

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOÃO VITOR LOPES FERREIRA

**Avaliação da atividade antioxidante da polpa e do óleo do
açai da Mata Atlântica (*Euterpe edulis*) sobre a
morfofisiologia da célula de Leydig após a administração
aguda de cloreto de cádmio**

FEVEREIRO

2022

JOÃO VITOR LOPES FERREIRA

Avaliação da atividade antioxidante da polpa e do óleo do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis*) sobre a morfofisiologia da célula de Leydig após a administração aguda de cloreto de cádmio

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: Patologia Investigativa.
Orientador: Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes

Uberaba/MG

2022

JOÃO VITOR LOPES FERREIRA

Avaliação da atividade antioxidante da polpa e do óleo do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis*) sobre a morfofisiologia da célula de Leydig após a administração aguda de cloreto de cádmio

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: Patologia Investigativa.

24 de fevereiro de 2021

Banca Examinadora:

Profa. Dr^a. Angelica de Oliveira Gomes

Profa. Dr. Sérgio Luis P. da Matta

Prof. Dr Marcos de Lucca Moreira Gomes

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

F441a Ferreira, João Vitor Lopes
Avaliação da atividade antioxidante da polpa e do óleo do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis*) sobre a morfofisiologia da célula de Leydig após a administração aguda de cloreto de cádmio / João Vitor Lopes Ferreira. -- 2022.
119 f.: il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022
Orientador: Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes

1. Infertilidade masculina. 2. Metais pesados. 3. Fitoterapia. 4. Reprodução. 5. Hormônios esteroides gonadais I. Gomes, Marcos de Lucca Moreira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.697

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me conferir discernimento e serenidade para concluir mais uma etapa, a minha família, em especial a minha mãe Eliana, e amigos por todo suporte e compreensão dos meus momentos de ausência, ao professor Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes pela orientação, confiança, companheirismo e paciência oferecidos, a todos os membros do Laboratório de Interações Celulares (L.I.C), a secretaria e coordenação do programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PGCS) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, assim como a agência de fomento FAPEMIG e a Universidade Federal de Viçosa que tornaram esse trabalho possível.

RESUMO

A presença de altas concentrações de metais pesados no ambiente constitui hoje um problema global pois essas substâncias geram toxicidade em muitas funções biológicas, sendo o metabolismo enzimático potencialmente sensível a esses elementos. Neste estudo escolheu-se o cádmio como agente oxidante, pois os testículos são órgãos que sofrem com sua bioacumulação. Estudos descrevem alterações morfológicas e bioquímicas nos testículos de mamíferos, afetando a produção de testosterona pelas células de Leydig. Diversas enzimas estão relacionadas à síntese de androgênios a partir do colesterol, como a StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) e a citocromo P450. Neste estudo propôs-se a utilização do óleo e da polpa do açaí da Mata Atlântica, *Euterpe edulis*, como agentes antioxidantes, a fim de se mitigar os efeitos danosos do cádmio sobre as células de Leydig e, conseqüentemente, sobre o processo espermatogênico. Conforme esperado, a administração desse tratamento com óleo de *Euterpe edulis* não foi capaz de induzir toxicidade testicular. Esse resultado foi observado através da inalteração dos parâmetros morfométricos e histopatológicos tubulares dos animais tratados com óleo. No entanto, a diminuição da proporção de túbulos seminíferos normais, aliada às alterações morfológicas e estereológicas como o aumento do diâmetro, volume nuclear e citoplasmático das células de Leydig dos animais tratados com a polpa de *E. edulis*, sugerem a indução de dano ao parênquima testicular, possivelmente induzida pelo excesso de antocianinas, o que, por sua vez, provoca o chamado estresse reductor. Todavia são necessárias análises ultraestruturais e de marcadores celulares, como os de morte e proliferação celular, para determinação das alterações fisiológicas sofridas pelas células de Leydig, assim como elucidar os mecanismos de ação dos tratamentos propostos no parênquima testicular.

Palavras-chave: Infertilidade masculina. Metais pesados. Fitoterapia. Esteroidogênese. Reprodução

ABSTRACT

The presence of high concentrations of heavy metals in the environment is today a global problem because these substances generate toxicity in many biological functions, and the enzymatic metabolism is potentially sensitive to these elements. In this project, cadmium was chosen as the oxidizing agent, as the testes are organs that suffer from its bioaccumulation. Studies describe morphological and biochemical alterations in mammalian testes, affecting the production of testosterone by Leydig cells. Several enzymes are related to the synthesis of androgens from cholesterol, such as StAR and P450_{scc}. In this study, the use of oil and pulp from the Atlantic Forest açai, *Euterpe edulis*, was proposed as antioxidant agents, in order to mitigate the harmful effects of cadmium on Leydig cells and, consequently, on the spermatogenic process. The results, such as the unaltered tubular morphometric and histopathological parameters of the animals treated with oil, suggest that the administration of this treatment was not able to induce testicular toxicity. However, the decrease in the proportion of normal seminiferous tubules, combined with morphological and stereological changes such as the increase in diameter, nuclear and cytoplasmic volume of Leydig cells in animals treated with *E. edulis* pulp, suggest induction of damage to the testicular parenchyma, possibly induced by an excess of anthocyanins, which, in turn, causes the so-called reducing stress. However, ultrastructural and cell marker analyzes are necessary, such as those of cell death and proliferation, to determine the physiological changes suffered by Leydig cells, as well as to elucidate the mechanisms of action of the treatments proposed in the testicular parenchyma.

Key-words: Male infertility. Heavy metals. Phytotherapy. Oxidative stress. Leydig cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Palmeira Juçara (<i>Euterpe edulis</i>)	13
Figura 2. Obtenção da proporção nuclear e citoplasmática das células de Leydig	20
Figura 3. Obtenção da proporção tubular e intersticial	20
Figura 4. Diâmetro e volume nuclear das células de Leydig dos grupos tratados com óleo de <i>E. edulis</i>	24
Figura 5. Diâmetro e volume nuclear das células de Leydig dos grupos tratados com polpa de <i>E. edulis</i>	25
Figura 6. Histopatologia dos túbulos seminíferos dos animais tratados com óleo de <i>E. edulis</i>	28
Figura 7. Histopatologia dos túbulos seminíferos dos animais tratados com polpa de <i>E. edulis</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados biométricos dos camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratados com óleo de <i>E. edulis</i>	22
Tabela 2 – Dados biométricos dos camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratados com polpa de <i>E. edulis</i>	22
Tabela 3 – Parâmetros morfométricos dos túbulos seminíferos de camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratado com óleo de <i>E. edulis</i>	23
Tabela 4 – Parâmetros morfométricos dos túbulos seminíferos de camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratado com polpa de <i>E. edulis</i>	23
Tabela 5 – Estereologia e morfometria das células de Leydig de camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratados com óleo de <i>E. edulis</i>	26
Tabela 6 – Estereologia e morfometria das células de Leydig	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

As	Arsênio	ILS	Índice Leydigossomático
Ca	Cálcio	LDL	Lipoproteína de baixa densidade
cAMP	Adenosina Monofosfato ciclase	LH	Hormônio luteinizante
CAT	Catalase	LHR	Receptor do hormônio luteinizante
Cd	Cádmio	Mg	Manganês
CD	Controle cádmio	MME	Membrana mitocondrial externa
CdCl ₂	Cloreto de cádmio	MMI	Membrana mitocondrial interna
CdO	Óxido de cádmio	Mn	Manganês
CdS	Sulfeto de cádmio	Na	Sódio
CEMEL	Centro de Microscopia Eletrônica da UFTM	P450scc	Citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucleico	PESB	Parque Estadual da Serra do Brigadeiro
eNOS		RNA	Ácido ribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio	SOD	Superóxido dismutase
GPD6	Glicose-6-fosfato desidrogenase	StAR	Proteína reguladora esteroideogênica aguda
GPx	Glutathione peroxidase	TI	Tálio
GSH	Glutathione reduzida	UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Fe	Ferro	UFV	Universidade Federal de Viçosa
H	Hidrogênio	Zn	Zinco
HCl	Ácido clorídrico		
Hg	Mercúrio		
IGS	Índice gonadossomático		

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. METAIS PESADOS (CONTAMINANTES AMBIENTAIS)	4
1.2 O CÁDMIO	5
1.3. O TESTÍCULO	7
1.4. CÉLULAS DE LEYDIG	8
1.5. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)	10
1.6 O ESTRESSE OXIDATIVO E A FUNÇÃO TESTICULAR	10
1.7 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES	12
1.8 O AÇAÍ DA MATA ATLÂNTICA	13
2 JUSTIFICATIVA	14
3 HIPÓTESE	14
4 OBJETIVOS	15
4.1. OBJETIVO GERAL	15
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA	15
5.1.1 Critérios de inclusão e exclusão dos estudos	16
5.2 EXPERIMENTO	16
5.2.1 Animais	16
5.2.2 Material Vegetal	17
5.2.2.1 <i>Coleta dos frutos</i>	17
5.2.2.2 <i>Produção da polpa</i>	17
5.2.2.3 <i>Preparo do extrato</i>	18
5.2.3 Grupos Experimentais	18
5.2.4 Coleta de Material Biológico	19
5.2.5 Microscopia de luz	19
5.2.6 Morfometria dos túbulos seminíferos e células De Leydig	20
5.2.7 Estereologia da célula da Leydig	20
5.2.8 Histopatologia testicular	23
5.2.9 Análises Estatísticas	23
6 RESULTADOS	23

