

**O papel da vitamina C na prevenção dos danos induzidos pelo cádmio em parâmetros reprodutivos de ratos Wistar machos**

**Autora: Larissa Darrel Scolástico - Graduanda do curso de Nutrição - UNIFESP – Campus Baixada Santista.**

**Orientador: Prof. Dr. Odair Aguiar Junior – Depto. de Biociências – Campus Baixada Santista.**

**Colaboradores:**

**Prof. Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro – Depto. de Biociências – UNIFESP - Baixada Santista.**

**Leonardo Parreira Silva Nascimento – Depto. de Biociências – UNIFESP – Baixada Santista**

**Resumo**

O cádmio (Cd) é um metal com toxicidade amplamente reconhecida. Os órgãos reprodutivos, por terem grande número de divisões celulares, são extremamente suscetíveis a esses danos. O estresse oxidativo é um processo que ocorre em maiores proporções devido à exposição ao cádmio, caracterizado pela produção em excesso de espécies reativas de oxigênio, radicais livres e/ou a diminuição das atividades biológicas de enzimas antioxidantes. A vitamina C é considerada essencial para a integridade testicular e funções esteroideogênicas, protegendo os espermatozoides dos danos oxidativos. Neste trabalho propõe-se um delineamento experimental usando a vitamina C como preventivo à intoxicação pelo cádmio. Na presente proposta a vitamina C (Redoxon) foi administrada em animais que posteriormente foram expostos ao cádmio. Trinta e dois ratos Wistar machos com 90 dias de idade foram divididos em 4 grupos de 8 animais cada: Controle; Vitamina C; Cádmio e Cádmio + vitamina C. A vitamina C foi oferecida por gavagem diária de 200mg/Kg de peso corporal por 28 dias a partir dos 90 dias de idade. Os animais foram submetidos à uma injeção intraperitoneal de cloreto de Cd (1,2mg/Kg) aos 111 dias de idade, uma semana antes da eutanásia. Os animais foram sacrificados e tiveram seus órgãos-alvos coletados para análises biométricas (pesos) histológicas e fisiológicas (contagens espermáticas). Foi estimada a produção espermática diária, número de espermatozoides presentes na cauda do epidídimo, percentual de espermatozoides morfológicamente anormais, áreas e diâmetros tubulares testiculares, análise histopatológica e histomorfométrica testiculares e percentual de tecido, lúmen e interstício nos epidídimos.

**Palavras chave:** espermatogênese, vitamina C, cádmio, antioxidante.

## Introdução

A espermatogênese é o processo de produção de células germinativas masculinas que consiste na divisão e diferenciação gradativa, e com múltiplas etapas, de uma espermatogônia em uma célula haploide altamente especializada, conhecida como espermatozoide. As principais estruturas envolvidas na espermatogênese são os testículos, túbulos seminíferos e epidídimos. O seu sucesso depende das interações coordenadas entre as células de Sertoli, de Leydig, células peritubulares, macrófagos intersticiais e da vascularização sanguínea, reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-células de Leydig, essas células dão suporte estrutural, coordenam as divisões celulares e auxiliam na maturação do espermatozoide e desenvolvimento de suas funções. (AGARWAL *et al.*, 2015; AZENABOR *et al.*, 2015; HOGARTH e GRISWOLD, 2010).

Devido ao presente cenário de industrialização, a infertilidade masculina causada pela exposição a tóxicos ambientais se tornou um problema grave. Os seres humanos absorvem esses tóxicos por diversos meios, dentre eles a ingestão de alimentos e água contaminados, uso de produtos de consumo (produtos plásticos e cosméticos), inalação de ar poluído, consumo de cigarros e bebida alcoólica e tratamentos quimioterápicos (WONG e CHENG, 2011). O aumento do estresse oxidativo pode ser observado em até 80% dos homens inférteis e a exposição a tóxicos ambientais é um dos principais fatores que contribuem para esse aumento (ACHARYA *et al.*, 2008).

