 2009. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 73-81.
- Ada, American Dietetic Association., 2004. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104, p.814–826.
- Aikten, R.J., Curry, B.J., 2011. Redox regulation of human sperm function: from the physiological mcontrol of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & Redoz Signaling*, 14, 367-381.
- Aguiar, O., Gollücke, A.P., De Moraes, B.B., Pasquini, G., Catharino, R.R., Riccio, M.F., Ihara, S.S., Ribeiro, D.A., 2011. Grape juice concentrate prevents oxidative DNA damage in peripheral blood cells of rats subjected to a high-cholesterol diet. *British Journal of Nutrition*, 105, 694-702.
- Al-Azemi, M., Omu, F.E., Kehinde, E.O., Anim, J.T., Oriowo, M.A., Omu, A.E., 2010. Lithium protects against toxic effects of cadmium in the rat testes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 8, 469-479.
- Andrade, A. C. M., 2006. Ação do vinho tinto sobre o sistema nervoso simpático e a função endotelial em pacientes hipertensos e hipercolesterolêmicos. (Tese Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Anjo, D.F.C., 2004. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, 3, 145-154.
- Besecker, B., Bao, S., Bohacova, B., Papp, A., Sadee, W., Knoell, D.L., 2008. The human zinc transporter SLC39A8 (Zip8) is critical in zinc-mediated cytoprotection in lung epithelia. *American Journal Physiology*, 294, 1127–1136.
- Brunner, M., Albertini, S., Würigler, F.E., 1991. Effects of 10 known or suspected spindle poisons in the in vitro porcine brain tubulin assembly assay. *Mutagenesis*, 6, 65-70.
- Casalino, E., Calzaretti, C., Sblano, C., Landriscina, C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidants enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179, 37-50.
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., Drevet, J.R., 2010. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of Animal Science*, 88, 1321-1331.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H. Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., Eddy, E.M., 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature Genetics*, 28, 82-86.
- Domenechini, D.C.S.J., Lemes, S.A.F., 2011. Effects of wine components on cardiovascular function. *Nutrire*, 36, 163-176.
- Dragano, N.R.V., Marques, A.C., Cintra, D.E.C., Solon, C., Morari, J., Leite-Legatti, A.V., Velloso, L.A., Marostica-Junior, M.R., 2013. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. *British Journal of Nutrition*, 110, 447–455.

- Eddy, E.M., 2006. The Spermatozoon. In: Knobil, E., Neill, J. D. (Eds) The physiology of reproduction. Raven Press, New York, pp. 3-54.
- El-Shahat, A.E., Gabr, A., Meki, A.R., Mehana, E.S., 2009. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract. *International Journal of Morphology*, 27, 757-764.
- Eybl, V., Kotyzova, D., Koutensky, J., 2006. Comparative study of natural antioxidants – curcumin, resveratrol and melatonin – in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology*. 225, 150-156.
- Favareto, A.P.A., Fernandez, C.D.B., Da Silva, D.A.F., Anselmo-franco, J.A., Kempinas, W.G., 2011. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peripuberty. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 109, 85-96.
- Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I., 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*. 31, 435-445.
- Gupta, R. S., Gupta, E. S., Dhakal, B. K., Thakur, A. R., Ahnn, J., 2004. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium – induced reactive oxygen species. *Molecules and Cells*, 17, 132-139.
- Ho, C.T., Rafi, M.M., Ghai G., 2010. Substâncias bioativas: nutracêuticas e tóxicas. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. (Eds) *Química de alimentos de Fennema*. Artmed, Porto Alegre, pp. 585-608.
- Hu, F.B., 2013. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 544S–551S.
- Jones, M.M., Cherian, M.G., 1990. The search for chelate antagonists of chronic cadmium intoxication. *Toxicology*. 62, 1-25.
- Juan, M.E., González-Pons, E., Munuera, T., Ballester, J., Rodríguez-Gil, J.E., Planas, J.M., 2005. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *Journal of Nutrition*, 135, 757-760.
- Kanous, K.S., Casey, C., Lindemann, C.B., 1993. Inhibition of microtubule sliding by Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>: evidence for a differential response of certain microtubule pairs within the bovine sperm axonema. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 26, 66-76.
- Kempinas, W., Suarez, J., Roberts, N., Strader, L., Ferrell, J., Goldman, J., and Klinefelter, G., 1998. Rat Epididymal Sperm Quantity, Quality, and Transit Time after Guanethidine-Induced Sympathectomy 1. *Biology of reproduction*. 59, 890-896.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Hikim, A.P.S., Clegg, E. D., 1990. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater; 1990.
- Laberg, R.M., Boissonneault, G., 2005. Chromatin remodeling in spermatids: a sensitive step for the genetic integrity of the male gamete. *Archives of Andrology*, 51, 125-133.
- Makenzie, G.G., Delfino, J.M., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2009. Dimeric procyanidins are inhibitors of NF-κβ-DNA binding. *Biochemical Pharmacology*, 78, 1252-1262.
- Messaoudi, I., Hammouda, F., El Heni, J., Baati, T., Sai, D. K., 2010. Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. *Experimental and Toxicology Pathology*, 62, 281–288.
- Monsefi, M., Alaei, S., Moradshahi, A., Rohani, L., 2010. Cadmium-Induced Infertility in Male Mice. *Environmental Toxicology*, 25, 94-102.

- Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Conrad, M., Drevet, J.I.R., Koce, A., 2012. Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice. *Plos One*, 7, 1-15.
- Ola-Mudathir, K.F., Suru, S.M., Fafunso, M.A., Obioha, U.E., Faremi, T.Y., 2008. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 3604-3611.
- Oliveira, H., Spanò, M., Santos, C., Pereira, M. L., 2009. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reproductive Toxicology*. 28, 550–555.
- Pires, V.C., Gollücke, A.P., 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. *British Journal of Nutrition*, 9, 1-10.
- Predes, F.S., Diamante, M.A.S., Dolder, H., 2010. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 91, 125-131.
- Robb, G.W., Amann, R.P., Killian, G. J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, P.B., Reilly, P.E., Williams, D.J., Moore, M.R., 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters*, 137, 65-83.
- Scollon, E. J., Starr, J. M., Godin, S. J., DeVito, M. J., Hughes, M. F., 2009. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome P450 isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*, 37, 221-228.
- Seed, J., Chapin, R. E., Clegg, E. D., Dostal, L. A., Foote, R. H., Hurtt, M. E., Klinefelter, G. R., Makris, S. L., Perreault, S. D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K. A., Veeramachaneni, D. N. R., Wise, L. D., 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology*. 10, 237-244.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Siu, E.R., Mruk, D.D., Porto, C.S., Cheng, C.Y., 2009. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 240-249.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, T., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., Okabe, M., Nishimune, Y., 2005. HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular Cell Biology*, 25, 7107-7109.
- Wang, Q., Sun, A.Y., Simonyi, A., Miller, D.K., Smith, R.E., Luchtefeld, R.G., Korthuis, R.J., Sun, G.Y., 2009. Oral administration of grape polyphenol extract ameliorates cerebral ischemia/reperfusion-induced neuronal damage and behavioral deficits in gerbils: comparison of pre- and posts ischemic administration. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 369–377.
- Wang, L., Xu, T., Lei, W.W., Liu, D.M., Li, Y.J., 2011. Cadmium-Induced Oxidative Stress and Apoptotic Changes in the Testis of Freshwater Crab, *Sinopotamon henanense*. *Plos One*. 6, 1-8.



- Wang, W., Sun, Y., Liu, J., Wang, J., Li, Y., Li, Y., Li, H, Zhang, W., 2012. Protective effect of theaflavins on cadmium-induced testicular toxicity in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3243-3250.
- Ward, W.S., Coffey, D.S., 1991. DNA packing and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology Reproduction*, 44, 569-574.
- Who. Cadmium (Environmental Health Criteria No. 134). Geneva: WHO;1992.
- Wong, C.H., Cheng, C.Y., 2005. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 71, 263–296.
- Wong, C.H., Mruk, D.D., Lui, W.Y., Cheng, C.Y., 2004. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *Journal of Cell Science*, 117, 783–798.
- Xu, L.C., Sun, H., Wang, S.Y., Song, L., Chang, H.C>, Wang, X.R., 2005. The roles of metallothionein on cadmium-induced testes damages in Sprague–Dawley rats. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 20, 83-87.
- Zanato, V.F., Martins, M.P., Anselmo-Franci, J.A., Petenusci, S.O., Lamano-Carvalho, T.L., 1994. Sexual Development of male Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27, 1273-1280.
- Zini, A., Phillips, S., Courchesne, A., Boman, J.M., Baazeen, A., Bissonnette, F., Kadoch, I.J., Gabriel, M.S., 2009. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*. 91, 2495-2500.
- Zorzano, A., Herrera, H., 1990. In vivo ethanol elimination in man, monkey and rat: A lack of relationship between the ethanol metabolism and the hepatic activities of alcohol and aldehyde dyhydrogenases. *Life Sciences*, 46, 223-230.

### **3.2. Grape Juice Concentrate Protects Testis Morphology After CdCl<sub>2</sub> Induced Toxicity.**

Celina de A. Lamas<sup>1</sup>, Andrea P.B. Gollücke<sup>2</sup>, Heidi Dolder<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Structural and Functional Biology, State University of Campinas,  
Campinas – SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Biosciences, Federal University of Sao Paulo, Santos – SP, Brazil.

## **Abstract**

Grape products have been highlighted as important sources of bioactive compounds, having anti-inflammatory, antioxidant and metal chelating properties. On the other hand, a relevant part of the world population is chronically exposed to cadmium either by inhalation or food and water intake. Considering the maintenance of tissue morphology essential for sperm development, in this study we analyzed the protective effect of grape juice concentrate (G8000<sup>®</sup>) consumption on testicular morphology of rats exposed to ClCd<sub>2</sub>. In order to evaluate this effect, male *Wistar* rats, 50 days old, ingested G8000<sup>®</sup> (2g/Kg/day) until they have completed one spermatogenic cycle in adult life (136 days old). ClCd<sub>2</sub> was injected intraperitoneally (1,2 mg/Kg) when the animals were 80 days old. Furthermore, groups receiving either G8000<sup>®</sup>, ClCd<sub>2</sub> or without treatment were maintained. Here we described an evident disruption in testicular morphology by cadmium, with alteration in tissue component proportions, reduced Leydig cells and signs of an initial inflammatory process. The ultrastructural analysis showed greater damage, suggesting a delay in spermatogenesis. G8000<sup>®</sup> ingestion allowed the tissue architecture to be reestablished, as was corroborated by our stereological and morphometric findings. The G8000<sup>®</sup> associated to the metal revealed a significant reduction in ultrastructural alterations in relation to the group that received only the metal. In conclusion, our results demonstrated a positive response of testicular tissue contaminated with cadmium to grape juice concentrate therapy, which preserves its architecture.