6.1 RESULTADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA	23
6.2 RESULTADOS EXPERIMENTAIS	24
6.2.1 Medidas biométricas	24
6.2.2 Morfometria dos túbulos seminíferos	25
6.2.3 Morfometria das células de Leydig	26
6.2.4 Estereologia das células de Leydig	28
6.2.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA TESTICULAR	29
7. DISCUSSÃO	31
7.1 DISCUSSÃO SOBRE A REVISÃO SISTEMÁTICA	31
7.2 DISCUSSÕES SOBRE O EXPERIMENTO	32
7.2.1 Papel do cádmio como indutor de injúria celular e tecidual	32
7.2.2 Potencial uso das antocianinas como agentes antioxidantes	34
8. COMENTÁRIOS	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO I	46
ANEXO II	47
ANEXO III	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. METAIS PESADOS (CONTAMINANTES AMBIENTAIS)

Os metais pesados podem ser definidos como elementos químicos com propriedades metálicas, cujas densidades são consideradas altas quando comparadas à água (FERGUSON,1990), sendo tóxicos aos organismos vivos, mesmo em baixas concentrações. Dentre os principais metais pesados incluem-se: cádmio (Cd), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), arsênio (As) e tálio (Tl) (MIKULSKI *et al.*,2017). Todavia, na natureza, existem metais que são essenciais para o funcionamento homeostático do organismo, tais como: cálcio (Ca), sódio (Na), magnésio (Mg), manganês (Mn) e ferro (Fe). Embora os metais pesados também possam ocorrer de forma natural no meio ambiente, os mesmos não possuem funções orgânicas conhecidas (WHO,1996).

Os metais pesados inserem-se no organismo humano através de várias rotas como: contato com a pele, inalação ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados (RUSINYAK *et al.*, 2010) e uma vez absorvidos, são geralmente retidos por proteínas e então transportados pelo sangue até tecidos onde podem ser estocados, ou biotransformados. A toxicidade causada por esses metais deve-se à ocorrência de dois principais mecanismos de ação: formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas, o que prejudica o perfeito funcionamento do organismo, e danos às membranas celulares através do aumento da formação de radicais livres e destruição das defesas antioxidantes endógenas, levando a alteração ou impedindo completamente o transporte de substâncias essenciais (GOLDHABER, 2003). Os efeitos tóxicos podem ser letais e subletais envolvendo alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (RAND e PETROLEZZI, 1985).

Em consequência do intenso processo de desenvolvimento humano e mudanças no estilo de vida das populações nas últimas décadas, houve o aumento da poluição ambiental, sobretudo a intensificação da quantidade de metais pesados dispostos no meio ambiente (AGARWAL *et al.*, 2015), fator esse que é agravado em regiões de expressiva atividade agrícola ou industrial, como em metalúrgicas, refinarias, estações de energia nuclear e indústrias têxteis, o que expõe trabalhadores desses locais a riscos ocupacionais relacionados à contaminação por esses metais.

1.2 O CÁDMIO

O cádmio (Cd) é o elemento número 48 da tabela periódica, com um peso atômico de 112,4 (VARMA, 1986). Sua concentração na crosta terrestre varia entre 0,15 e 0,20 mg/kg, sendo o 67º metal em abundância e sua forma mais estável, em ambientes naturais, é sob a forma de seu cátion bivalente o Cd^{+2} (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). O cádmio não apresenta função essencial ao organismo humano (ou animal), e ao metabolismo de plantas. Ele é um metal pesado muito utilizado em estudos de toxicologia devido à crescente poluição ambiental causada por ele, resultante do crescente acúmulo de resíduos industriais e domésticos (GOERING *et al.*, 1995), além de por possuir caráter persistente e de sofrer acumulação na cadeia biológica da qual o ser humano faz parte (MIRANDA, 1993; ALAZEMI *et al.*, 1996). Como resultado do fenômeno de bioacumulação, as quantidades subtóxicas presentes no ambiente podem atingir níveis de risco nos elos finais da cadeia trófica (VOLESKY, 1990).

O cádmio é liberado na atmosfera na forma de óxido de cádmio (CdO), cloreto de cádmio (CdCl_2) ou sulfeto de cádmio (CdS) resultante de atividades industriais, como a fabricação de baterias e pigmentos, fundição e refino de metais e incineração de resíduos. Ele entra na cadeia alimentar via água e alimentos contaminados (WHO, 2000; ATSDR, 2008). A média de ingestão diária de cádmio por pessoa é de aproximadamente 1 a 30 μg em alimentos e água, com um adicional de 2-30 μg de cádmio/pessoa/dia, entre os usuários de cigarro (cada cigarro possui aproximadamente 1 a 2 μg de cádmio) (ATSDR, 2008; PAN *et al.*, 2010). No entanto, o cádmio tem uma meia-vida extremamente longa, entre 20 e 40 anos em humanos e maior que 200 dias em roedores o que leva à bioacumulação no organismo (KJELLSTROM e NORDBERG, 1978; WHO, 2000; WONG *et al.*, 2010).

Por ser facilmente absorvido e translocado nas plantas, o cádmio tem potencial para entrar na cadeia alimentar humana, causando anemia, hipertensão, enfisema pulmonar, disfunções gástricas e intestinais e graves problemas reprodutivos. Como exemplo, na década de 50 ocorreu o derramamento de cádmio no rio Jinzu localizado próximo a uma plantação de arroz, no Japão. O consumo do alimento contaminado provocou uma epidemia de osteomalácia e disfunções renais, localmente denominada “*itai-itai*” (NOKAWA K, 1996; DIAS *et al.*, 2001). O cádmio também afeta a função placentária, podendo atravessar a barreira hemato-placentária e provocar distúrbios no desenvolvimento fetal, podendo, ainda, ser excretado pelo leite. O organismo animal é particularmente suscetível à exposição ao cádmio no período perinatal (PICOLI, 2004).

O acúmulo de cádmio acontece principalmente no fígado e nos rins, mas também nos testículos (WAALKES *et al.*, 1992), em grande parte devido à alta concentração de metalotioneínas nesses órgãos. A metalotioneína é uma proteína intracelular de baixo peso molecular disponível no fígado, rim, intestino e pâncreas. Essa proteína é conhecida como substância bioquímica importante que se liga aos metais pesados, a fim de minimizar seus efeitos tóxicos no organismo (ATSDR, 1999). Uma vez ingerido, o Cd^{2+} é transportado, através do sangue, ligado à albumina, na maioria dos animais, e ao chegar ao fígado induz a síntese de metalotioneína à qual se complexa.

O cádmio pode entrar em células eucarióticas ligado a proteínas transportadoras de zinco (Zn) e também por algumas proteínas que são encontradas nos testículo (DALTON *et al.*, 2005). Outra forma do Cd^{2+} entrar nas células é usando um cotransportador de metal divalente $\text{Fe}^{2+}/\text{H}^+$ e transportadores, como bombas de fluxo (SU *et al.*, 2011). A ligação do metal à metalotioneína é feita através dos grupos tióis dos resíduos de cisteína que compõem a molécula de metalotioneína. Essas proteínas estão localizadas na membrana do complexo de Golgi e protegem as células da citotoxicidade de metais pesados. Dessa maneira, grande quantidade de cádmio ou exposição prolongada a este metal pode ultrapassar a capacidade das metalotioneínas de se ligar ao Cd, causando assim lesões e até morte tecidual (WONG *et al.*, 2010).

O Cd também atua como agente mitogênico promovendo a proliferação das células cancerosas da mama (SIEWIT *et al.*, 2010). Por induzir o estresse oxidativo, o Cd desempenha um papel central na carcinogênese, o que é confirmado pelas alterações significativas na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) em tecidos danificados por esse metal (WAALKES, 2003; LIU *et al.*, 2009).

Os testículos são órgãos que sofrem com a bioacumulação de cádmio (OTEIZA *et al.*, 1997), por apresentar constantes processos de divisão e diferenciação celular (YANO e DOLDER, 2002). A propensão dos testículos aos efeitos cumulativos e tóxicos do cádmio o torna um importante modelo experimental, aplicado não somente a estudos referentes à fertilidade de mamíferos, como também ao organismo em geral (LEITE, 2008). A dose mínima de Cd necessária para causar danos testiculares foi relatada por Gunn *et al.* (1968), sendo de aproximadamente 0,44 mg/kg. Estudos realizados por Ren *et al.* (2019), em camundongos, observaram que altas doses de cádmio, 8mg/kg, foram capazes de produzir efeitos como diminuição da espessura das paredes dos túbulos seminíferos, diminuição da

contagem de células de Sertoli, espermatídes e espermatogônias, além de induzir hiperemia intersticial e diminuição da concentração de andrógenos quando comparados aos grupos experimentais que receberam doses mais baixas.

Em 2006, Akinloye *et al.* realizaram um estudo entre homens férteis e inférteis na Nigéria e obtiveram como resultado a correlação negativa entre a concentração sérica de cádmio e parâmetros como número, motilidade, viabilidade, morfologia dos espermatozoides. Estes achados são significativos porque suportam a noção de que a tendência atual de declínio da qualidade do sêmen, verificada pela contagem e motilidade dos espermatozoides em habitantes de países industrializados, é causada, pelo menos em parte, pela exposição de baixo nível a tóxicos ambientais como o cádmio (CHENG e MRUK, 2011).

Embora seja sabido que o cádmio causa efeitos adversos nos órgãos reprodutores de ratos machos, poucos estudos têm quantificado morfometricamente alterações causadas pelo uso de suas baixas doses. O que se sabe é que doses mais baixas causam ligeiras alterações morfológicas testiculares (PREDES *et al.*, 2010; WIRTH e MIJAL, 2010).