Dentre os contaminantes ambientais, temos o cádmio, um metal amplamente utilizado na indústria, seu uso em processos industriais e atividades diárias têm causado níveis alarmantes de contaminação ao meio ambiente (LIU *et al.*, 2013). Esse contaminante é utilizado na produção de tintas, baterias, cerâmicas, entre outros. Além disso, os resíduos industriais, combustíveis fósseis e combustão de carvão encontram-se entre os maiores contribuintes para o aumento de sua concentração no ar, água e solo. Estudos têm demonstrado que o cádmio tem inúmeros efeitos indesejáveis a saúde e pelo fato dos órgãos reprodutivos serem amplamente vascularizados, são também seus principais alvos, podendo sofrer modificação da expressão de genes relacionados à carcinogênese, indução da ruptura da barreira hemato-testicular por afetar as junções intercelulares das células de Sertoli, aumento do estresse oxidativo, dando início a necrose generalizada quando de exposições de dosagens mais altas, interferência em funções endócrinas, diminuição nos parâmetros antioxidantes, redução na contagem e motilidade dos espermatozoides, redução da testosterona circulante, redução do diâmetro tubular e da altura do epitélio seminífero, redução do peso testicular e incorporação do cádmio na cromatina de gametas em desenvolvimento (THOMPSON e BANNIGAN, 2008; BIZARRO *et al.*, 2003; WONG e CHENG, 2011; PREDES *et al.*, 2010).

A prescrição de antioxidantes orais tem se tornado comum entre os clínicos que prestam cuidados a casais inférteis. Baseia-se na premissa de que o estresse oxidativo seminal se deve, em

parte, à deficiência de antioxidantes seminais. Os antioxidantes têm papel moderador do estresse oxidativo, por facilmente transferirem átomos de hidrogênios aos radicais livres, tornando-os estáveis e reduzindo a oxidação (NOORI, 2012). A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel encontrada em fontes dietéticas e considerada um potente antioxidante. Está presente em concentrações mais elevadas no fluido seminal de homens férteis do que em homens inférteis e, portanto, assume-se que desempenha um papel importante como antioxidante seminal (COLAGAR *et al.*, 2009; ACHARYA *et al.*, 2008; DARE *et al.*, 2014).

Sendo assim, a vitamina C pode ser considerada essencial para a integridade testicular e funções esteroidogênicas, além de ser um potencial antioxidante no sêmen e proteger os espermatozoides dos danos oxidativos.

### **Justificativa**

Vários estudos têm demonstrado que a exposição ao cádmio desencadeia prejuízos nos parâmetros reprodutivos de animais tratados com diferentes doses e tempos. A infertilidade masculina decorrente de sua exposição pode ser devida à incorporação deste metal no citoplasma das células de Sertoli com consequente indução de apoptose, além de alterações mitocondriais nestas células (BIZARRO *et al.*, 2003; KUSAKABE *et al.*, 2008). Adicionalmente, desencadeando e potencializando esses efeitos deletérios, o cádmio está diretamente associado à ocorrência de estresse oxidativo. Devido ao grande impacto do estresse oxidativo na espermatogênese, alguns estudos têm sido desenvolvidos buscando avaliar a utilização de compostos antioxidantes como possível fator protetor a esse processo (JEDLINSKA-KRAKOWSKA *et al.*, 2006; AIBEK *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2012).

Ainda no contexto das substâncias antioxidantes, desde a década de 1920 estudos indicam que uma dieta deficiente em vitamina C provoca degeneração maciça do epitélio seminífero e lúmen dos túbulos seminíferos em diferentes cobaias (LINDSAY e MEDES, 1926). A suplementação da mesma pode atenuar ou prevenir o efeito do cádmio sobre as células germinativas, diminuindo a peroxidação lipídica, formação de espécies reativas de oxigênio e a apoptose, protegendo as células germinativas contra os danos deletérios de contaminantes (GUPTA *et al.*, 2004).

Sendo o estresse oxidativo testicular, um dos principais fatores que induz a apoptose das células germinativas, o testículo contém altas concentrações de antioxidantes protegendo-o contra o dano oxidativo (LUCK, 1995). A deficiência desses antioxidantes provoca perturbação da espermatogênese e do mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, sendo assim, os antioxidantes desempenham um papel fundamental na manutenção da espermatogênese e integridade fisiológica dos órgãos reprodutivos alvos de substâncias tóxicas (ANGULO *et al.*, 2011; CHINOY *et al.*, 1986).