**Keywords: Polyphenols, Reproduction, Ultrastructure, Bioactive Compounds.**

## INTRODUCTION

Cadmium is a very toxic metal that causes a significant number of dysfunctions in animals and humans. Nowadays the exposure to this metal is very frequent, considering that it is present in pesticides, cigarettes and some foods, being considered by the World Health Organization one of the worst food pollutants (El-Shahat et al., 2009; Who, 1992).

Among reproductive parameters, this metal has been reported to cause irreversible damage to seminiferous epithelium and interstitial compartments mainly due to the oxidative stress induced (Liu et al., 1996). Considering the alterations triggered by cadmium, irreversible damage has been reported in Sertoli cells, blood-testicular barrier destabilization, lipid peroxidation, DNA fragmentation, loss of germ cells, reduction of testicular weight, destabilization of the body's antioxidant barrier, lower sperm motility and an increase of abnormal sperm morphology (Wang et al., 2011; Siu et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Kusakabe et al., 2008; Liu et al., 1996). Furthermore in Leydig cells, this metal can reduce synthesis and secretion of testosterone, without altering cell viability (Messaoudi et al., 2010). Moreover, the action of this metal includes an increase of inflammatory processes, with testicular edema, hemorrhage and necrosis, which can affect both epithelial and interstitial compartments (Blanco et al., 2007).

In order to reverse or diminish this alteration, many antioxidants have been studied, such as phenolic compounds, present in grapes (Mustali et al., 2009). These compounds are divided in two categories: flavonoids (such as anthocyanin and catechin) and non-flavonoids (example: resveratrol), which include simple compounds such as phenolic acids, and highly polymerized ones (Abe et al., 2007; Ho et al., 2010).

The benefits of these substances have already been described in the literature, as well as their antioxidant properties (scavenging oxygen reactive species), its capacity to modulate oxidative stress markers, to reduce blood pressure and anti-inflammatory properties (Ho et al., 2010; Mustali et al., 2009). Considering reproductive parameters, Jiang et al. (2008) demonstrated the increase in testicular weight and improvement of seminiferous tubule morphology of rats exposed to 2,5-hexanedione and resveratrol.

Based on the fact that daily ingestion of these substances in certain quantities can favorably modify metabolism, preventing changes that can lead to more severe damage (Anjo, 2004), the aim of this research was to evaluate the preventive effect of grape juice

concentrate consumption on testis morphology and ultrastructure of rats intoxicated with cadmium chloride.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Grape Juice Concentrate (GJC)**

To develop this study, the grape juice concentrate G8000<sup>®</sup> from Golden Sucos, Farroupilha-RS, Brazil, was used. This juice contains 5,4% of polyphenols (Lamas et al., unpublished result), which is more than occurs in a common juice, because it was processed by nanofiltration and evaporation of *Vitis Labrusca* grapes (Aguiar et al., 2011). A spectrum of G8000<sup>®</sup>, revealing the major compounds, can be found in Aguiar et al. (2011). The dosage used was the same as in Lamas et al. (unpublished result).

### **Animals**

The study was carried out with 50-days-old male *Wistar* rats obtained from the Central Animal Raising Unit of UNICAMP (State University of Campinas, Campinas-SP, Brazil). All the procedures were developed according to the Guide to Care and Use of Laboratory Animals and was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of Unicamp (2900-1). The animals were housed three per cage, with a 12h light-dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*.

### **Treatment**

Twenty-four rats were randomly divided in 4 groups, as described above:

GC: water and an intraperitoneal injection of saline 0.9%;

GCd: water and an intraperitoneal injection of CdCl<sub>2</sub>;

GCdJ: grape juice concentrate and an intraperitoneal injection of CdCl<sub>2</sub>;

GJ: grape juice concentrate and an intraperitoneal injection of saline 0.9%.

The water or GJC (2g/Kg body weight) were administered daily by gavage (Lamas et al., unpublished result) using 50 day old rats (beginning of sexual maturity, according to

Zanato et al. (1994)) until the end of one spermatogenic cycle (136 days old) (Russell et al., 1990). The CdCl<sub>2</sub> dose of 1.2 mg/Kg was injected (Predes et al., 2010) when rats were 80 days old (Zanato et al., 1994).

### **Tissue preparation for light and electron transmission microscopy**

The animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (10 and 80mg/kg, respectively), and the chest cavity opened to collect blood in heparinized tubes by puncture of the left ventricle. The animal was first perfused with saline (0.9%) to clear the vascular bed of the testis, then with Karnovsky (glutaraldehyde 5%, paraformaldehyde 2,5 % in sodium phosphate buffer 0.2 M, (pH 7.2)) for at least 20 minutes. The right testicle was removed and post-fixed overnight in the same solution. On the next day, the right testicle was embedded in glycol methacrylate. The fragments were sectioned at 3µm thickness and stained with toluidine blue/1% sodium borate, for light microscopy analyses.

For analysis with electron transmission microscopy, the samples were post-fixed in osmium tetroxide (1%), dehydrated in acetone and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were obtained and stained with uranyl acetate (2%) and lead citrate (0,2%), before observation with a transmission electron microscope (Zeiss, Leo 906).

### **Biometric and Morphometric Analysis**

The body weight gain was obtained subtracting the animal's weights at the end of the experiment by their initial weight. The relative testis weight, known as the Gonadosomatic Index (GSI), was calculated relating total testis weight and total body weight. To obtain a more precise parenchyma's weight, the albuginea weight was subtracted.

For morphometry, the Image Pro Plus software associated to an Olympus BX-40 microscope was used. The tubular diameter and epithelium height were measured for thirty tubules, randomly chosen at 100x magnification. The seminiferous tubule total length was calculated according to the following formula:  $TL=TVS/\pi R^2$ , considering TVS = total volume of seminiferous tubules and  $\pi R^2$  = area of the seminiferous tubule cross-sections.

## Stereological Analysis

Using the Image Pro Plus software associated to an Olympus BX-40 microscope, ten images were randomly obtained with 400x magnification, and the tubule epithelium, tubule lumens and interstitium were measured. Using a grid with 432 intersections over the images, the proportion of each component was obtained based on the total of intersections. Moreover, considering the density of this organ as 1 (1.03-1.04), the testicular weight was considered the same as the volume (França and Russel, 1998). This data was used to calculate the volume of these components.

To analyze the interstitium elements (lymphatic space, blood vessels, macrophages and Leydig cells), 2000 intersections were counted on images randomly obtained with 400x magnification, using a grid with 432 intersections. The proportion of each component was obtained based on the total of intersections. Moreover, to calculate their volume, the total volume of the testis was used. This was obtained considering the testicular volume to be the same as its weight, as explained above (França and Russel, 1998). In order to quantify the number of blood vessels, they were counted in 25 micrographs for each animal obtained with 400x magnification. For the blood vessels incompletely shown in the image, only those on the lower and right hand borders of the image were considered. The results were expressed in number of blood vessels per  $\mu\text{m}^2$ .

To verify the individual Leydig cell volume, 1000 intersections were counted on random images with 1000x magnification, using a grid with 432 intersections. The diameters of 10 nuclei were measured. The nuclear and cytoplasmic proportions were calculated based on 1000 intersections. Using this data and the following formulas, the nuclear and cytoplasmic volume was calculated: nuclear volume =  $4/3\pi R^3$ , considering R= nuclear radius and the cytoplasmic volume =  $(\% \text{ cytoplasm} \times \text{nuclear volume})/\% \text{ nucleus}$ . Adding these volumes, the individual Leydig cell volume could be calculated. The number of Leydig cells per testis was obtained dividing the total Leydig cell volume per individual Leydig cell volume. To calculate the number of Leydig cells per gram of testis, the number of Leydig cells per testis were divided by the respective parenchyma weight.

## **Statistical analysis**

The comparison of control values and other groups was done using the Kruskal-Wallis non-parametric test, followed by Dunn's post-test (Minitab®). The results were considered significant for  $p < 0.05$ . Moreover, for all values, the means  $\pm$  standard deviation was calculated.

## **RESULTS**

### **Biometric and morphometric data**

Body weight gain was reduced in all groups when compared to GC. On the other hand, final body weight was reduced only in groups GCdJ and GJ relative to GC. Moreover the GSI was not altered as also the testis absolute weight (Table 1).

Tubular diameter was reduced in all groups when compared to GC, as also occurred for epithelium height. Moreover, seminiferous tubule total length was lower in GCd in relation to other groups. This data is demonstrated in Table 1.

### **Stereological evaluations**

The volume of seminiferous tubules was reduced in GCd when compared to GC. A significative improvement in GCdJ related to GCd was noted considering the percentage of area occupied by seminiferous tubules. The tubular lumen percentage and volume were reduced in GCd relation to GC. Differences were seen in these parameters between groups GCd and GCdJ. Moreover, differences between GCd and GCdJ were verified in interstitium volume and percentage. Considering the epithelium no alterations were noted. All these results are illustrated in Table 2.

Considering interstitium components cadmium was able to alter Leydig cell volume and percentage; blood vessels volume, percentage and number; the lymphatic space percentage; and macrophages volume and percentage in GCd relative to GC. Differences between groups GCd and GCdJ were noted considering Leydig cell percentage, blood vessels volume and macrophages volume. Nevertheless differences were verified between



GCdJ and GC in Leydig cell volume and lymphatic space volume. All these data can be verified in Table 3.

Analyses of Leydig cells showed that in GCd the nuclear diameter, volume and percentage; cytoplasm volume and percentage; and in total volume of a Leydig cell were altered relative to GC. Differences between GCdJ and GCd were noted in nucleus and cytoplasm percentage, and total volume of a Leydig cell. Nevertheless differences between GCdJ and GC were verified in nuclear diameter, nucleus and cytoplasm volume, and total volume of a Leydig cell. No differences were noted considering the number of Leydig cells per testis or per gram of testis. These results are illustrated in Table 4.

### **Light and transmission electron microscopy (TEM) analysis**

The groups GC and GJ presented normal tissue architecture. In the tubular compartment, Sertoli cells were distributed just inside the tunic, together with the spermatogonia. Normal development of spermatogenesis was observed. In the interstitium, normal blood vessels, lymphatic space, Leydig cells and macrophages were verified. In these groups, the Leydig cells were morphologically normal, organized in clusters of polymorphic cells. These clusters were, in most of the sections, associated with blood vessels and macrophages. The overview of this architecture can be found in Figure 1 (A; B). The ultrastructure of the GC and GJ groups can be seen in Figure 2.