1.3. O TESTÍCULO

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina, geralmente localizado no escroto e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. Funcionalmente, o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos: o intersticial e o tubular (RUSSELL *et al.*, 1990). Os componentes do compartimento intersticial são as células de Leydig, os vasos sanguíneos e espaços linfáticos, além de nervos e de uma população celular variável constituída principalmente por fibroblastos e macrófagos, os quais estão diretamente associados às células de Leydig (RUSSELL *et al.*, 1990; HALES, 2002).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Eles são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. A túnica própria reveste o túbulo externamente, sendo composta de células mioides ou peritubulares e matriz extracelular. Associadas às células mioides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas (ROSS *et al.*, 2003). Ambas participam do processo conhecido como espermatogênese.

Brevemente, a espermatogênese pode ser dividida didaticamente em três fases, de acordo com diferentes características funcionais: (a) fase proliferativa (espermatogonial), caracterizada por divisões rápidas e sucessivas (mitoses) das espermatogônias; (b) fase meiótica, que envolve a síntese de DNA no espermatócito em pré-leptóteno, síntese de RNA no espermatócito em paquíteno e finalização da meiose, durante a qual ocorre uma divisão reducional, acompanhada de recombinação gênica e uma divisão equacional na qual, teoricamente, cada espermatócito primário na fase de paquíteno dará origem a quatro espermátides haploides; (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por profundas mudanças estruturais e bioquímicas diferenciando-se em espermatozoide, um tipo celular estruturalmente especializado para alcançar e fertilizar o ovócito (SHARPE, 1994). Alterações significativas em quaisquer destas etapas pode acarretar em perdas consideráveis na produção espermática, podendo levar à infertilidade.

1.4. CÉLULAS DE LEYDIG

As células de Leydig foram observadas pela primeira vez pelo pesquisador Franz Leydig, em 1850, em um estudo comparativo da histologia reprodutiva de algumas espécies de mamíferos. Entretanto, somente com o avanço das técnicas de microscopia no final do século XIX tornou-se possível observar com mais precisão e detalhes tais células. Elas apresentam formato poligonal, com diâmetro de cerca de 20µm; seu núcleo é esférico, contendo grande parte da cromatina em seu estado condensado e um ou dois nucléolos (PELLINIEMI *et al.*, 1996).

As células de Leydig possuem caráter eosinófilico, devido principalmente à grande quantidade de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias em seu citoplasma (ROSS *et al.*, 2003). Em roedores, essas células estão intimamente associadas aos vasos sanguíneos presentes no espaço intersticial e cercadas por espaço linfático (FAWCETT *et al.*, 1973). Elas são amplamente conhecidas por desempenharem uma função importante: a produção de andrógenos, principalmente a testosterona e a diidrotestosterona, que desempenham papel fundamental na diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (PELLINIEMI *et al.*, 1996). Além disso, esses dois hormônios também estão relacionados ao surgimento dos caracteres sexuais secundários e a manutenção do processo espermatogênico normal (SHARPE, 1994; ROSS *et al.*, 2003).

No início do desenvolvimento, a célula de Sertoli, responsável pela manutenção do processo espermatogênico no epitélio seminífero, regula a proliferação das células de Leydig, assim como a produção de hormônios esteroides por estas células. Já em indivíduos adultos é o LH (Hormônio Luteinizante) o principal regulador e estimulador da síntese de testosterona (COOKE, 1996; SYLVESTER, 1996). Além da célula de Sertoli, outro tipo celular comumente encontrado em associação com as células de Leydig é o macrófago. Em testículos de indivíduos adultos, os macrófagos intersticiais podem ser encontrados junto aos agrupamentos de células de Leydig. Esta interação pode estar relacionada à transformação, por parte do macrófago, de alguns esteroides produzidos pela célula de Leydig, com a consequente produção e liberação de testosterona e diidrotestosterona (HALES, 2002).

Os hormônios esteroides são produzidos pelas gônadas (ovário e testículo) e pelo córtex da suprarrenal. Após a puberdade, a quantidade crescente de secreção de testosterona faz o pênis, o escroto e os testículos aumentarem de tamanho. Além disso, este hormônio determina o desenvolvimento das características sexuais secundárias que distinguem o homem da mulher, como: distribuição dos pelos pelo corpo, calvície, tom de voz, espessura da pele, desenvolvimento muscular, crescimento e retenção de cálcio nos ossos (GEBARA *et al.*, 2002; GUYTON & HALL, 2002; DOHLE *et al.*, 2003).

O colesterol é a principal matéria-prima do processo de produção de hormônios esteroides, ou esteroidogênese, pois serve de precursor metabólico para todos os estes hormônios, sendo armazenado principalmente na membrana plasmática e em gotículas lipídicas no citoplasma de células esteroideogênicas, como a célula de Leydig (JEFCOATE, 2002). Diversas enzimas estão relacionadas à síntese de andrógenos a partir do colesterol. Propomos inicialmente a avaliação de duas destas enzimas que são de grande importância na atividade esteroideogênica: a StAR e a P450scc.

A proteína StAR foi originalmente identificada como uma fosfoproteína de 30-32kDa que se acumula nas mitocôndrias das células de Leydig (assim como em outras células esteroideogênicas) em resposta aos níveis de cAMP, aumentando o fluxo de colesterol da membrana mitocondrial externa (MME) para a membrana mitocondrial interna (MMI). Sua ação é exclusiva da MME e sua atividade proporcional ao tempo que ela permanece na MME. A ação de StAR está diretamente relacionada a outra enzima: a P450scc presente na MMI (STOCCO e CLARK, 1996). O colesterol que entra na mitocôndria será clivado à pregnenolona pela P450scc (PAYNE e HALES, 2004). Caso ocorra um mau funcionamento

ou depleção destas enzimas, a concentração de esteroides circulantes pode diminuir drasticamente, implicando em diminuição ou interrupção do processo espermatogênico, afetando a taxa normal de fertilidade masculina.

1.5. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

O oxigênio molecular é indispensável à vida da maioria dos organismos. Entretanto, considerando as características químicas e as vias metabólicas de sua utilização, podem ocorrer algumas reações que resultam em efeitos deletérios à própria vida. Assim, os produtos intermediários de seu metabolismo, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs), estão envolvidos em diversos tipos de eventos oxidativos ocasionando a oxidação de estruturas celulares como membranas, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), podendo causar disfunção celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Nas células, o oxigênio molecular não reage diretamente com os substratos, porém uma pequena parte do oxigênio consumido pode sofrer redução univalente sequencial e formar ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. O peróxido de hidrogênio pode ser precursor do radical hidroxila que é considerada a ERO mais reativa (NEWSHOLME e LEECH, 1994).

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais existe a produção constante de EROs acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de antioxidantes de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas (Davies, 1991). Um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante, de maneira que os primeiros sejam predominantes ou, na situação mais crítica, quando o aumento do sistema pró-oxidante vem acompanhado de uma redução paralela do sistema antioxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

1.6 O ESTRESSE OXIDATIVO E A FUNÇÃO TESTICULAR

Setchell e Waites (1970) relataram que o alvo primário da toxicidade de cádmio no testículo é a destruição da barreira hematotesticular, seguido por hemorragia de microvasos no tecido intersticial. Embora a barreira hematotesticular seja uma das barreiras sanguíneas mais eficientes, é mais suscetível aos danos induzidos pelo cádmio em relação à barreira hematoencefálica, hematoepididimária, ou microvasos localizados no interstício. Isso ocorre, pois o cádmio atua principalmente nas junções onde as moléculas de adesão celular

são Ca^{2+} dependentes (SETCHELL e WAITES, 1970; HEW *et al.*, 1993; CHENG e MRUK, 2002; CHENG e MRUK, 2011).

Estudos feitos por Prozialeck e Lamar (1999) ilustram que o Cd^{2+} interage com os sítios de ligação do Ca^{2+} substituindo assim Ca^{2+} nas moléculas de adesão celular. O Cd, por sua vez, interrompe a caderina E nas junções de epitélios e endotélios, reforçando a hipótese que a caderina E pode ser um alvo molecular direto de toxicidade do cádmio (PROZIALECK, 2000). Nos vasos sanguíneos a caderina está protegida por junções fibrilares, por exemplo, claudinas, que independem de Ca^{2+} (WONG e CHENG, 2005) enquanto a barreira hematotesticular é composta de junções dependentes de Ca^{2+} . Assim, as caderinas que estão localizadas na barreira hematotesticular são mais suscetíveis a ação tóxica do Cd^{2+} (LEE *et al.*, 2003).

Lesões severas da barreira hematotesticular acarretam na perda de células germinativas do epitélio seminífero, induzindo disfunção reprodutiva masculina como resultado da perda prematura de células germinativas. Tal fato leva à redução do número de espermatozoides, da qualidade do sêmen e, eventualmente, causa infertilidade masculina (CHENG e MRUK, 2011). Hew *et al.* (1993) relataram que o Cd^{2+} induz falha na espermição em ratos, pela interrupção no transporte de espermátide alongada, já que estas permanecem incorporadas dentro do epitélio seminífero, evidenciando que o cádmio é capaz de interromper a comunicação Sertoli-espermátide, que é crucial para o transporte de espermátides em todo o epitélio durante o ciclo do epitélio seminífero (MRUK e CHENG, 2004).