Estudos indicam que o peso dos testículos e dos órgãos sexuais acessórios foi significativamente diminuído por algumas substâncias tóxicas, e que a administração de vitamina C inverteu essa redução (EL-MISSY *et al.*, 1999; DAS *et al.*, 2002; SAPRA *et al.* 1987). Na mesma linha, KINI *et al.* (2011) mostra que diversos estudos indicam o pré-tratamento com vitamina C como agente protetor, em diferentes tecidos, contra os danos induzidos pelo cádmio.

## **Objetivos**

Analisar os efeitos preventivos da Vitamina C, sabidamente um potente antioxidante, em parâmetros reprodutivos de ratos expostos ao Cloreto de Cádmio, visto que o cádmio induz danos - via estresse oxidativo - nesses parâmetros.

## **Métodos**

Trinta e dois ratos Wistar machos com 90 dias de idade, correspondente à fase adulta e a maturação sexual, foram distribuídos em 4 grupos de 8 animais cada: Controle (CTRL); Vitamina C; Cádmio(Cd) e Cádmio + Vitamina C. Dos 90 aos 118 dias de vida, os animais em tratamento com Vitamina C receberam o fármaco via gavagem na concentração de 200 mg/kg/dia. Os animais em tratamento com Cádmio foram expostos ao Cloreto de Cádmio aos 111 dias de vida via injeção intraperitoneal (IP) única na concentração de 1,2 mg/Kg. O mesmo procedimento foi feito para o grupo Vitamina C + Cádmio, estando o grupo Controle recebendo apenas água por gavagem e injeção intraperitoneal contendo solução salina à 0,9% por igual período para todos os grupos passarem pelo mesmo nível de estresse. Foram avaliados o ganho de massa corporal, parâmetros biométricos (pesos) dos órgãos e glândulas do aparelho reprodutor, produção espermática diária (PDE), contagem de espermatozoides na cauda do epidídimo, morfologia espermática e a presença de alterações histológicas testiculares. A análise estatística foi feita através de análise de variância (ANOVA), utilizando dois fatores fixos, com pós-teste de Tuckey. Para a análise semi-quantitativa realizada para a histopatologia testicular, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. O nível de significância estatístico atribuído foi menor ou igual a 0,05.

## **Resultados e discussão**

Nesse estudo foi observado menor ganho de massa corporal apenas nos animais submetidos ao tratamento com o cádmio e que consumiram vitamina C, sendo, putativamente um efeito sinérgico de ambas as substâncias, fato a ser confirmado posteriormente, visto que na literatura não há dados que corroborem esses achados até o momento.

A não alteração desse parâmetro nos animais contaminados pelo cádmio está de acordo com outros estudos de curto período (OLIVEIRA *et al.*, 2009; BLANCO *et al.*, 2007; PANDYA *et al.*, 2011; PIRES, 2013; OHTANI *et al.*, 2013). Analisando os dados da literatura em relação a essa

análise, leva-se a crer que o metal não é capaz de afetar esse parâmetro em poucos dias. A vitamina C, sozinha, também não mostrou, como esperado, influência nesse parâmetro.

Ao analisar o Índice Gonadossomático (IGS) e o peso testicular médio, os grupos que foram intoxicados pelo metal não apresentaram alterações significativas quando comparados com os grupos controle e aos grupos suplementados com vitamina C, assim como os achados de LAMAS *et al* (2015). Não houve também redução na massa da próstata pelo grupo intoxicado por cádmio, fato já observado por AMARA *et al* (2008), que também não encontraram alteração. Para os epidídimos também não se observou alteração de massa. A inalteração desses parâmetros biométricos, em conjunto, se deve, provavelmente ao tempo curto de exposição ao metal, pois em estudos de maior duração, uma severa queda no peso testicular (atrofia), epididimário e prostático já foi observado pelo nosso grupo (PIRES *et al.*, 2013).

Em relação a produção espermática diária (PDE) o presente estudo observou diminuição da PDE no grupo exposto ao metal, o mesmo aconteceu com outros trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, confirmando o malefício desse metal sobre a produção de espermátides. Além disso, esse cenário já é bem consolidado pela literatura (MONSEFI *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SAÏD *et al.*, 2010).