On the other hand, the GCd presented regions containing tubular degeneration and epithelium vacuolization. Testis ultrastructure showed many lipid droplets. In the adluminal compartment these droplets were denser and more numerous than in other groups. Large spaces between germ cells, possibly left by the degeneration of Sertoli cell prolongations were observed. Moreover it was possible to note a disorganization of the blood testis barrier, regions of degenerated cytoplasm and dilated tunic. After sperm release in the tubular lumen, a greater quantity of cytoplasm was seen to adhere to the flagella. This could be noted even for spermatozoa located more centrally in the lumen, at a certain distance from the epithelium, which is different from other groups. The mitochondria of the flagella were round, different from GC where they are elongated. During spermatid elongation, some vesicles appeared in the region that commonly is very compact and with little cytoplasm. The interstitium was considered disorganized with Leydig cells having compact

nuclei and irregular cytoplasm. Ultrastructure of the interstitium showed Leydig cells with less lipid droplets, altered mitochondrial shape and some breaks in the blood vessels. These general alterations in GCd are illustrated in Figure 1 (C-H) and its disorganized ultrastructure can be visualized in Figure 3.

The benefits of GJC were evident in these parameters. The administration of G8000<sup>®</sup> in intoxicated rats apparently reduced the amount and the size of vacuoles and tubular degeneration was not seen in a light microscopy analyses. Moreover, in GCdJ there were fewer regions of disorganized interstitium and compact Leydig nuclei. TEM analysis showed spaces between germ cells, some lipid droplets, and some regions with dilated tunic but they were less evident than in GCd. Moreover, just a few flagella showed a large amount of cytoplasm and round mitochondria. In the interstitium no alterations were noted in comparison to GC. Figure 1 (I; J) shows an overview of the structure from GCdJ. In Figure 4 GCdJ ultrastructure are illustrated.

## **DISCUSSION**

Cadmium aggressiveness to the reproductive system has already been described in the literature, but a large variety of results have been found (Predes et al., 2010; Gunnarsson et al., 2007; Lamas et al. unpublished result). Our research contributes to a vast data, showing new testicular responses to this metal.

Metallotioneins (MT) are related to cadmium toxicity, considering that they can bind to the metal, protecting the tissue (Predes et al., 2010; Xu et al., 2005). It is established that toxicity is the consequence of lower MT levels compared to the free cadmium in the tissue. Although it has been stated that testes are the male reproductive organ with the highest levels of MT, it is also described as the most sensitive organ, because of its unique vasculature (Siu et al., 2009; Prozialeck et al., 2008; Xu et al., 2005). In this way, Predes et al. (2010) considered that the variability of cadmium damages are related to the varying levels of defense found between the animals. Moreover Liu et al. (2001) considered that the level of cadmium developed alterations are related to the genetic background, and reported that some resistant strains do not produce visible testicular damage even at lethal doses.

As described by Pires et al. (2013) and Predes et al. (2010), the 1,2mg/Kg dosage was able to completely destroy the seminiferous tubules, with necrosis and presence of multinucleated spermatids. In our research, some regions with degenerated epithelium were observed with light microscopy, although the modifications were less severe than in the studies cited above. On the other hand, we found many alterations of the ultrastructure, and of morphometric and stereologic parameters, which show that even without an apparent aggressiveness this metal is very destructive to testis morphology, culminating in altered sperm formation. This fact highlights the importance and sensitivity of morphometric and stereological analyses, which are able to detect not clearly apparent alterations that could trigger severe consequences.

The reduced tubule and lumen as well as the increase of the interstitium are in agreement with lower epithelium height, tubular diameter and tubular length found in the group treated only with the metal. Sinha-Hikim et al. (1989) made a positive relation between seminiferous tubule diameter and the spermatogenic process. This statement corroborates with our findings. Moreover, it is known that cadmium can alter signaling pathways, triggering epithelium disruption and an inflammatory process (Siu et al., 2009). These alterations together with cadmium induced DNA damages (Wang et al., 2012) may alter stability and expression of adhesion proteins such as occludin, destabilizing tight junctions between germ and Sertoli cells (Siu et al., 2009). All these direct effects inflicted by cadmium could be related to the morphometric and stereological alterations described here. These data corroborate with the ultrastructural alterations where retarded sperm development was noted. Spaces between cells, regions of cytoplasmic degeneration, altered acrosome formation, liberation of sperm still surrounded by a generous cytoplasm, round mitochondria in the flagella, among other defects.

Prozialeck et al. (2006) reported that doses between 1-2mg/kg BW can cause testicular damage without pathological alterations. Instead, in our research the vacuolated epithelium, increased the proportion of macrophages and blood vessels levels are evidence of an incipient inflammatory process. Leite et al. (2013) also described an increase of macrophages in the testis of rats treated with 1,15mg/Kg BW of cadmium. The increase in blood vessel number, not just in volume or volumetric proportion, prompted us to consider

this the beginning of an angiogenic process. Moreover, alterations in the vascular system are considered time-dependent and promote more severe damages (Leite et al., 2013).

When an intense inflammatory process is described it is followed by reduction of the IGS and testis absolute weight, but the fact that it can cause a reduction in body weight gain are controversial (Pires et al., 2013, Leite et al., 2013, Predes et al., 2011). Pires et al. (2013) attributed the reduction in testis weight to organ atrophy, with the presence of necrosis, inflammatory infiltrates and vascular congestion. Moreover they described reduced body weight gain as a cause of lower organ relative weight. In our research, instead of a reduction in body weight gain by cadmium, there was no alteration of IGS. We attributed this to the fact that we noticed some signals of an initial inflammatory process with less intense tubular atrophy. On the other hand, a reduced body weight gain was reported. According to Levy et al. (2000) in cell culture, cadmium was able to alter leptin secretion. They considered that spontaneous leptin secretion is calcium-dependent, and cadmium as a calcium chelator can alter this process. Moreover, cadmium genotoxicity (Yang et al., 2003), can promote alterations in leptin gene expression.

Leydig cells are considered a target for cadmium (Yang et al. 2003). As in the present research, Leite et al. (2013) also found a reduction in the number of these cells in the testis of rats intoxicated with this metal. Corroborating this data, Yang et al. (2003) considered cadmium very toxic to Leydig cells, causing reduction in cell viability and DNA damage in cell culture. Leydig cells are responsible for testosterone, MT-1 and MT-2 production (Suzuki et al., 1998). According to McKenna et al. (1996) even low-doses of cadmium can alter this synthesis. Moreover, Pires et al. (2013) using the same cadmium dose as the present study observed reduction in testosterone levels. Considering testosterone essential to spermatogenesis and MT levels crucial to combat cadmium toxicity, alterations in Leydig cell number as well as their volume have been attributed to cadmium aggressiveness.

The stimuli of a healthy food pattern to avoid alterations of the organism has gained more attention in recent years (Lequinste et al., 2012, El-Shahat et al., 2009, Anjo, 2004). In this way, natural products such as grapes and their bioactive compounds have been widely studied (Pires et al., 2013, Jiang et al., 2008, Flechtner-Mors et al., 2004). The abilities of grape bioactive compounds as anti-inflammatory, antiviral and antitumor

properties are known in the scientific community (Fremont, 2000). Considering cadmium intoxication, the polyphenols ability as metal chelators contributes to the elimination of the metals, reducing tissue damage (Fraga et al., 2010). This chelation triggers a reduction in genotoxicity and the inflammatory process which are stimulated by heavy metals. Moreover, these molecules can interact with transcription factors or genes related to inflammation (Fraga et al., 2010, Makenzie et al., 2009). The reduced level of macrophages and blood vessels observed in GCdJ, as well as its improvement of morphology, corroborate this concept. Moreover, G8000<sup>®</sup> permitted the proportion of tubules and interstitium to remain similar to the control. Although, tubular diameter and epithelium height did not alter with juice ingestion, we noted greater tubular length. Thus, there is an increase in spermatogenic tissue which is a positive aspect.

Other characteristic of polyphenols that contributes to the GJC positive action, described in the present research, is their ability to interact with membranes altering their structure as well as physical and electric properties (Fraga et al., 2010). This fact permits functional alterations such as signaling pathways related to membrane receptors and improvement of the chelating ability (Fraga et al., 2010).

In our research we could verify GJC positive effects on testis morphology against cadmium intoxication. Grape juice concentrate was able to improve Leydig cell number, as well as their total volume. According to Juan et al. (2004) resveratrol, a bioactive compound from grapes, can stimulate FSH, LH and testosterone production. Moreover, according to these authors, this molecule can interact with estrogen receptors inducing secretion of gonadotrophins and testosterone. An improvement in the testosterone level was demonstrated by Pires et al. (2013) using GJC against cadmium toxicity. We considered that Leydig cell reestablishment is related to better hormonal levels (not analyzed).

All these data, corroborate with our ultrastructural findings where we noted an improvement in the spermatogenic tissue in GCdJ relative do GCd. The areas with intracellular spaces, increased lipid droplets as well as tissue degeneration were much reduced. Moreover, we found no alterations in acrosome formation and sperm liberation.

The data considering grape or its bioactive compounds which effect on the reproductive system is very limited. Our results showed that grape juice concentrate could reduce body mass gain. Flechtner-Mors et al. (2004) demonstrated that grape juice

consumption reduced obese people's body weight. Instead of the high energy intake provided by juice, which has a large amount of glycosides, these authors demonstrated reduced ingestion of food. This tendency could also have contributed to reduced body weight gain in GCdJ in our study.

Considering testicular parameters, Juan et al. (2005) demonstrated reduced tubular diameter and epithelium height with trans-resveratrol supplementation. However in this research an increase in tubular length and sperm production was also described (Lamas et al., unpublished result). The presence of narrow tubules in rats treated with resveratrol was verified by Jiang et al. (2008). In our findings, lower tubular diameter and epithelium height in GJ were found contrasting with no alterations in tubular length. Nevertheless in a previous study of our group (Lamas et al. unpublished result) we observed normal sperm production and morphology in the group treated with G8000<sup>®</sup> for the same time period. Thus our research is in agreement with data showing no toxic effect in GJC consumption (Pires et al., 2013).

In conclusion we demonstrated that grape juice concentrate consumption as an eating pattern exerts positive effects in intoxicated testicular morphology. Moreover, our study contributes to the scientific community, in revealing a new testis morphology response for this metal.