Outro mecanismo de ação tóxica deste metal é o aumento da produção de radicais livres, os quais geram danos oxidativos em DNA, lipídeos e proteínas (ILKES *et al.*, 2004), o que, por sua vez, desestabiliza a junção entre as células do testículo destruindo assim a barreira hematotesticular (WONG e CHENG, 2011). O Cd^{2+} atua em enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, que modulam estresse oxidativo. De forma semelhante, um aumento do estresse oxidativo foi registrado em aproximadamente 80% dos homens inférteis clinicamente comprovados que tiveram exposição, em longo prazo, a metais pesados, estando assim esse fator comprovadamente relacionado à infertilidade masculina (KIZILER *et al.*, 2007; VENKATESH *et al.*, 2011).

1.7 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

A atividade biológica das EROs é limitada por uma série de antioxidantes endógenos e proteínas relacionadas ao estresse. As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante intracelular, pois eliminam $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 que poderiam oxidar os substratos celulares, prevenindo as reações em cadeia dos radicais livres, através da diminuição na concentração disponível destes para iniciar o processo (POWERS *et al.*, 1999; POWERS e JACKSON, 2008). Halliwell e Gutteridge (2006) definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas à de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Esta definição compreende compostos enzimáticos como SOD (superóxido dismutase), a CAT (catalase), a GPx (glutathiona peroxidase) e não-enzimáticos como a GSH (glutathiona reduzida) e vitaminas A, C e E.

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a SOD, a CAT e a GPx, que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das EROs. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), evitando assim, a formação do radical hidroxila (POWERS e JACKSON, 2008). A participação de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos no mecanismo de defesa contra a injúria celular, pode diminuir o risco de dano mediado por EROs (POWERS *et al.*, 1999; POWERS e JACKSON, 2008).

Substâncias exógenas como os compostos fitoquímicos fenólicos possuem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias já bem estabelecidas na literatura (HUSSAIN *et al.*, 2019). Extratos de plantas ricos em polifenóis, como o extrato de aquoso de *Moringa olifera* Lamarck, são capazes de agir como protetores testiculares contra ação de poluentes ambientais, como a hidroxiureia. Através de efeitos como conservação do peso testicular, melhora do perfil histomorfométrico testicular, proteção contra o estresse oxidativo e aumento da atividade antioxidante, esses compostos possuem grande potencial terapêutico no tratamento de injúrias que afetem o sistema reprodutivo masculino (SAALU *et al.*, 2011; YOUSAF *et al.*, 2011).

Sendo assim, durante o metabolismo aeróbio, a possibilidade de ocorrer lesão oxidativa nos tecidos vai depender de um equilíbrio preciso entre a geração de EROs e a eficácia dos mecanismos antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Os

antioxidantes podem proteger contra os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio na qualidade espermática (BAKER *et al.*, 1996; YOUSEF *et al.*, 2004; YOUSEF e SALAMA, 2009). Diversas substâncias antioxidantes podem ser encontradas em grande quantidade em produtos de origem vegetal, como nos frutos de *Euterpe edulis*, o açaí da Mata Atlântica.

1.8 O AÇAÍ DA MATA ATLÂNTICA

A espécie *Euterpe edulis* Mart. é uma palmeira pertence à família Arecaceae cujos frutos são pequenos, arredondados e de coloração roxo-escuro em função da presença de pigmentos naturais denominados de antocianinas (Figura 1.). É conhecida popularmente por palmeira juçara, jìçara ou açaí da Mata Atlântica. Esta palmeira é encontrada principalmente em áreas remanescentes de Mata Atlântica do Brasil, inclusive no estado de Minas Gerais (LIN, 1988). Os frutos desta espécie são muito apreciados no Brasil e se tornam cada vez mais conhecidos ao redor do mundo, o que torna o cultivo da espécie e sua exploração bastante promissores. Brito *et al.* (2007), analisaram o conteúdo de antocianinas dos frutos de *E. edulis*, chegando ao valor de 290mg de antocianina/100g de peso fresco. Neste trabalho, também foram analisados os tipos de antocianinas mais significativos, que foram a cianidina-3-glicosídeo (1358mg/100g de peso seco) e a cianidina-3-rutinosídeo (1565mg/100g de peso seco).

As antocianinas são uma subclasse de compostos fenólicos naturais que estão amplamente distribuídos nos alimentos de origem vegetal. Além de suas funções como corantes naturais, as antocianinas têm apresentado um grande potencial farmacológico, que incluem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, inibição da oxidação do LDL, diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares e de câncer. Estes efeitos dependem da estrutura química da molécula, tais como grau de glicosilação e números de grupos hidroxilas (KONG *et al.*, 2003).

A utilização de produtos de origem vegetal, como o açaí da Mata Atlântica, pode ser um passo importante para mitigar os efeitos danosos da exposição ao cádmio (e aos metais pesados em geral) sobre o sistema reprodutor masculino, além de promover a exploração de um produto genuinamente brasileiro.

Figura 1. Palmeira Juçara (*E. edulis*).



Fonte: Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil, 2020.

2 JUSTIFICATIVA

A espécie de açaí *Euterpe edulis* é conhecida devido a seu alto poder antioxidante, dado pela presença de antocianinas. Trabalhos realizados no Laboratório de Biologia Estrutural da UFV com extrato hidroalcoólico de *E. edulis*, açaí da Mata Atlântica, demonstraram que o tratamento promoveu proteção para as células germinativas do testículo de animais que sofreram estresse oxidativo induzido pelo cádmio e chumbo. Entretanto, apesar de os dados indicarem efeitos sobre a concentração sérica de testosterona, a célula de Leydig presente no espaço intersticial testicular ainda não foi considerada alvo de estudos, como o apresentado neste projeto, apesar de sua importância para produção de andrógenos.

3 HIPÓTESE

O cádmio seria capaz de induzir alterações testiculares como: (1) adelgaçamento e atrofia das paredes dos túbulos seminíferos (2) apoptose das células germinativas e somáticas sobretudo (3) uma destruição massiva das células de Leydig. Os tratamentos com óleo e polpa de *E. edulis* serão eficazes na atenuação dos danos provocados pela administração do cloreto de cádmio, ao apresentar uma redução de danos de forma dose-depende, sem apresentar toxicidade testicular.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Determinar as alterações morfológicas estruturais das células de Leydig após a exposição ao cádmio, analisando se o tratamento com polpa ou óleo de açaí em diferentes concentrações é capaz de mitigar possíveis efeitos deletérios do cádmio.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações causadas pela contaminação de cádmio no parênquima testicular
- Avaliar o potencial efeito danoso sobre as células de Leydig e sua população no testículo.
- Avaliar a viabilidade da utilização dos diferentes tratamentos com açaí (óleo, polpa+ácido cítrico e polpa+HCl), verificando se há diferença entre os mesmos e qual a melhor opção para mitigar os efeitos da contaminação com cádmio no parênquima testicular.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

Para realização da revisão sistemática, a metodologia foi dividida em 7 etapas conforme recomendação PRISMA, sendo essas: (1) Elaboração da pergunta de pesquisa estruturada seguindo o acrônimo PICOT; (2) Elaboração da estratégia de pesquisa para cada base de dados; (3) Busca nas bases de dados “*Web of Science*”, “*Scopus*” e “*PubMed*”; (4) seleção pareada dos estudos em duas etapas utilizando o *software* “*EndNote*” e planilha Excel 2013; (5) Extração dos dados com auxílio do programa planilha Excel 2013; (6) análise do risco de viés metodológico utilizando o SYRCLE’s v.5.4; (7) Síntese dos dados.

Em relação a estratégia de busca foram utilizadas as bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science, utilizando-se os termos “phenolic compounds”, “male infertility”, “testis”, “spermatozoa”, “testosterone” e “male fertility”. Em todas as bases de dados escolhidas, a busca na literatura foi realizada a partir da estratégia de busca previamente elaborada. Foi utilizado o operador booleano “AND” para combinar o termo “*phenolic compounds*” com os demais termos descritos, resultando nas seguintes combinações: (phenolic compounds* AND male infertility*), (phenolic compounds* AND testis*),

(phenolic compounds* AND spermatozoa*), (phenolic compounds* AND testosterone*) e (phenolic compounds* AND male fertility*), totalizando em cinco combinações. O banco de dados gerado foi organizado utilizando-se o *software* “EndNote”, através do qual foram excluídos os artigos duplicados de forma automática e manualmente

5.1.1 Critérios de inclusão e exclusão dos estudos

Os artigos foram selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade, respondendo às seguintes perguntas: (1) Trata-se de um estudo do tipo ensaio clínico randomizado ou pré-clínico?; (2) Possui fitocompostos fenólicos como única estratégia de intervenção, ou seja, de tratamento da infertilidade masculina? (3) Foi redigido na língua inglesa ou portuguesa? A resposta “sim” para todas as perguntas, que são critérios de inclusão, é condição necessária e suficiente para a inclusão do estudo.

Por outro lado, foram excluídos artigos que responderam afirmativamente às seguintes perguntas: (1) Possui delineamento diferente do estabelecido?; (2) Possui abordagem exclusivamente química?; (3) Os compostos fenólicos não foram extraídos de plantas?; (4) O resumo está indisponível *on-line*? A resposta “sim” para todas essas perguntas, que são critérios de exclusão, é condição necessária e suficiente para a exclusão do estudo. (PEREIRA e GALVÃO, 2014).