Esse processo possivelmente ocorre devido a redução da testosterona, hormônio responsável pela produção e manutenção da espermatogênese ou mesmo por alterações ocasionadas pelo metal às células do sistema reprodutivo, como danos às células que formam a barreira hematotesticular (MARETTOVÁ *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo proveniente da exposição ao cádmio pode ocasionar danos ao DNA e peroxidação lipídica, promovendo morfologia anormal nos espermatozoides (PIRES *et al* 2013). No presente estudo constatamos aumento da porcentagem dos espermatozoides morfologicamente anormais no grupo exposto ao cádmio em relação ao grupo controle, corroborando com os estudos realizados por PIRES *et al* (2013) como também estudo realizado por PREDES *et al* (2010).

Ainda no contexto testicular, o presente estudo difere dos estudos de curto prazo já realizados em nosso laboratório no que se refere à intensidade de alterações teciduais testiculares. Em 28 dias, os estudos pregressos (LAMAS, 2015; SCHONHAUS, 2015; MEDEIROS, 2017) mostram um comprometimento mais severo dos túbulos seminíferos, com epitélio em grande parte desconfigurado, apresentando ainda infiltrado inflamatório de moderado a intenso no interstício, o qual se mostrava amplamente espessado, além de uma expressiva congestão vascular. Embora difiram dos dados de nosso laboratório, a ausência de macroalterações severas testiculares após intoxicação pelo metal também foi vista por LAMAS *et al.* (2015) mesmo após 56 dias de intoxicação. Segundo PREDES *et al.* (2010) o grau de sensibilidade ao cádmio parece estar relacionado aos níveis da proteína metalotioneína, que interage com o metal, impedindo ou minimizando sua ação tecidual

danosa. É possível que determinadas ninhadas de animais possam ter maiores níveis dessa proteção natural e expressem menos os danos de exposição.

Também afetado pelo cádmio foram a morfologia e a fisiologia epididimárias. Menor quantidade de espermatozoides foi encontrada na cauda desse órgão. De algum modo o metal influenciou na fisiologia epididimária para alcançar tal efeito, visto que, em 7 dias, a queda na concentração epididimária de espermatozoides não pode ser reflexo da espermatogênese testicular prejudicada. Ainda no epidídimo a estereologia mostrou alterações histoarquiteturais com aumento de lúmen nos grupos contaminados por cádmio e diminuição de área intersticial.

A vitamina C mostrou-se como um protetor da função testicular possibilitando que os animais mantivessem níveis normais de PDE e morfologia espermática normal ao final do tratamento. O grupo que apenas consumiu vitamina C teve o menor percentual de espermatozoides anormais dentre todos os grupos.

Concentração normal de espermatozoides também foi encontrada na cauda epididimária dos animais que consumiram preventivamente a vitamina C.

Melhora em parâmetros reprodutivos com o uso dessa vitamina também foi descrito por SÖNMEZ *et al.* (2005). O mecanismo para essa proteção possivelmente se deva à atuação da vitamina C nos processos de esteroidogênese, possivelmente por mecanismos de controle positivo da expressão de genes para enzimas esteroidogênicas, como encontrado nos estudos de MURUGESAN *et al.* (2007).

Além disso, a vitamina C tem sido testada como antioxidante em várias condições teste na literatura em contextos testiculares e epididimários (KRISHNAMOORTHY *et al.* 2007; AGUIRRE-ARIAS *et al.*, 2017) e tem se mostrado fundamental no reequilíbrio e restabelecimento das condições redox que mitigam a ação pró-oxidante do Cádmio.

No presente trabalho, testamos pela primeira vez a vitamina C num contexto preventivo e as evidências, em especial a produção espermática, nos levam a concluir que o consumo prévio (preventivo) de vitamina, municia o organismo a combater de forma eficiente os efeitos danosos do cádmio, talvez (a ser testado) de forma mais eficiente que o consumo apenas após a intoxicação pelo metal (delineamento curativo).