## FIGURES AND TABLES

**Table 1. Biometry and Morphometric Data.** (mean values  $\pm$  standard deviation)

PARAMETERS		GC	GCd	GCdJ	GJ
Body weight gain	(g)	296.7 $\pm$ 41.19	251.3 $\pm$ 18.35*	243.0 $\pm$ 30.98**	253.3 $\pm$ 30.30**
Final body weight	(g)	536.33 $\pm$ 52.64	482.67 $\pm$ 19.65	453.5 $\pm$ 40.60**	460.17 $\pm$ 38.45**
Testis absolute weight	(g)	1.99 $\pm$ 0.20	1.77 $\pm$ 0.23	1.85 $\pm$ 0.16	1.92 $\pm$ 0.27
GSI	(%)	0.373 $\pm$ 0.04	0.368 $\pm$ 0.05	0.409 $\pm$ 0.03	0.417 $\pm$ 0.05
Tubular Diameter	( $\mu$ m)	338.86 $\pm$ 20.54	308.11 $\pm$ 10.35*	297.48 $\pm$ 19.79**	302.93 $\pm$ 14.17**
Epithelium High	( $\mu$ m)	68.65 $\pm$ 2.19	44.66 $\pm$ 3.78***	52.90 $\pm$ 2.62*	56.85 $\pm$ 2.22*, a
Tubules Total Length	(m)	19.98 $\pm$ 3.42	15.68 $\pm$ 2.07*	21.17 $\pm$ 3.20 <sup>b</sup>	21.59 $\pm$ 2.58 <sup>b</sup>

\*p<0,05 with GC, \*\*p $\leq$ 0,01 with GC, \*\*\*p $\leq$ 0,001 with GC. <sup>a</sup>p $\leq$ 0,05 with GCd, <sup>b</sup>p $\leq$ 0,01 with GCd. According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.

**Table 2. Testicular Stereological Data.** (mean value  $\pm$  standard deviation)

PARAMETERS		GC	GCd	GCdJ	GJ
Seminiferous Tubules	(ml)	1.59 $\pm$ 0.16	1.28 $\pm$ 0.20*	1.51 $\pm$ 1.16	1.55 $\pm$ 0.25
	(%)	83.44 $\pm$ 2.46	77.32 $\pm$ 4.68	86.57 $\pm$ 2.31 <sup>c</sup>	85.25 $\pm$ 1.92 <sup>b</sup>
Epithelium	(ml)	1.15 $\pm$ 0.14	1.07 $\pm$ 0.18	1.14 $\pm$ 0.14	1.14 $\pm$ 0.18
	(%)	60.71 $\pm$ 2.52	64.26 $\pm$ 5.23	65.01 $\pm$ 2.46	62.52 $\pm$ 1.13
Lumen	(ml)	0.43 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.03***	0.38 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
	(%)	20.49 $\pm$ 2.80	13.06 $\pm$ 1.22***	21.56 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	22.73 $\pm$ 1.65 <sup>c</sup>
Insterstitium	(ml)	0.32 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	(%)	16.72 $\pm$ 1.98	22.67 $\pm$ 4.68	13.43 $\pm$ 2.31 <sup>c</sup>	14.75 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>

\*p<0,05 with GC, \*\*\*p $\leq$ 0,001 with GC. <sup>a</sup>p $\leq$ 0,05 with GCd, <sup>b</sup>p $\leq$ 0,01 with GCd, <sup>c</sup>p $\leq$ 0,001 with GCd. According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.

**Table 3. Stereological analysis of interstitium components.** (mean value  $\pm$  standard deviation)

PARAMETERS		GC	GCd	GCdJ	GJ
Leydig Cell	(ml)	0.09 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02*	0.06 $\pm$ 0.01*	0.07 $\pm$ 0.01
	(%)	27.74 $\pm$ 6.34	16.18 $\pm$ 3.62**	25.14 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>	26.27 $\pm$ 4.22 <sup>b</sup>
Blood Vessels	(ml)	0.06 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.06**	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	(%)	17.55 $\pm$ 8.03	37.55 $\pm$ 11.50**	24.72 $\pm$ 5.76	22.64 $\pm$ 3.97 <sup>a</sup>
Lymphatic Space	(ml)	0.16 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.02**	0.13 $\pm$ 0.02
	(%)	51.72 $\pm$ 6.21	31.92 $\pm$ 15.42**	46.94 $\pm$ 7.82	48.84 $\pm$ 3.68 <sup>a</sup>
Macrophages	(ml)	0.09 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.04*	0.08 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
	(%)	2.99 $\pm$ 0.73	5.19 $\pm$ 1.78*	3.5 $\pm$ 1.12	2.24 $\pm$ 0.32 <sup>c, +</sup>
N° Blood Vessels x 10 <sup>-5</sup>	( $\mu$ m <sup>2</sup> )	4.19 $\pm$ 0.09	5.7 $\pm$ 0.05**	5.22 $\pm$ 1.27	4.94 $\pm$ 0.09

\*p<0,05 with GC, \*\*p<0,01 with GC. <sup>a</sup>p<0,05 with GCd, <sup>b</sup>p<0,01 with GCd, <sup>c</sup>p<0,001 with GCd, <sup>+</sup>p<0,05 with GCdJ. According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.

**Table 4. Leydig Cell Stereology.** (mean value  $\pm$  standard deviation)

PARAMETERS		GC	GCd	GCdJ	GJ
Nuclear Diameter	( $\mu$ m)	6.90 $\pm$ 0.51	6.09 $\pm$ 0.31**	6.08 $\pm$ 0.20*	7.02 $\pm$ 0.49 <sup>b, ++</sup>
Nucleus	(%)	34.03 $\pm$ 1.35	43.15 $\pm$ 2.80**	34.70 $\pm$ 4.19 <sup>b</sup>	34.47 $\pm$ 2.92 <sup>b</sup>
	( $\mu$ m <sup>3</sup> )	174.61 $\pm$ 35.45	119.11 $\pm$ 19.60**	117.82 $\pm$ 12.08*	183.73 $\pm$ 40.95 <sup>b, ++</sup>
Cytoplasm	(%)	65.97 $\pm$ 1.35	56.85 $\pm$ 2.80**	65.3 $\pm$ 4.19 <sup>b</sup>	65.53 $\pm$ 2.92 <sup>b</sup>
	( $\mu$ m <sup>3</sup> )	338.51 $\pm$ 70.03	158.06 $\pm$ 32.16***	226.75 $\pm$ 50.17**	348.15 $\pm$ 62.50 <sup>c, +</sup>
Total Volume of a Leydig cell	( $\mu$ m <sup>3</sup> )	513.12 $\pm$ 104.37	277.17 $\pm$ 50.12***	344.58 $\pm$ 59.82 <sup>*, c</sup>	531.89 $\pm$ 99.03 <sup>a</sup>
Number Leydig/Testis	(x10 <sup>7</sup> )	17.30 $\pm$ 4.40	22.60 $\pm$ 9.90	17.32 $\pm$ 4.20	13.27 $\pm$ 2.53 <sup>b</sup>
Number Leydig/g Testis	(x10 <sup>7</sup> )	9.14 $\pm$ 2.37	13.29 $\pm$ 3.85	9.34 $\pm$ 2.21	7.50 $\pm$ 2.13 <sup>b</sup>

\*p<0,05 with GC, \*\*p<0,01 with GC, \*\*\*p<0,001 with GC. <sup>a</sup>p<0,05 with GCd, <sup>b</sup>p<0,01 with GCd, <sup>c</sup>p<0,001 with GCd, <sup>+</sup>p<0,05 with GCdJ, <sup>++</sup>p<0,01 with GCdJ. According to Kruskal-Wallis statistical test, followed by Dunn's post-test.



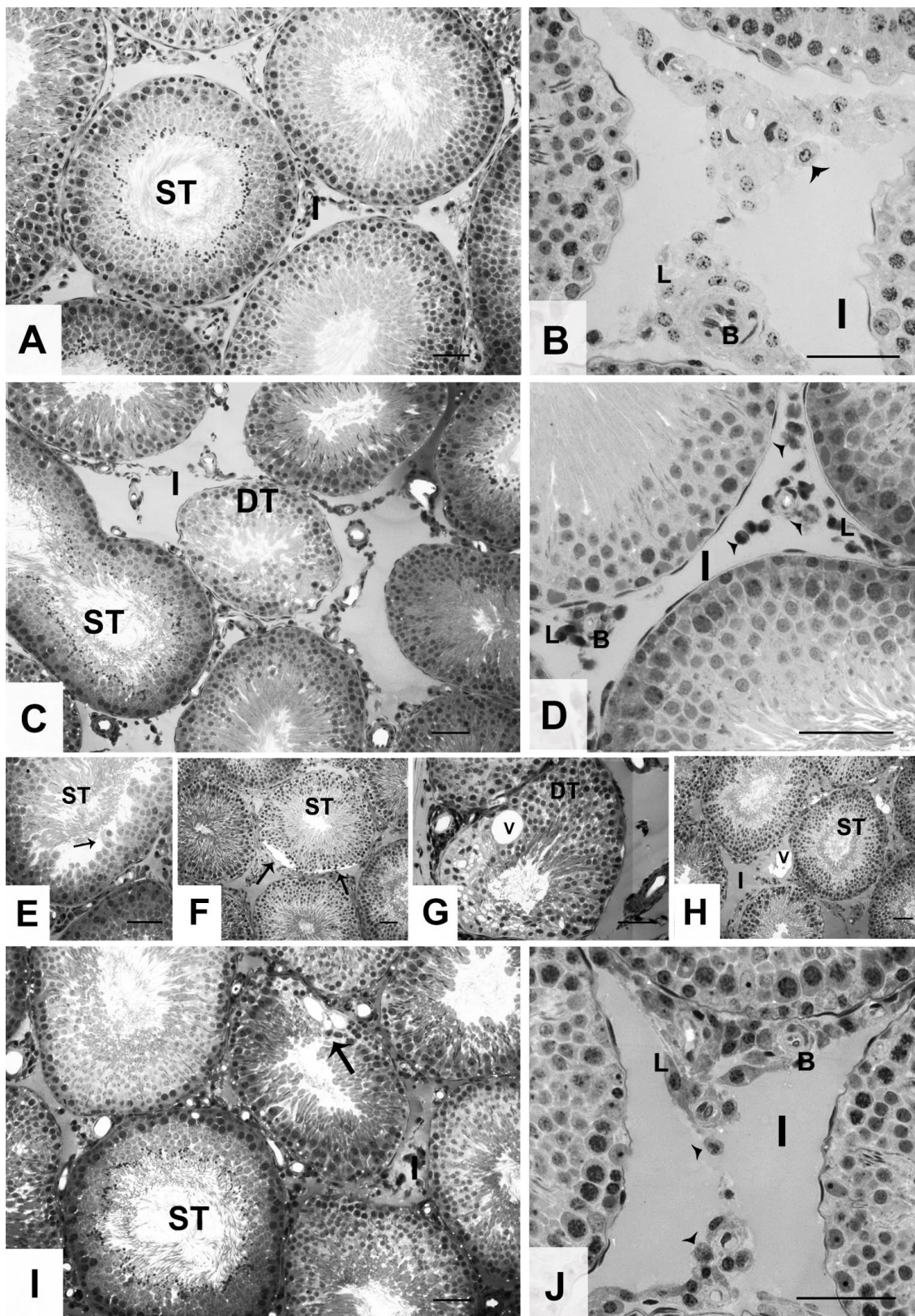


Figure 1. Illustration of testis tissue characteristic for the four experimental groups. (A-B) Representative areas for groups GC and GJ showing normal seminiferous tubules (ST) and interstitial (I) regions with Leydig cell (L) clusters, blood vessels (B) and macrophages (arrowhead). (C-D) General characteristics of GCd showing some degenerated tubules (DT), disorganized Leydig cells (L) with compact nuclei and increased macrophages (arrowhead). (E-H) Other alterations found in GCd group, showing loss of germinal cells (E-arrow), holes in epithelium (F-arrow), tubular degeneration (DT) with vacuoles (G-v) and interstitium vacuoles (H-v). (I-J) GCdJ tissue structure, representing more preserved epithelium, with small degenerated areas (arrow). In this group the interstitium presented a normal Leydig cell (L) distribution, as well as blood vessels (B) and macrophages (arrowhead). Bar=50 $\mu$ m.