5.2 EXPERIMENTO

5.2.1 Animais

Este projeto utilizou material biológico proveniente da crescente parceria do Centro de Microscopia Eletrônica da UFTM (Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG) com o Laboratório de Biologia Estrutural da UFV (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG), coordenado pelo prof. Dr. Sérgio LP da Matta. Deste modo, foi potencializado o uso do material biológico pelos dois laboratórios das duas instituições, minimizando o uso de animais, reagentes e insumos e maximizando os resultados obtidos. O projeto original foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da UFV (protocolo nº58/2016 – ANEXO I).

5.2.2 Material Vegetal

Todo o material vegetal foi coletado, processado e os extratos produzidos sob responsabilidade do Laboratório de Biologia Estrutural da UFV, de acordo com protocolo pré-estabelecido, descrito a seguir.

5.2.2.1 Coleta dos frutos

Os frutos do *E. edulis* foram obtidos no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), importante área remanescente de Mata Atlântica localizada na região da zona da mata do estado de Minas Gerais. A colheita e pós-colheita dos frutos foram realizadas conforme orientações da Embrapa para o açaí da Amazônia, *E. oleraceae* (EMBRAPA, 2005). Um coletor escalou a palmeira *E. edulis* e cortou o cacho de frutos na sua base, tendo cuidado para não desprender muitos frutos do cacho. Após o corte, o cacho de frutos foi depositado ao solo sobre uma lona ou um plástico para que não tivesse contato direto com o solo, evitando a contaminação dos frutos. Após a colheita, houve a seleção manual, com a remoção de produtos indesejáveis. Os frutos foram debulhados diretamente em caixas de plástico e os frutos verdes e em estado fitossanitário precário ou com qualquer outro defeito, que os tornem inadequados ao processamento, foram descartados.

O acondicionamento dos frutos foi realizado em caixas de plástico com aberturas laterais, para facilitar a aeração, uma vez que essas caixas são resistentes e de fácil higienização, o que aumenta a proteção dos frutos contra danos mecânicos. Em nenhum momento os frutos ficaram expostos ao sol, uma vez que a luminosidade excessiva pode favorecer sua deterioração.

5.2.2.2 Produção da polpa

Os frutos foram despulpados no prazo máximo de 24 horas após a colheita, devido a sua alta perecibilidade. Durante o processo de despulpa, os frutos passaram pelas seguintes fases de beneficiamento, conforme orientações da (EMBRAPA, 2005).

- Pré-lavagem: os frutos foram imersos em água para a retirada de impurezas;
- Amolecimento: imersão dos frutos na água a 40-60°C, não devendo exceder esta temperatura, por um período de 10 a 60 minutos, dependendo da maturação. Esta fase tem por finalidade facilitar o despulpamento por amolecimento do epicarpo e mesocarpo dos frutos.

- Lavagem com água clorada: lavagem dos frutos a uma solução com cloro ativo com 20 a 50ppm, por cerca de 20 a 40 minutos;
- Retirada do excesso do cloro: a retirada do cloro dá-se por meio da lavagem por aspersão com água potável;
- Despolpamento: consiste na operação de remoção da polpa do fruto. Foi realizado com o uso de despoldadeira. Estas etapas são importantes para minimizar a probabilidade de contaminação microbiológica dos frutos da juçara durante o processamento, contribuindo para a conservação do produto.

5.2.2.3 Preparo do extrato

A polpa dos frutos de *E. edulis* foi liofilizada e acondicionada em sacos de polietileno com revestimento de folha de alumínio para impedir a passagem da luz e armazenados à temperatura ambiente até o início do tratamento. A polpa liofilizada foi utilizada na obtenção do óleo de açaí. Para isso, foi realizada a extração com éter de petróleo no Soxhlet por 12 horas; quando o solvente foi removido pelo rota-evaporador, produzindo ao final o óleo de açaí. A polpa remanescente chamada de polpa desengordurada (sem óleo), passou por evaporação completa do éter de petróleo para posteriormente ser administrada aos animais via gavagem. Para isso, a polpa desengordurada foi ressuspensa em água e tamponada com ácido cítrico e ofertada aos animais via gavagem.

5.2.3 Grupos Experimentais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos em idade reprodutiva (50 dias). Os tratamentos foram fornecidos por via oral (gavagem), realizados sempre pela mesma pessoa, a cada 24h no mesmo horário do dia. Cada animal recebeu 0.7mL de solução, por 41 dias ininterruptamente. Os animais foram acondicionados em gaiolas contendo 3 ou 4 indivíduos cada, em sala climatizada ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à água e ração comercial peletizada.

Os grupos experimentais foram divididos como descrito a seguir (n=6, por grupo):

1. Controle (CTL): 0.7 ml de água destilada;
2. Controle tratado com cádmio (CD): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio, via gavagem, dose única;

3. Controle tratado com óleo de açaí (OA): 150 mg/kg de óleo de *E. edulis*, via gavagem, durante 42 dias;
4. Controle tratado com polpa desengordurada de açaí (PoAa): 300 mg/kg da polpa desengordurada tamponada, via gavagem, com ácido cítrico;
5. Tratado com cádmio+óleo (O50): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 50 mg/kg de óleo de açaí, via gavagem;
6. Tratado com cádmio+óleo (O100): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 100 mg/kg de óleo de açaí, via gavagem;
7. Tratado com cádmio+óleo (O150): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 150 mg/kg de óleo de açaí, via gavagem;
8. Tratado com cádmio+polpa (P100): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 100 mg/kg da polpa desengordurada tamponada ácido cítrico, via gavagem;
9. Tratado com cádmio+polpa (P200): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 200 mg/kg da polpa desengordurada tamponada ácido cítrico, via gavagem;
10. Tratado com cádmio+polpa (P300): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 300 mg/kg da polpa desengordurada tamponada ácido cítrico, via gavagem;

5.2.4 Coleta de Material Biológico

Os animais foram eutanasiados após anestesia intramuscular, aplicada no quadríceps femoral esquerdo, com mistura de xilazina e ketamina (10 e 100 mg/kg, respectivamente), considerando o peso de cada indivíduo. O testículo esquerdo foi retirado e fixado em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 5% + paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7.4) por 24h. O testículo direito foi fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0.1 mol/L, pH 7.2, por 24h e será utilizado a posteriori para análise imunohistoquímica.

5.2.5 Microscopia de luz

O material biológico fixado em Karnovsky foi pesado e lavado em tampão fosfato de sódio 0.1mol/L, pH 7.2 (3 lavagens de 10 minutos cada). Posteriormente, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol e incluído rotineiramente em resina glicolmetacrilato Leica (Historesin). Os cortes semifinos (1 μ m) foram obtidos para microscopia de luz em micrótomo rotativo automático (Leica RM 2055, Germany), sendo

montados em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina/borato de sódio 1% para análise morfológica e morfométrica testicular.

As imagens digitais do parênquima testicular foram capturadas utilizando-se o sistema de câmera Zeiss® AxioCam ICc5, integrado ao microscópio óptico Zeiss® AxioLab E, em objetivas de 20X, 40X e 100X. Com o Software Image Pro Plus foram determinados a proporção tubular e intersticial, proporção nuclear e citoplasmática das células de Leydig assim como o diâmetro nuclear dessas células.

5.2.6 Morfometria dos túbulos seminíferos e células De Leydig

A proporção tubular e intersticial foi calculada a partir de imagens digitais obtidas na objetiva de 20X, nas quais foi aplicada a máscara de grade (80x80) através do *software* Image Pro Plus. Os pontos de intersecção da máscara foram divididos em duas classes de acordo com sua localização, ou seja, sobre os túbulos seminíferos ou no espaço intersticial (Figura 2). Após marcação e contagem dos pontos, foi possível calcular a porcentagem do total de pontos que coincidiram sobre os túbulos e interstício, sendo obtidas a proporção tubular e intersticial respectivamente.

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi obtido a partir de imagens digitais obtidas em objetiva 100x. Trinta núcleos de células de Leydig foram mensurados para cada animal, utilizando-se aqueles que apresentaram o contorno mais circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes.

5.2.7 Estereologia da célula da Leydig

Para a obtenção da proporção volumétrica (%) das células de Leydig foram contados 1000 pontos projetados sobre imagens digitais tiradas da região do interstício, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Cada ponto é referente à intersecção de linhas de um grid projetado sobre as imagens digitais. Foram registrados os pontos coincidentes sobre núcleo (NC) e citoplasma (CL) de células de Leydig. O percentual foi obtido multiplicando-se por 100 o número de pontos contados sobre estas células, dividindo-se o valor obtido por 1000(Figura 1).

a) Volume nuclear (VN)

$$VN = \frac{4}{3}\pi r^3$$

onde r = raio nuclear;

b) Volume citoplasmático (VC)

$$VC = \% \text{ citoplasma} \times \frac{VN}{\% \text{ núcleo}}$$

onde % citoplasma = proporção citoplasmática e % núcleo = proporção nuclear;

c) **Volume da célula de Leydig (VCL)**

$$VCL = VN + VC$$

Esses valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3).

V. das células de Leydig por testículo

$$= \frac{(\% \text{ das células de Leydig no parênquima testicular} \times \text{peso testicular})}{100}$$

O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo foi feito a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular multiplicada pelo peso do parênquima de um testículo/100.

O volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo foi obtido utilizando-se o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig por testículo foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam por testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3).

$$N^{\circ} \text{ de células de Leydig por testículo} = \frac{V. \text{ das células de Leydig por testículo}}{V. \text{ de uma célula de Leydig}}$$

$$N^{\circ} \text{ de células de Leydig por testículo} = \frac{V. \text{ das células de Leydig por testículo}}{V. \text{ de uma célula de Leydig}}$$

Para calcular o número total de células de Leydig por grama de testículo foi utilizada a fórmula:

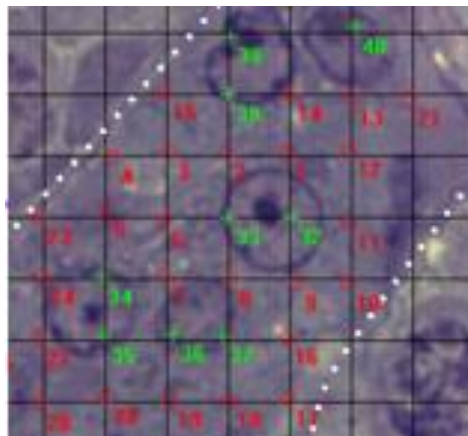
$$N^{\circ} \text{ total de células de Leydig por (g) de tesículo} = \frac{V. \text{ de Leydig por (g) de testículo}}{V. \text{ de uma célula de Leydig}}$$

A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula:

$$ILS(\%) = \frac{V. \text{ total da célula de Leydig no parênquima testicular}}{PC} \times 100$$

onde PC= peso corporal.

Figura 2. Obtenção da proporção nuclear (verde) e citoplasmática (vermelho) das células de Leydig.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

Figura 3. Obtenção da proporção tubular e intersticial. Vermelho = interstício, azul = túbulo seminífero.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

5.2.8 Histopatologia testicular

Para a análise histopatológica foram observados 200 túbulos seminíferos aleatórios em preparações de testículos de cada animal, utilizando a escala de Johnsen (1970), a qual classifica as lesões tubulares em 8 níveis de gravidade, sendo esses: Nível 1: Túbulos sem patologia, podendo apresentar poucos em nenhum vacúolo; Nível 2: Túbulos seminíferos com presença de vacúolos na base do epitélio; Nível 3: Túbulo seminíferos com presença de vacúolos no ápice do epitélio; Nível 4: Túbulos seminíferos com presença de vacúolos no ápice e na base do epitélio; Nível 5: Descamação do epitélio seminíferos com presença células germinativas no lúmen do túbulo seminífero; Nível 6: Túbulos seminíferos com presença de somente de células germinativas e vacúolos no epitélio; Nível 7: Túbulos seminíferos com apenas células de Sertoli; Nível 8: Túbulos seminíferos com ausência de células, tais níveis foram agrupados nos seguintes graus de severidade: Normal: nível 1; Leve: níveis 2 e 3; Moderada: níveis 5 e 6; Severo: níveis 7 e 8.

5.2.9 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados através do teste de Shapiro-Wilk para avaliação quanto à normalidade dos dados. Para os dados com distribuição gaussiana foi utilizado o teste one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Para dados que apresentaram distribuição não gaussiana foi usado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns. O nível de significância adotado para o presente estudo foi de 5%. Por fim, foram realizadas correlações para determinar o poder de previsão de uma variável sobre a outra, sendo utilizado o teste de Pearson para os dados paramétricos e o teste de Spearman para os dados não-paramétricos.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

Foram encontrados o total de 1554 artigos, excluídos 830 documentos duplicados, a partir desses, foram excluídos 652 registros na primeira fase de seleção e 3 estudos na segunda fase de seleção restando 66 artigos que atendiam todos os critérios de elegibilidade, os quais foram analisados nesta revisão. 52% dos estudos foram realizados no continente asiático, com ênfase na China e na Índia; 24% na África, especialmente no Egito, 14% na Europa, especialmente na França; 6% na América do Sul, com ênfase no

Brasil; 1% na América Central, com ênfase no México e 1% na América do Norte, com ênfase nos Estados Unidos da América. Em relação as vias de administração dos extratos, 50% dos estudos (n=33), optaram pela via oral, 6% escolheram a via peritoneal (n=4), 1.5% utilizaram a via subcutânea (n=1).

6.2 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

6.2.1 Medidas biométricas

Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas no ganho de peso corporal e ao peso final entre os grupos experimentais de ambos tratamentos (Tabelas 1 e 2). No entanto, o índice gonadossomático (IGS) apresentou decréscimo significativo do grupo tratado com 4.28 mg/kg de cádmio + 50 mg/kg de óleo de *E. edulis* em relação ao grupo CD (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados biométricos dos camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratados com óleo de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	AO	O50	O100	O150
Peso corporal (g)	38.84±1.53	42.09±1.4	37.37±2.49	40.74±2.74	37.23±2.28	37.29±1.87
Peso do testículo (g)	0.193±0.01	0.2405±0.01	0.1873±0.02	0.1820±0.03	0.1817±0.02	0.1816±0.02
Ganho de peso	2.89± 0.81	2.52±0.51	4.91±1.32	3.02±1.23	2.64±0.48	2.59±0.66
IGS (%)	0.503±0.03	0.586±0.02	0.505±0.01	0.448±0.01 ^a	0.495±0.02	0.5±0.02

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl_2); OA= Controle – óleo (150mg/kg de óleo de *E. edulis*); O 50, 100 e 150 = 4.28mg/kg de CdCl_2 + 50, 100 e 150 mg/kg de polpa respectivamente.

Tabela 2 – Dados biométricos dos camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratados com polpa de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	PoAa	P100	P200	P300
Peso corporal (g)	38.84±1.528	42.09±1.403	38.09±1.38	38.93±2.245	39.753±1.876	38.018±1.159
Peso do testículo (g)	0.193±0.01	0.2405±0.01	0.1848±0.03	0.1835±0.01	0.2115±0.024	0.2003±0.020
Ganho de peso	2.888± 0.809	2.52±0.513	4.294±2.554	1.952±1.23	1.53±1.201	3.695± 1.554
IGS (%)	0.503±0.03	0.586±0.02	0.480±0.03	0.493±0.03	0.542±0.04	0.527±0.01

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl_2); P: 100, 200 e 300 = 4.28mg/kg de CdCl_2 + 100, 200 e 300 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média ± SD.

6.2.2 Morfometria dos túbulos seminíferos

Nos grupos tratados com o óleo de *E. edulis* não houve diferenças estatisticamente significativas quanto à morfometria dos túbulos seminíferos em relação aos grupos controles (Tabela 3). Entre os grupos experimentais tratados com a polpa de *E. edulis*, o grupo P300 apresentou diminuição da área do lúmen do túbulo seminífero em relação ao grupo controle polpa (PoAa), em reflexo da diminuição do raio do lúmen e diâmetro tubular (Tabela 4). Foi possível observar ainda que área do lúmen do túbulo seminífero do grupo controle cádmio estava estatisticamente maior que a dos grupos PoAa, P100 e P200 (Tabela 4).

Tabela 3 – Parâmetros morfométricos dos túbulos seminíferos de camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratado com óleo de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	OA	O50	O100	O150
Diâmetro do túbulo seminífero (μm)	214±1.9	218.1±2.42	216.6±2.87	208.5±1.9	213.9±3.17	218.2±3.28
Altura do epitélio seminífero (μm)	78.11±0.91	75.81±1.74	77.19±1.27	75.46±1.75	81.5±1.02	77.59±1.76
Área do túbulo seminífero (μm^2)	36337±645.7	37632±900	37125±1001	34500±655	36658±1169	37731±1178
Área do epitélio do seminífero (μm^2)	3400±588.5	30058±2286	31572±707	34088±94	31572±709	34235±948.5
Relação Epitélio-Túbulo	0.919±0.003	0.898±0.008	0.91±0.009	0.914±0.009	0.933±0.005	0.909±0.01

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

C = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl_2); OA = Controle – óleo (150mg/kg de óleo de *E. edulis*); O: 50, 100, 150 = 4.28mg/kg de CdCl_2 + 50, 100 e 150mg/kg de óleo de *E. edulis*. Os valores aqui foram expressos em média ± SD (one-WAY ANOVA).

Tabela 4 – Parâmetros morfométricos dos túbulos seminíferos de camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratado com polpa de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	PoAa	P100	P200	P300
Raio do lúmen (μm)	28.89±2.325	33.22±4.430	24±10.01	28.45±4.35	26.93±7.69	31.23±3.909 ^c
Área do lúmen (μm^2)	2937±386.9	3906±1002	2093±1514	2597±787 ^b	2445±1104 ^b	3107±776.6
Área do túbulo seminífero (μm^2)	36337±645.7	37632±900	32636±5846	34406±3218	34172±4982	38537±3397
Relação Epitélio-Túbulo	0.919±0.003	0.898±0.008	0.9359±0.05	0.9243±0.22	0.9308±0.02	0.9202±0.0155

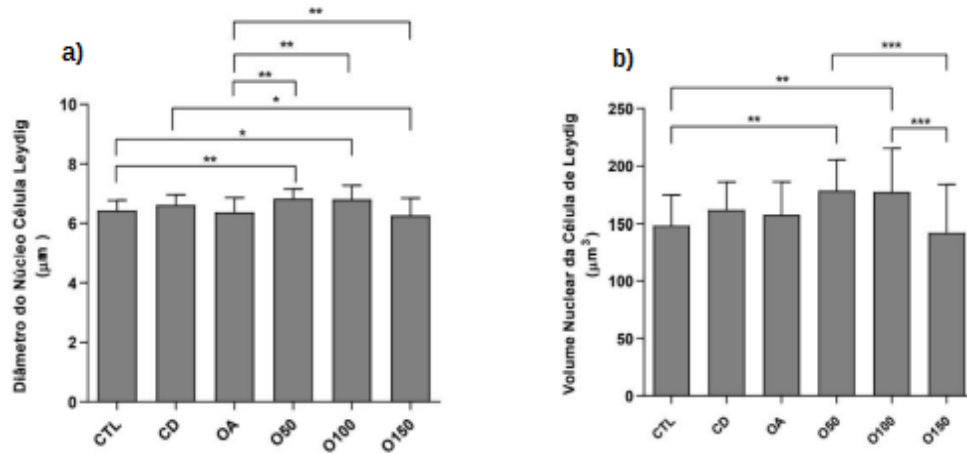
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl_2); OA= Controle – óleo (150mg/kg de óleo de *E. edulis*); O:50, 100 e 150 = 4.28 mg/kg de CdCl_2 + 50, 100 e 150 mg/kg de óleo respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média \pm SD e as diferenças entre os tratamentos ($p \leq 0.05$) são sinalizadas por “a” quando em relação ao controle cádmio na mesma linha e “b” em relação ao controle óleo na mesma linha, “c” quando em relação ao controle-água na mesma linha.