### Referências Bibliográficas

- ACHARYA, U.R.; MISHRA M.; PATRO J.; PANDA, M.K. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. **Reproductive toxicology**, 25: 84-88, 2008.
- AGARWAL, A.; MULGUND, A.; HAMADA, A.; CHYATTE, M.R. A unique view on male infertility around the globe. **Reprod Biol Endocrinol**, 26: 13(1):37, 2015.
- AGUIRRE-ARIAS, M. V.; VELARDE V.; MORENO R. D. Effects of ascorbic acid on spermatogenesis and sperm parameters in diabetic rats. **Cell tissue Res**, 13 jun, 2017
- AIBEK, H.; AIBEK, Z.; RORA, S.; SEM, N.; AKBULUT, M. The effects of diabetes mellitus, age and vitamin E on testicular oxidative stress. **Fertility and Sterility**, 90(3):755-60, 2007.
- AMARA, S.; ABDELMELEK, H.; GARREL, C.; GUIRAUD, P.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L.; FAVIER, A.; SAKLY, M.; BEM RHOUMA, K. Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. **J Reprod Dev**, 54(2):129-34, 2008.
- ÂNGULO, C.; MALDONATO, R.; PULGAR, E.; MANCILLA, H.; CÓRDOVA, A.; VILLARROEL, F.; CASTRO, M. A.; CONCHA, A. I. Vitamin C and oxidative stress in the seminiferous epithelium. **Bio Res**, 44: 169:180, 2011.
- AZENABOR, A.; EKUN, A. O.; AKINLOYE, O. Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract. **J Reprod Infertil**, 16(3):123-129, 2015.
- BIZARRO, P.; ACEVEDO, S.; NIÑO-CABRERA, G.; MUSSALI-GALANTE, P.; PASOS, F.; AVILA-COSTA, M.R.; FORTOUL, T.I. Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. **Reproductive Toxicology**, 17(5):561-6, 2003.
- 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**, 23:96–101, 2007.
- CHINOY, N. J.; MEHTRA, R.R.; SEETHALAKSHMI, L.; SHARMA, J.D.; CHINOY, M.R. Effects os vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. **Int J Fertil**, 31: 232-9, 1986.
- COLAGAR, A.; MARZONY, E. T. Ascorbic Acid in Human Seminal Plasma: Determination and Its Relationship to Sperm Quality. **J. Clin. Biochem Nutr.**, 45, 144-149, 2009.
- DARE, B. J.; OYENLYL, F.; OLANLYAN, O.T. Role of Antioxidant in Testicular Integrity. **Annual Research & Review in Biology**, 4(7): 998-1023, 2014.

DAS, U.B.; MALLICK, M.; DEBNATH, J.M.; GHOST D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced gametogenic and androgenic disorders in male rats. **Asian J. Android**, 4:201-7, 2002.

EL-MISSY, M.A. Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, 124:233-7, 1999.

GUPTA, R. S.; JISUN, K.; GOMES, C.; OH, S.; PARK, J.; IM, W. B.; SEONG, J. Y.; AHN, R. S.; KWON, H. B.; SOH, J. Effect of ascorbic acid supplementation on testicular steroidogenesis and germ cell death in cadmium-treated male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 221: 57-66, 2004.

HOGARTH, C. A.; GRISWOLG, M. D. The key role of vitamin A in spermatogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, 120(4): 954-962, 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. **The Journal of reproduction and development**, 2(2):203-9, 2006.

KINI, R.; TRIPATHI, Y.; RAGHUVEER, C.V.; PAI, S.R.; RAMASWAMY, C.; KAMATH, P. Role of vitamin C as an antioxidant in cadmium chloride induced testicular damage. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, 2(3):484-488, 2011.

KRISHNAMOORTHY, G.; VENKATARAMAN, P.; ARUNKUMAR, A.; VIGNESH, R.C.; ARULDHAS, M.M.; ARUNAKARAN, J. Ameliorative effect of vitamins (alpha-tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. **Reproductive Toxicology**, 23; 239–245. 2007.

KUSAKABE, M.; KOHRI, S.; FUJII, H.; OOWADA, S.; ENDOH, N.; SUEISHI, Y.; SHIMMEI, M.; KOTAKE, Y. An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. **Analytical Biochemistry**, 15; 386(2):167-71, 2008.

LAMAS, C. A.; GOLLUKE, A. P. B.; DOLDES, H. Grape juice concentrate (G8000) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. **J. Exp. Pathol.**, 96, 301 – 310, 2015.