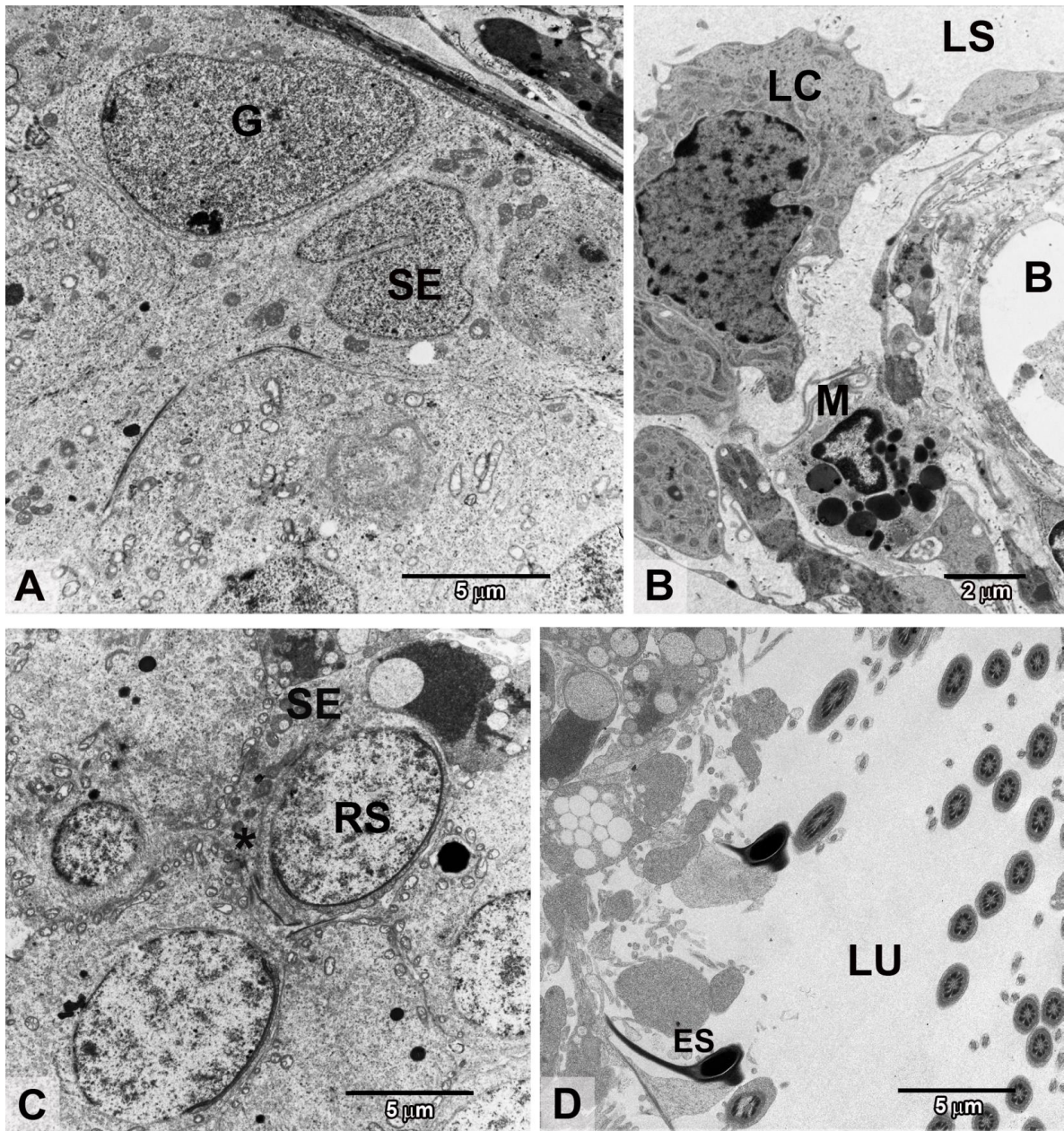


Figure 2. Representative areas of ultrastructure from GC and GJ groups. (A) Basal compartment showing spermatogonia (G) and Sertoli cells (SE). (B) Interstitial region, showing lymphatic space (LS), Leydig cells (LC), blood vessel (B) and macrophage (M). (C) Representative of adluminal compartment showing juxtapsed round spermatids (RS) and Sertoli cell (SE) prolongation (\*). (D) Lumen area (LU) showing elongated spermatid (ES) with regular shape and normal spermiation.

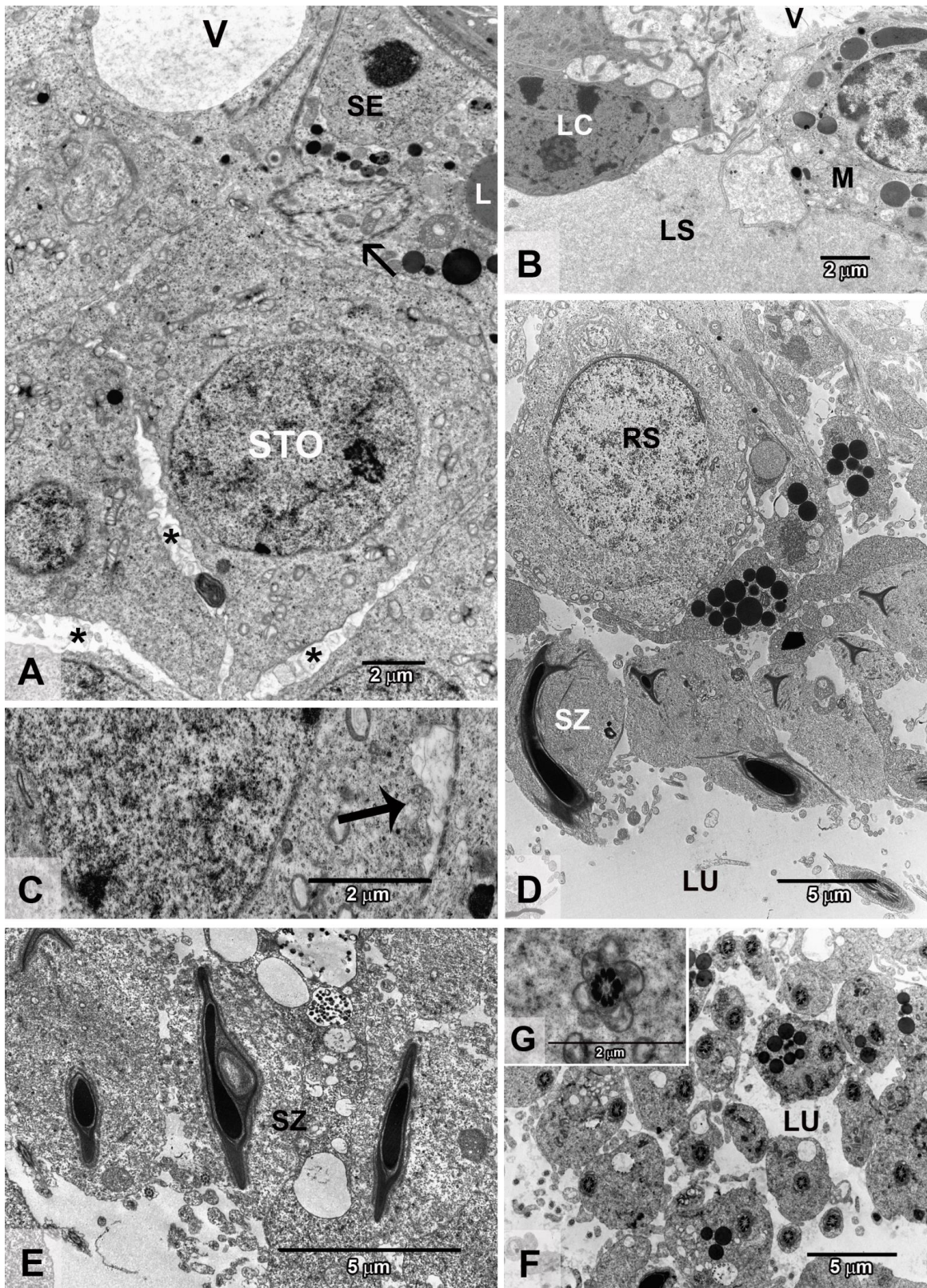


Figure 3. Ultrastructure of testis intoxicated with cadmium (GCd). (A) Basal compartment showing altered structure with an irregular blood testis barrier (thin arrow), lipid droplet (L) in Sertoli cell (SE) and spermatocyte (STO), vacuolated region (V) and intercellular spaces (\*). (B) Interstitium region showing vacuole (V) in lymphatic space (LS), Leydig cell (LC) and macrophage (M). (C) Cytoplasm degeneration (thick arrow). (D) Region of spermiation showing an immature spermatid (RS) and compact vesicles. (E) Vacuole on sperm head (SZ) with retained cytoplasm. (F) Lumen area (LU) showing remained cytoplasm around flagella and compact vesicles. (G) Detailed of round mitochondria around the axonema.