6.2.3 Morfometria das células de Leydig

Os animais que receberam os tratamentos com óleo de *E. edulis* apresentaram alterações no diâmetro nuclear das células de Leydig, sendo que os O50 e O100 apresentaram os diâmetros de núcleo maiores, quando comparados ao grupo controle água. No entanto, foi possível observar a diminuição do núcleo da célula de Leydig do grupo O150 em relação ao grupo CD (Figura 3, Tabela 5). Além disso, foi possível observar modificações morfométricas nos grupos tratados com polpa de *E. edulis*. Os grupos P200 e PoAa apresentaram aumento do diâmetro nuclear da célula de Leydig, em relação ao grupo CTL. Entretanto, o grupo PoAa apresentou o diâmetro do núcleo da célula de Leydig menor quando comparado aos grupos P100, P200 e P300. O grupo CD apresentou o diâmetro nuclear da célula de Leydig maior que o grupo P200 (Figura 4, Tabela 6).

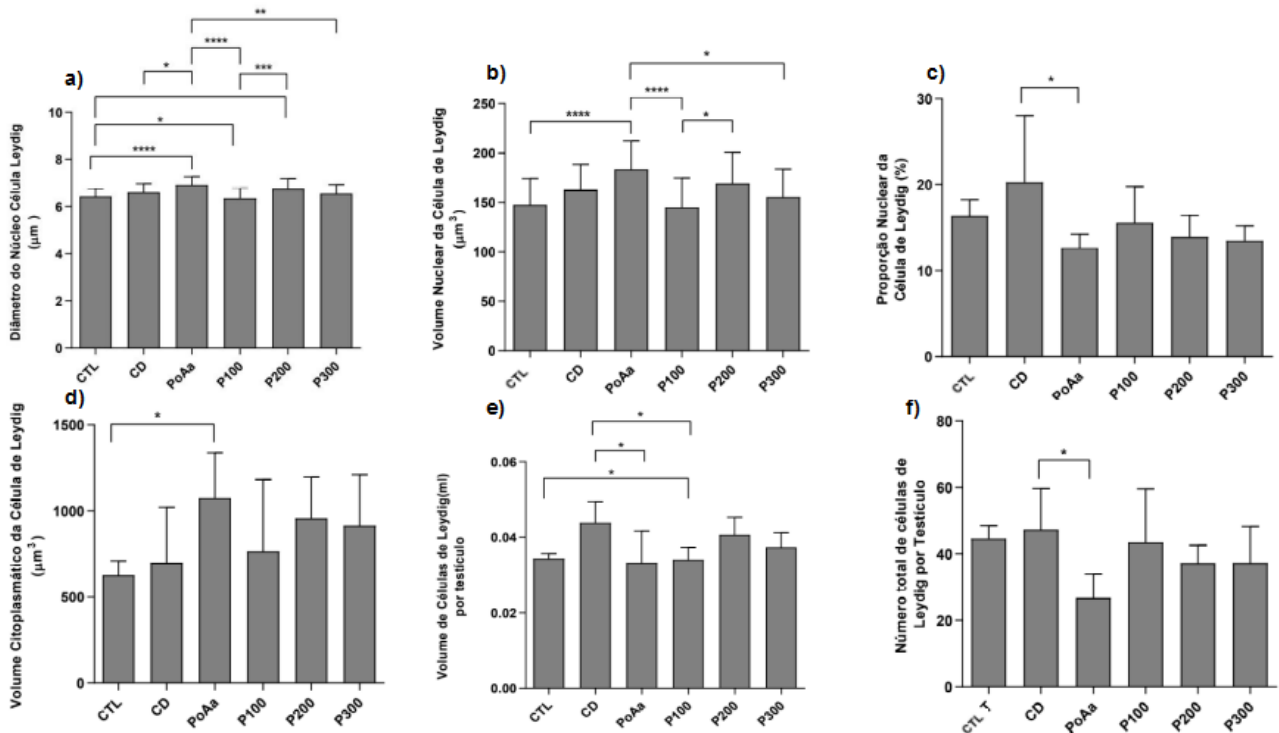
Figura 4. Diâmetro e volume nuclear de células de Leydig (tratamento com óleo).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); O: 100, 200 e 300 = 4.28mg/kg de CdCl₂ + 50, 100 e 150 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores foram expressos em média ± SD, onde as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por: p<0.05*, p<0.02**, p<0.01***one-WAY ANOVA).

Figura 5. Diâmetro e volume nuclear de células de Leydig (tratamento com polpa).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); P: 100, 200 e 300 = 4.28mg/kg de CdCl₂ + 100, 200 e 300 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média ± SD, onde as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por: p<0.05*, p<0.02**, p<0.01***.(one-WAY ANOVA).

6.2.4 Estereologia das células de Leydig

Os grupos O50 e O100 apresentaram o volume do núcleo da célula de Leydig maiores que quando comparados ao grupo CTL, porém o grupo O150 apresentou o volume nuclear menor em relação aos grupos O50 e O100 (Figura 3, Tabela 5). Foram observadas maiores modificações estereológicas entre os grupos experimentais tratados com polpa de *E. edulis*. O grupo P200 apresentou do volume nuclear maior que o grupo CD, assim como os grupos P100, P200 e P300 apresentaram volumes nucleares maiores que os do grupo PoAa (Figura 4, Tabela 6).

Tabela 5 – Estereologia e morfometria das células de Leydig (tratamento com óleo de *E. edulis*)

GRUPOS	CTL	CD	OA	O50	O100	O150
Diâmetro nuclear (μm)	6.43 \pm 0.06	6.61 \pm 0.06	6.37 \pm 0.09	6.83 \pm 0.0 ^{b,c}	6.81 \pm 0.08 ^{b,c}	6.26 \pm 0.11 ^a
Vol. nuclear (μm^3)	147.5 \pm 4.85	163.2 \pm 4.6	157.0 \pm 5.21	177.2 \pm 4.97 ^c	179.5 \pm 7.14 ^c	142.4 \pm 7.54
Vol. citoplasmático (μm^3)	626.3 \pm 33.34	697.9 \pm 144.5	646.9 \pm 112.2	632.3 \pm 129.5	673 \pm 110.1	702.7 \pm 110.3
Proporção nuclear (%)	16.36 \pm 0.767	20.27 \pm 3.464	15.03 \pm 1.27	16.36 \pm 1.58	19.40 \pm 1.50	15.63 \pm 1.67
Proporção citoplasmática (%)	69.7 \pm 2.047	72,86 \pm 2.231	74.02 \pm 2.33	75.77 \pm 1.56	70 \pm 4.59	71.09 \pm 4.33
Vol. da célula (μm^3)	773.9 \pm 40.75	866.7 \pm 160.1	803.9 \pm 124.3	1108 \pm 134.5	852.4 \pm 123.2	861.5 \pm 118.7
Vol. ocupado pela célula/testículo (mL)	0.0343 \pm 0.0006	0.0438 \pm 0.002	0.0341 \pm 0.002	0.0342 \pm 0.002	0.034 \pm 0.003	0.032 \pm 0.001
Vol. de célula de Leydig/g de testículo (mL)	0.177 \pm 0.004	0.183 \pm 0.009	0.183 \pm 0.005	0.189 \pm 0.004	0.186 \pm 0.01	0.174 \pm 0.012
Nº total de células de Leydig/testículo	44.56 \pm 1.62	47.29 \pm 6.2	39.59 \pm 6.91	34.51 \pm 6.37	44.73 \pm 6.73	39.59 \pm 5.79
Nº de células de Leydig/g de testículo ($\times 10^6$)	231.6 \pm 9.69	195.3 \pm 37.59	209.5 \pm 31.48	178.0 \pm 21.07	246.8 \pm 28.49	202.7 \pm 20.13
ILS (%)	0.082 \pm 0.002	0.102 \pm 0.006	0.083 \pm 0.005	0.08 \pm 0.005	0.08 \pm 0.006	0.078 \pm 0.003

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); OA= Controle – óleo (150mg/kg de óleo de *E. edulis*); O:50, 100 e 150 = 4.28 mg/kg de CdCl₂ + 50, 100 e 150 mg/kg de óleo respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média \pm SD e as diferenças entre os tratamentos ($p \leq 0.05$) são sinalizadas por “a” quando em relação ao controle cádmio na mesma linha e “b” em relação ao controle óleo na mesma linha, “c” quando em relação ao controle-água na mesma linha.

Tabela 6– Estereologia e morfometria das células de Leydig (tratamento com polpa de *E. edulis*).