LINDSAY, B.; MEDES, G. Histological changes in the testis of the guinea pig during scurvy and inanition. **Am Anat.**, 37: 213-230, 1926.



- LIU, Q.; GU, J.H.; YUAN, Y.; LIU, X.Z.; WANG, Y.J.; WANG, H.D.; LIU, Z.P.; WANG, Z.Y.; BIAN J.C. Effect of cadmium on rat Leydig cell testosterone production and DNA integrity in vitro. **Biomed Environ Sci**, 26(9):769-73, 2013.
- LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLE, R.A. Ascorbic acid and fertility. **Bio Reprod.**, 52: 262-6, 1995.
- MARETTOVÁ, E.; MARETTA, M.; LEGÁTH, J. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: a review. **Anim Reprod Sci.**, 155:1–10. 2015.
- MEDEIROS, B. **Efeitos do consumo da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) liofilizada sobre os danos induzidos pelo cádmio em parâmetros reprodutivos de ratos Wistar**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2017.
- MONSEFI, M.; ALAEE, S.; MORADSHAHI, A.; ROHANI, L. Cadmium-induced infertility in male mice. **Environ Toxicol.**, 25(1):94-102, 2009.
- MURUGESAN, P.; MUTUSAMY, T.; BALASUBRAMANIAN, K.; ARUNAKARAN, J. Effects of vitamin C and E on steroidogenic enzymes mRNA expression in polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposed adult rats Leydig cells. **Toxicology**, 232:170:182, 2007.
- NOORI, S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. **Open access scientific reports**, 1(8):1-9, 2012.
- OHTANI, K.; YANAGIBA, Y.; ASHIMORI, A.; TAKEUCHU, A.; TANAKA, N.; TOGAWA, M.; HASEGAWA, T.; IKEDA, M.; MIURA, N. Influence of injection timing on severity of cadmium-induced testicular toxicity in mice. **The Journal of Toxicological Sciences**, 2013; 38(1):14550, 2013
- OLIVEIRA, H.; SPANÒ, M.; SANTOS, C.; PEREIRA, M. L. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. **Reproductive Toxicology**, 28:550–555, 2009.
- PANDYA, C.; PILLAI, P.; NAMPOOTHIRI, L.P.; BHATT, N.; GUPTA, S. Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. **Andrologia**, 44(1):813-22, 2011.
- PIRES, V.C.; GOLLUCKE, A.P.; RIBEIRO, D.A.; LUNGATO, L.; ALMEIDA, V.; AGUIAR JR O. Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: a chronic assay. **British Journal of Nutrition**, 2013.

PREDES, F. S.; DIAMANTE, M. A. S.; DOLDER, H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **Int. J. Exp. Path.**, 91:125-131, 2010.

SAÏD, L.; BANNI, M.; KERKENI, A.; SAÏD, K.; MESSAOUDI, I. Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. **Food Chem Toxicol.**, 48(10):2759-65, 2010.

SAPRA, M.; SHARMA, P.; KOTHARI, L.K. Effect of vitamin C deficiency on testicular structure in the guinea pig. **J Postgrad Med**, 33:69-73, 1987.

SCHONHAUS, J. P. **Investigação do potencial preventivo do extrato de maçã contra os danos induzidos pelo cádmio em parâmetros reprodutivos de ratos Wistar**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2015.

SINGH, P.; DEORA, K.; SANKHLA, V.; MOGRA, P. Curcumin rendered protection against cadmium chloride induced testicular damage in Swiss albino mice. **Journal of Cell and Molecular Biology**, 10(2):31-38, 2012.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**. 63, 2063-2072, 2005.

THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive Toxicology**, 25:304– 315, 2008.

WONG, P. W. E.; CHENG, Y. Impacts of environmental toxicants on male reproductive Dysfunction. **Trends Pharmacol Sci.**: 32(5): 290-299, 2011.

YANG, H.S.; HAN, D.K.; KIM, J.R.; SIM, J.C. Effects of alpha-tocopherol on cadmiuminduced toxicity in rat testis and spermatogenesis. **J Korean Med Sci.**, 21(3):445-51, 2006.