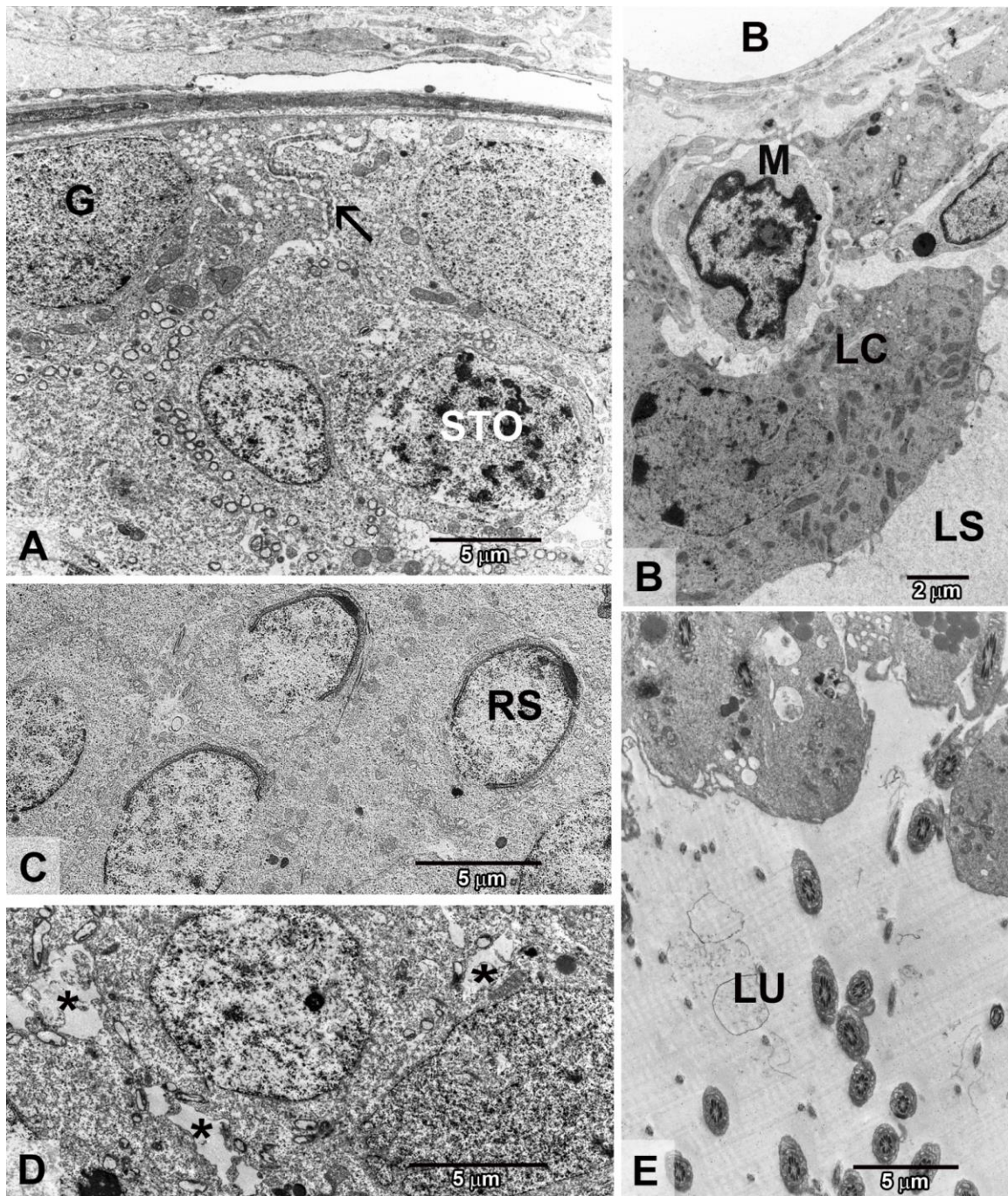


Figure 4. Testis ultrastructure of rats treated with cadmium and grape juice concentrate (GCdJ). (A) Basal compartment showing more preserved structure with spermatogonia (G), spermatocyte (STO), blood testis barrier (arrow) and smaller spaces between cells. (B) Interstitial region showing a preserved lymphatic space (LS), Leydig cells (LC), blood vessel (B) and macrophage (M). (C) Adluminal region with round spermatids (RS) normal morphology, showing a correct acrosomal development. (D) Intercellular spaces in the adluminal region (\*). (E) Lumen region (LU) showing spermiation with normal amount of

## REFERENCES

- Abe, L. T., Mota, R. V., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., 2007. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* Ciência Tecnologia de Alimentos, 27, 394-400.
- Aguiar, O., Gollücke, A.P., De Moraes, B.B., Pasquini, G., Catharino, R.R., Riccio, M.F., Ihara, S.S., Ribeiro, D.A., 2011. Grape juice concentrate prevents oxidative DNA damage in peripheral blood cells of rats subjected to a high-cholesterol diet. British Journal of Nutrition, 105, 694-702.
- Anjo, D. F. C., 2004. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. Journal Vascular Brasileiro, 3, 145-154.
- Blanco, A., Moyano, R., Vivo, J., Flores-Acuña, R., Molina, A., Blanco, C., Agüera, E., Monterde, J., 2007. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23, 96–101.
- El-Shahat, A. E., Gabr, A., Meki, A. R., Mehana, E. S., 2009. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract. International Journal of Morphology, 27, 757-764.
- Flehtner-Mors, M., Biesalki, H.K., Jenkinson, C.P., Adler, G., Ditschuneit, H.H., 2004. Effect of moderate consumption of white wine on weight loss in overweight and obese subjects. International Journal of Obesity, 28, 1420-1426.
- Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I., 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Molecular Aspects of Medicine. 31, 435-445.
- França, L.R., Russel, L.D., 1998. The testes of domestic animals. In: *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Ed J. Regadera & R. Martinez-Garcia. Madrid: Churchill Livingstone. Pp 197-219.
- Frèmont, L., 2000. Biological effects of resveratrol. Life Sci., 66, 663–673.
- Gunnarsson, D., Nordberg, G., Selstam, G., 2007. Differential effects of cadmium on the gene expression of seven transmembrane-spanning receptors and GAPDH in the rat testis. Toxicology Letters, 168, 51–57.
- Ho, C.T., Rafi, M.M., Ghai G., 2010. Substâncias bioativas: nutracêuticas e tóxicas. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. (Eds) Química de alimentos de Fennema. Artmed, Porto Alegre, pp. 585-608.
- Jiang, Y., Peng, T., Luo, Y., Ming-chuan, L., Tum-hua, L., Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexadione. Chinese Medicine Journal, 13, 1204-1209.
- Juan, M.E., González-Pons, E., Munuera, T., Ballester, J., Rodríguez-Gil, J.E., Planas, J.M., 2005. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. Journal of Nutrition, 135, 757-760.
- Kusakabe, T., Nakajima, K., Nakasato, K., Suzuki, K., Takada, H., Satoh, T., Oikawa, M., Arakawa, K., Nagamine, T., 2008. Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. Toxicology in Vitro, 22, 1469-1475.

- Leite, R.P., Predes, F.S., Monteiro, J.C., Freitas, K.M., Wada, R.S., Dolder, H., 2013. Advantage of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) Supplementation on Cadmium-induced Damages in Testis of Adult Wistar Rats. *Toxicology Pathology*, 41, 73-79.
- Lenquiste, S.A., Batista, A.G., Marineli, R.S., Dragano, N.R.V., Maróstica, M.R., 2012. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increase HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Research International*, 49, 153-160.
- Levy, J.R., Gyarmati, J., Lesko, J.M., Adler, R.A., Stevens, W., 2000. Dual regulation of leptin secretion: intracellular energy and calcium dependence of regulated pathway. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 278, E892-E901.
- Liu, J., Liu, Y., Michalska, A. E., Andy Choo, K. H., Klaassen, C. D., 1996. Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 136, 260-268.
- Liu, J., Corton, C., Dix, D.J., Liu, Y., Waalkes, M.P., Klaassen, C.D., 2001a. Genetic background but not metallothionein phenotype distates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176, 1-9.
- Makenzie, G.G., Delfino, J.M., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2009. Dimeric procyanidins are inhibitors of NF- $\kappa$ B-DNA binding. *Biochemical Pharmacology*, 78, 1252-1262.
- McKenna, I.M., Bare, R.M., Waalkes, M.P., 1996. Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *Toxicology*, 107, 121-130.
- Messaoudi, I., Hammouda, F., El Heni, J., Baati, T., Sai, D. K., 2010. Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. *Experimental Toxicology Pathology*, 62, 281-288.
- Mustali, M., Dohadwala, Joseph A., 2009. Vita Grapes and Cardiovascular Disease. *Journal of Nutrition*, 139, 1788-1793.
- Oliveira, H., Spanò, M., Santos, C., Pereira, M. L., 2009. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reproductive Toxicology*, 28, 550-555.
- Pires, V.C., Gollücke, A.P., 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. *British Journal of Nutrition*, 9, 1-10.
- Predes, F.S., Diamante, M.A.S., Dolder, H., 2010. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 91, 125-131.
- Predes, F.S., Monteiro, J.C., Matta, S.L.P., Garcia, M.C., Dolder, H., 2011. Testicular Histomorphometry and Ultrastructure of Rats Treated with Cadmium and *Ginkgo biloba*. *Biological Trace Element Research*, 140, 330-341.
- Prozialeck, W., Edwards, J., Woods, J., 2006. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sciences*, 79, 1493-1506.
- Prozialeck, W., Edwards, J., Nebert, D., Woods, J., Barchowsky, A., Atchison, W., 2008. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicological Sciences*, 102, 207-218.
- Siu, E.R., Mruk, D.D., Porto, C.S., Cheng, C.Y., 2009. Cadmium-induced Testicular Injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 240-249.
- Suzuki, J.S., Kodama, N., Molotkov, A., Aoki, E., Thyama, C., 1998. Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in rat testis. *Biochemical Journal*, 334, 695-701.

- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Hikim, A.P.S., Clegg, E. D., 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater; 1990.
- Sinha-Hikim, A.P., Amador, A.G., Klemcke, H.G., Bartke, A., Russell, L.D., 1989. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology*, 125, 1829–1843.
- Wang, L., Xu, T., Lei, W-W., Liu, D-M., Li, Y-J., 2011. Cadmium-Induced Oxidative Stress and Apoptotic Changes in the Testis of Freshwater Crab, *Sinopotamon henanense*. *Plos One*, 6, 1-8.
- Wang, W., Sun, Y., Liu, J., Wang, J., Li, Y., Li, Y., Li, H, Zhang, W., 2012. Protective effect of theaflavins on cadmium-induced testicular toxicity in male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 3243-3250.
- Who. Cadmium (Environmental Health Criteria No. 134). Geneva: WHO;1992.
- Xu, L.C., Sun, H., Wang, S.Y., Song, L., Chang, H.C>, Wang, X.R., 2005. The roles of metallothionein on cadmium-induced testes damages in Sprague–Dawley rats. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 20, 83-87.
- Yang, J., Arnush, M., Chen, Q., Wu, X., Pang, B., Jiang, X., 2003. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive Toxicology*, 17, 553-560.
- Zanato, V.F., Martins, M.P., Anselmo-Franci, J.A., Petenusci, S.O., Lamano-Carvalho, T.L., 1994. Sexual Development of male Wistar rats. *British. Journal of Medical and Biological Research*, 27, 1273-1280.

#### 4. CONCLUSÕES

- O cádmio na dose de 1,2 mg/Kg foi capaz de causar diversas disfunções tanto alterando a arquitetura testicular quanto reduzindo contagem espermática e sua morfologia. Além disso, é altamente capaz de se acumular neste órgão.
- A variabilidade da resposta testicular ao cádmio, relacionada a diversos fatores fisiológicos e genéticos, permite que mesmo sem a diferença significativa induzida pelo cádmio no nível dos marcadores de estresse oxidativo, o metal seja capaz de causar disfunção testicular por seus mecanismos de ação direta.
- A administração de concentrado de suco de uva de forma contínua é capaz de amenizar danos morfológicos causados por este metal, bem como melhorar a produção espermática e proteger a sua morfologia contra intoxicação por cloreto de cádmio.
- O concentrado de suco de uva isoladamente é capaz de promover alterações no organismo e em parâmetros testiculares, mas não há evidências de toxicidade.



## 5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* **Ciênc. tecnol. aliment.**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- ACHARYA, U.R.; MISHRA, M.; PATRO, J.; PANDA, M.K. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. **Reproductive Toxicology**, v.25, p.84-88, 2008.
- ALARCÓN A.C. Contaminación Minero Metalúrgica del Lago Chinchaycocha y del Rio Mantaro. **Instituto para el Desarrollo de la Pesca y la Minería. IPEMIN**, La Oroya, 1994.
- AL-AZEMI, M., OMU, F.E., KEHINDE, E.O., ANIM, J.T., ORIOWO, M.A., OMU, A.E. Lithium protects against toxic effects of cadmium in the rat testes. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.8, p.469-479, 2010.
- AMANN RP. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. **Environ Health Perspect.**, v.70, p.149-158, 1986.
- ANDRADE, A. C. M. **Ação do vinho tinto sobre o sistema nervoso simpático e a função endotelial em pacientes hipertensos e hipercolesterolêmicos.** 2006. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. vasc. bras.**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- AOKI, A.; HOFFER, A.P. Re-examination of the lesions in the rat testis caused by cadmium. **Biol Reprod.** v.18, p.579 –591, 1978.
- ARAÚJO, P. W. B.; QUINTANS, J.; LUCINDO, J.; VASCONCELOS, H. D.; ALMEIDA, J. R. G. S. Flavonóides e hipertensão. **Rev. bras. hipertens.**,v. 12, n. 3, p. 188-189, 2005.
- BERINGHS-BUENO, L. A. **Contaminação por metais tóxicos: medicação homeopática como quelante de mercúrio.** Tese apresentada ao Centro de Ensino Superior de Homeopatia IBEHE da Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo para obtenção do título de mestre em Homeopatia. São Paulo, SP, 2005.
- BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Quím Nova.** v.30, n.3, p. 651-666, 2007.
- BLACKBURN, D.M.; GRAY, A.J.; LLOYD, S.C.; SHEARD, C.M.; FOSTER, P.M.D. Comparison of the effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testes in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.92, p.54 – 64, 1988.
- BLANCO, A.; MOYANO, R.; VIVO, J.; FLORES-ACUÑA, R.; MOLINA, A.; BLANCO, C.; AGÜERA, E.; MONTERDE, J. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.23, p.96–101, 2007.
- BROUWER, A., LONGNECKER, M.P., BIRNBAUM, L.S., COGLIANO, J., KOSTYNIK, P., MOORE, J., Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. **Environ Health Perspect**, v.107, p.639-649, 1999.
- BU, T.; MI, Y.; ZENG, W.; ZHANG, C. Protective Effect of Quercetin on Cadmium-Induced Oxidative Toxicity on Germ Cells in Male Mice. **The anatomical record.** v.294, p.520–526, 2011.

- CHAPIN, R.E.; MORGAN, K.T.; BUS, J.S. The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5- hexanedione. **Exp Mol Pathol**, v.38, p.149 – 169, 1983.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol Rev.**, v.52, p.198-236, 1972.
- COLBORN, T., DUMANOSKI, D., MYERS, J.P. **Our Stolen Future**. New York: Binguin Books, 1996, 336 p.
- CONNOR, K.; RAMAMOORTHY, K.; MOORE, M.; MUSTAIN, M.; CHEN, S.; ZACHAREWSKI, T.; GILLESBY, B.; JOYEX, A.; BALAGUER, P. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) and antiestrogens: Structure - activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.145, p.111-123, 1997.
- CREAZY, D.M. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity, **Toxicology Pathology**, v.29, n.1, p.64-76, 2001.
- DOMENEGHINI, D. C. S. J.; LEMES, S. A. F. Effects of wine components on cardiovascular function. **Rev. Nutrire**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 163-176, 2011.
- EERTMANS, F.; DHOOGHE, W.; STUYVAERT, S.; COMHATRE, F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in vitro**, v.17, p.515-524, 2003.
- EIBENSTINER, L. A. D. C. SANZ, H. FRUMKIN, C. GONZALES & G. GONZALES. Lead exposure and semen quality among traffic police in Arequipa, **International Journal Occupational Environmental Health**, Peru, v.11, p.161-166, 2005.
- EL-AZIZ, M.I.; SAHLAB, A.M.; EL-KHALIK, M. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs fertility of male rats. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr**, v.101, n.6, p.230-232, 1994.
- ELBETIEHA, A.; DA'AS, S.I.; KHAMAS, W.; DARMANI, H. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.41, n.4, p.522-528, 2001.
- ELLIS K.J.; VARTSKY D.; ZANZI I.; COHN S.; Yasumuru S. Cadmium: in vivo measurement in smokers and non –smokers. **Science**, p.205:323, 1979.
- EL-MISSIRY, M.A. e SHALABY, F. Role of b-Carotene in Ameliorating the CadmiumInduced Oxidative Stress in Rat Brain and Testis. **J Biochem Molecular Toxicology**, v.14, n.5, p.238-243, 2000.
- EL-SHAHAT, A. E.; GABR, A.; MEKI, A. R.; MEHANA, E. S. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract. **Int. J. Morphol.**, v.27, n.3, p.757-764, 2009.
- FOLEY, G.L. Overview of Male Reproductive Pathology. **Toxicol. Pathol.**, v.29, n.1, p.49-63, 2001.
- FREEDMAN, J.E.; PARKER, C. III; LI, L.; PERLMAN, J.A., FREI, B., IVANOV, V.; DEAK, L.R.; IAFRATI, M.D.; FOLTS, J.D. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. **Circulation**. v.103, p.2792–8, 2001.
- FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; KINSELLA, J.E. Inhibition of LDL oxidation by resveratrol. **Lancet**. v.341, p.1103–4, 1993.
- GIEHL, M. R.; DAL BOSCO, S. M.; LAFLOR, C. M.; WEBER, B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. **Sci. med.**, v. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.

- GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v.9, n.4, p.411-416, 1998.
- GUNNARSSON, D.; NORDBERG, G.; SELSTAM, G. Differential effects of cadmium on the gene expression of seven transmembrane-spanning receptors and GAPDH in the rat testis. **Toxicol. Lett** v.168, p.51–57, 2007.
- GUPTA, R. S.; GUPTA, E. S.; DHAKAL, B. K.; THAKUR, A. R.; AHNN, J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium – induced reactive oxygen species. **Mol.Cells.**, v.17, n.1, p.132-9, 2004.
- GUTIÉRREZ MAYDATA, A. Vino, Polifenoles y Protección a la Salud. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara “Serafín Ruiz de Zarate Ruiz”. **Rev. cuba aliment. nutr.**, v. 16, n. 2, p. 134-141, 2002.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 12<sup>o</sup>ed. Filadélfia. Elsevier. 2006, 1091p.
- HO, C.T.; RAFI, M.M.; GHAI G. Substâncias bioativas: nutracêuticas e tóxicas. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, p. 585-608, 2010.
- JEDLINSKA-KRAKOWSKA, M.; BOMBA, G.; JAKUBOWSKI, K.; ROTKIEWICZ, T.; JANA, B.; PENKOWSKI, A., Impact of Oxidative Stress and Supplementation with Vitamins E and C on Testes Morphology in Rats, **Journal of Reproduction and Development**, v.52, p.203-209, 2006.
- JIANG, Y.G.; PENG, T.; LUO, Y.; LI, M.C.; LIN, Y.H., Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione. **Chin. Med. J.**, v.121, n.13, p.1204-1209, 2008.
- JONES, R.C. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. **Int. J. Androl.**, v.22, p.57-67, 1999.
- JUAN, M.E.; GONZÁLEZ-PONS, E.; MUNUERA, T.; BALLESTER, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; PLANAS, J.M., Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. **J. Nutr.**, v.135, p.757-760, 2005.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2012, 524p.
- KARA, H.; KARATAS, F.; CANATAN, H.; SERVI, K. Effects of exogenous metallothionein on acute cadmium toxicity in rats. **Bio. Trace. Elem. Res.**, v.104, n.3, p.223-32, 2005.
- KAVLOCK, R.J.; DASTON, G.P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L.E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M.J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D.M.; SINKS, T.; TILSON, H.A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. **Environ Health Perspect** v.104, p.715-740, 1996.
- KEFER, J.; AGARWAL, A.; SABANEGH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **International Journal of Urology**, v.16, p.449-457, 2009.
- KELCE, W.R.; WILSON, E.M. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. **J Mol Med** v.75, p.198-207, 1997.
- KHATTAB, H.A.H.; ABDALLAH, I.Z.A.; KAMEL, G.M. Grape seed extract alleviate reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. **Journal of American Science**, v.6, n.12, p.1200-1209, 2010.

- KIERSZENBAUM, A.L.; TREE, L.L. **Histologia e Biologia Celular: uma Introdução a Patologia**. 2<sup>o</sup>ed. Nwe York. Elsevier, 2008, 677p.
- KJELLSTROM, T.; NORDBERG, G.F. Kinetic model of cadmium metabolism. A Toxicological and Epidemiological Appraisal, **Boca Raton**, v.1, p.97-179, 1985.
- KUSAKABE, T.; NAKAJIMA, K.; NAKASATO, K.; SUZUKI, K.; TAKADA, H.; SATOH, T.; OIKAWA, M.; ARAKAWA, K.; NAGAMINE, T. Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p.1469-1475, 2008.
- LA DOU, J. **Medicina Laboral y Ambiental**. 2<sup>o</sup>Edición, México, Editora El Manual Moderno, 1999.
- LAFUENTE, A.; MARQUEZ, N.; PEREZ-LORENZO, M.; PAZO, D.; ESQUIFINO, A.I. Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male rats. *Exp biol Med.*, v.226, n.6, p. 605-611, 2001.
- LAFUENTE, A.; GONZALEZ-CARRACEDO, A.; ROMERO, A.; CANO, P.; ESQUIFINO, A.I. Cadmium exposure differentially modifies the circadian patterns of norepinephrine at the median eminence and plasma LH, FSH and testosterone levels. **Toxicol. Lett** v.146, p.175–182, 2004.
- LEVY B.S.; WEGMAN D.H., **Recognising and reventing Work Related Diseases**. 2<sup>o</sup> Edition. Boston,USA: Eds. Occupational Health, 1998.
- LIU, J.; LIU, Y.; MICHALSKA, A. E.; ANDY CHOO, K. H., KLAASSEN, C. D. Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.136, p.260-8, 1996.
- MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **J.Reprod. Fert.**, v.37, p.179-188, 1974.
- MANNA, P.; SINHA, M.; SIL, P.C. Cadmium induced testicular pathophysiology: Prophylactic role of taurine. **Reproductive Toxicology**, v.26, p.282–291, 2008.
- MAXCHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **The main phenolics of fruits**. In *Fruit Phenolics*; CRC Press: Boca Raton, FL, p. 1-98, 1990.
- MESSAOUDI, I.; HAMMOUDA, F.; EL HENI, J.; BAATI, T.; SAI, D. K. Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. **Exp Toxicol Pathol** v.62, p.281–288, 2010.
- MUSTALI, M.; DOHADWALA; JOSEPH A. Vita Grapes and Cardiovascular Disease **J. Nutr.** v.139, p.1788–1793, 2009.
- MORAES, N.V.; GRANDO, M.D.; VALERIO, D.A.R.; OLIVEIRA, D.P. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideano **Revista Brasileira de Toxicologia** v.21, n.1, p.1 – 8, 2008.
- NASCIMENTO, L.F.C.; FILHO, H.L.C.; PEREIRA, M.L.; BACCAN, N. Cadmium quantification in Brazilian mothers colostrum: a regional study. **Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.**, v.5, 2005.
- OLA-MUDATHIR, K.F.; SURU, S.M.; FAFUNSO, M.A.; OBIOHA, U.E.; FAREMI, T.Y. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3604-3611, 2008.
- OLIVA, A.; SPIRA, A.; MULTIGNER, L., Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. **Human Reproduction**, v.16, n.8, p.1768-1776, 2001.
- OLIVEIRA, H.; SPANÒ, M.; SANTOS, C.; PEREIRA, M. L. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. **Reproductive Toxicology**, v.28, p.550–555, 2009.

- OLIVEIRA, H.; LOUREIRO, J.; FILIPE, L.; SANTOS, C.; RAMALHO-SANTOS, J.; SOUSA, M.; PEREIRA, M. L., Flow cytometry evaluation of lead and cadmium effects on mouse spermatogenesis. **Reproductive Toxicology**, v.22, p.529-535, 2006.
- ORGBIN-CRIST, M.C.; JAHAD, N. The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. **Endocrinology**, v.103, p.46-53, 1978.
- PANDE, K.; MORAN, S.M.; BRADFIELD, C.A. Aspects of dioxin toxicity are mediated by interleukin 1-like cytokines. **Mol Pharmacol**. v.67, n.5, p.1393-8, 2005.
- PETRELLI, G.; MANTOVANI, A., Environmental risk factors and male fertility and reproduction. **Contraception**, v.65, p.297-300, 2002.
- PIRES, V.C.; GOLLÜCKE, A.P.; RIBEIRO, D.A.; LUNGATO, L.; D'ALMEIDA, V.; AGUIAR, O. Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: a chronic assay. **Br J Nutr**. v.9, p.1-10, 2013.
- PREDES, F. S.; DIAMANTE, M. A. S.; DOLDER, H., Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **Int. J. Exp. Path.**, v.91, p.125-131, 2010.
- RAMIREZ, A., Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos, **Anales de la Facultad de Medicina**, Lima, v.63, n.1, p.51-64, 2002.
- REYS, L.L. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. **Rev Facul Med Lisboa**. v.6, n.1, p.213-25, 2001.
- RICHBURG, J.H.; BOEKELHEIDE, K. MEHP rapidly alters both Sertoli cell vimentin . laments and germ cell apoptosis in young rat testes. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.137, p.42-50, 1996.
- ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. Cadmium: toxicology and analysis. a review. **Analyst** v.116, p.549-68, 1991.
- ROMANO, R.M.; ROMANO, M.A.; OLIVEIRA, C.A., Glifosato como desregulador endócrino químico, **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, Guarapuava, v.5, n.2, p.359-372, 2009.
- ROY-BURMAN, P.; WU, H.; POWELL, W.C.; HAGENKORD, J.; COHEN, M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer developmental. **Endocr Relat Cancer**, v.11, p.225-324, 2004.
- RUSSELL, L.D. et al. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **Int. J. Androl.**, v.16, n.1, p.83, 1993.
- SARADHA, B.; MATHUR, P.P., Effects of environmental contaminants on male reproduction. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.21, p.34-41, 2006.
- SATO, M.; TAKIZAWA, Y. Cadmium-binding proteins in human organs. **Toxicol. Lett.**, v.11, n.3-4, p.269-73, 1982.
- SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Cienc. tecnol. aliment.**, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.
- SELEVAN, S. G., L. BORKOVEC, V. L.SLOTT, Z. ZUDOVA, J. RUBES, D.P. EVERSON & S.D. PERREAU. Semen quality and reproductive health if young Czech men exposed to seasonal air pollution. **Environmental Health Perspective**, v.108, n.8, p.887-894, 2000.
- SHARPE, R.M.; SKAKKEBAEK, N.E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet.**, v.35, p.1392-1395, 1993.

- SHEINER, E.; HADAR, A.; SHOHAM-VARDI, I.; HALLAK, M.; KATZ, M.; MAZOR, M. The effect of meconium on perinatal outcome: a prospective analysis. **J Matern Fetal Neonatal Med** v.11, p.54-9, 2002.
- SIU, E.R.; MRUK, D.D.; PORTO, C.S.; CHENG, C.Y. Cadmium-induced Testicular Injury **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 238, n.3, p.240–249, 2009.
- SOSA, Z.Y.; PALMADA, M.N.; FÓSCOLO, M.R.; CAPANI, F.; CONILL, A.; CAVICCHIA, J.C. Administration of noradrenaline in the autonomic ganglia modifies the testosterone release from the testis using an ex vivo system. **Int. J. Androl.**, v.32, n.4, p.391-398, 2009.
- STOHS, S. J.; BAGCHI, D.; HASSOUN, E.; BAGCHI, M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.20, p.77-88, 2001.
- TAN, L.F., WANG, S.L., SUN, X.Z., LI, Y.N., WANG, Q.L., JI, J.M., CHEN, L.S., WANG, X.R. Effects of fenvalerate exposure on the semen quality of occupational workers. **Zhonghua Nan Ke Xue**, v.8, n.4, 273-276, 2002.
- VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R., Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.216, p.31-39, 2004.
- WANG, W., SUN, Y., LIU, J., WANG, J., LI, Y., LI, Y., LI, H, ZHANG, W. Protective effect of theaflavins on cadmium-induced testicular toxicity in male rats. **Food and Chemical Toxicology.** v.50, p.3243-3250, 2012.
- WANG, L.; XU, T.; LEI, W-W.; LIU, D-M.; LI, Y-J. Cadmium-Induced Oxidative Stress and Apoptotic Changes in the Testis of Freshwater Crab, *Sinopotamon henanense*. **Plos One** v.6, n.11, p.1-8, 2011.
- WANG, Q.; SUN, A.Y.; SIMONYI, A.; MILLER, D.K.; SMITH, R.E.; LUCHTEFELD, R.G.; KORTHUIS, R.J.; SUN, G.Y. Oral administration of grape polyphenol extract ameliorates cerebral ischemia/reperfusion-induced neuronal damage and behavioral deficits in gerbils: comparison of pre- and postischemic administration **J Nutr Biochem.** v.20, n.5, p.369–377, 2009.
- WEB, M. Cadmium. **Br. Med. Bull.**, v.31, p.246-50, 1975.
- WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants. 41<sup>st</sup> Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Tech Rep Ser 837 (Geneva, Switzerland), pp53, 1993.
- WHO. Cadmium (Environmental Health Criteria No. 134). Geneva: WHO;1992.
- WONG, E.W.P.; CHENG, A.Y. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. **Trends Pharmacol Sci**, v.32, p.290-299, 2011.
- WONG, C.; MRUK, D.D.; LUI, W.; CHENG, C.Y. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. **J Cell Science** v.117, p.783–798, 2003.
- YANG, H.S.; HAN, D.K.; KIM, J.R.; SIM, J.C. Effects of -Tocopherol on Cadmium-Induced Toxicity in Rat Testis and Spermatogenesis **J Korean Med Sci.** v. 21, p. 445-5, 2006.
- ZHAO, D.; PRITTS, E.A.; CHAO, V.A.; SAVOURET, J.F.; TAYLOR, R.N. Dioxin stimulates RANTES expression in an in-vitro model of endometriosis. **Mol Hum Reprod.** v.8, n.9, p.849-54, 2002.

## 6. ANEXO: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais/UNICAMP

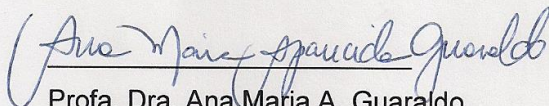
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

### CERTIFICADO

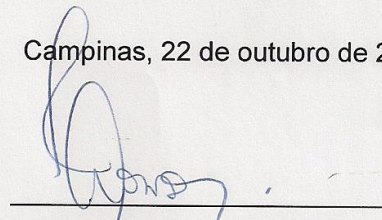
Certificamos que o projeto "EFEITO PROTETOR DO CONCENTRADO DE SUCO DE UVA EM DANOS REPRODUTIVOS INDUZIDOS PELO CLORETO DE CÁDMIO" (protocolo nº 2900-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder / Celina De Almeida Lamas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 22 de outubro de 2012.

Campinas, 22 de outubro de 2012.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente



Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>