GRUPOS	CTL	CD	PoAa	P100	P200	P300
Diâmetro nuclear (μm)	6.43 \pm 0.06	6.61 \pm 0.06	6.91 \pm 0.06 ^c	6.35 \pm 0.08 ^b	6.76 \pm 0.07 ^{abc}	6.55 \pm 0.06 ^b
Vol. nuclear (μm^3)	147.5 \pm 4.85	163.2 \pm 4.60	183.5 \pm 5.23	144.9 \pm 5.42 ^b	179.5 \pm 7.14 ^{ab}	169.3 \pm 5.72 ^b
Vol. citoplasmático (μm^3)	626.3 \pm 33.34 ^b	697.9 \pm 144.5	1075 \pm 107.2	766 \pm 170.3	956.9 \pm 97.91	914.4 \pm 120,9
Proporção nuclear (%)	16.36 \pm 0.767 ^{bc}	20.27 \pm 3.464	12.70 \pm 0.625	15.57 \pm 1.72	13.9 \pm 1.047	13.46 \pm 0.711
Proporção citoplasmática (%)	69.70 \pm 2.047	72.86 \pm 2.231	73.85 \pm 1.95	74.69 \pm 1.973	79.22 \pm 1.616	76.61 \pm 1.53
Vol. da célula (μm^3)	773.9 \pm 40.75 ^b	866.7 \pm 160.1	1259 \pm 120.6	909.2 \pm 182	1120 \pm 101.03	1070 \pm 1304
Vol. ocupado pela célula/testículo (mL)	0.034 \pm 0.001	0.044 \pm 0.002	0.033 \pm 0.001	0.034 \pm 0.002	0.041 \pm 0.001	0.037 \pm 0.001
Vol. de célula de Leydig/g de testículo (mL)	0.177 \pm 0.004	0.1832 \pm 0.009	0.1785 \pm 0.004	0.186 \pm 0.003	0.192 \pm 0.003	0.186 \pm 0.002
Nº total de células de Leydig/testículo	44.56 \pm 1.62 ^b	47.29 \pm 6.20	26.84 \pm 2.88	43.50 \pm 6.55	37.14 \pm 2.23	37.23 \pm 4.48
Nº de células de Leydig/g de testículo ($\times 10^6$)	231.6 \pm 9.69 ^b	195.3 \pm 37.59	146.5 \pm 10.20	236.9 \pm 21.07	178.2 \pm 15.40	183.5 \pm 16.69
ILS (%)	0.09 \pm 0.004	0.11 \pm 0.007	0.086 \pm 0.007	0.092 \pm 0.007	0.104 \pm 0.009	0.009 \pm 0.003

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); P100, P200 e P300 = 4.28mg/kg de CdCl₂ + 100, 200 e 300 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média \pm SD e as diferenças entre os tratamentos ($p \leq 0.05$) são sinalizadas por “a” quando em relação ao controle cádmio na mesma linha e “b” em relação ao controle polpa na mesma linha, “c” quando em relação ao controle-água na mesma linha.

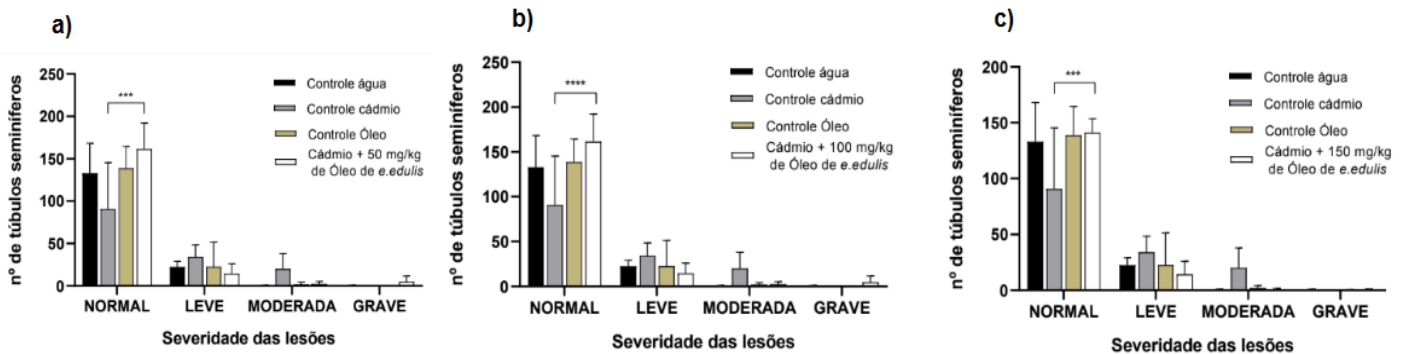
O grupo O100 apresentou maior volume das células de Leydig por testículo que o grupo CD (Figura 4). Houve ainda diferenças entre os grupos controles, onde o grupo PoAa apresentou maior volume citoplasmático que o grupo CTL (Figura 4), fatores que podem estar associados à maior quantidade de células de Leydig no grupo PoAa em comparação ao grupo CTL (Figura 4, Tabela 6).

6.2.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA TESTICULAR

Os grupos tratados com 50, 100 e 150 mg/kg de óleo de *E. edulis* apresentaram maior proporção de túbulos seminíferos normais em comparação ao grupo tratado com

apenas cádmio (Figura 5). No entanto, os animais tratados com 100, 200 e 300 mg/kg de polpa de *E. edulis* apresentaram maior quantidade de túbulos seminíferos normais em comparação aos grupos tratados apenas com polpa (PoAa) e cádmio (CD) (Figura 6).

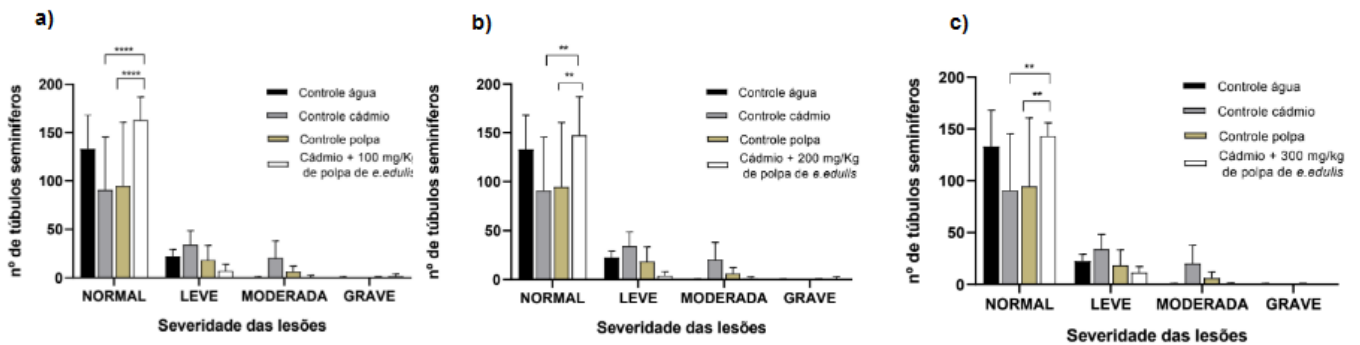
Figura 6. Histopatologia dos túbulos seminíferos dos animais tratados com óleo de *E. edulis*



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Os valores aqui foram expressos em média \pm SD onde as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por: $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$ ****(two-WAY ANOVA).

Figura 7. Histopatologia dos túbulos seminíferos dos animais tratados com polpa de *E. edulis*



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Os valores aqui foram expressos em média \pm SD onde as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por: $p < 0.05$ *, $p < 0.02$ ** , $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$ ****(two-WAY ANOVA)

7. DISCUSSÃO

7.1 DISCUÇÃO SOBRE A REVISÃO SISTEMÁTICA

Desde 3000 a.C, plantas são utilizadas como recurso terapêutico devido as suas propriedades medicinais (SULAMAN e MING, 2016). A extensão do uso da fitoterapia por um povo envolve fatores ligados a cultura e economia (ADEGOKE; RAHMAN e PANG, 2020). A Ásia constitui-se atualmente de muitos países em desenvolvimento, e essa característica está presente entre as nações que utilizam a medicina tradicional, de forma ostensiva, para tratar agravos a saúde (ESCAP, 2020). Todavia, mesmo grandes potencias asiáticas, como a China e Índia, fazem uso dessa ferramenta terapêutica, e possuem a exportação de fitoterápicos como um pilar importante da economia. Além disso que muitas dessas plantas são utilizadas como afrodisíacos e para o tratamento da infertilidade masculina. Ademais, segundo o estudo realizado por Sengupta *et al.* (2018), foi detectado o declínio de 22.17% da concentração de espermatozoides entre os homens asiáticos nos últimos 50 anos. Esse quadro pode ser observado no trabalho de Huang *et al.* (2017), que detectou a diminuição da concentração de espermatozoides em homens de chineses, nos últimos 15 anos, o que pode contribuir para o aumento da infertilidade masculina. A presente revisão reflete esse cenário a medida que apontou o continente asiático como o maior expoente na pesquisa por compostos fitoquímicos fenólicos para o tratamento infertilidade masculina, sobretudo na China e Índia.

Assim como nos países asiáticos, entre os países da África, estima-se que 80% da população rural e urbana, possua a medicina tradicional africana como principal forma de cuidado à saúde. A população masculina africana, enfrenta atualmente um intenso declínio da concentração de espermatozoides. Segundo o trabalho conduzido por Sengupta *et al.* (2017), ocorreu uma diminuição de 73.2% da concentração de espermatozoides entre os homens africanos entre os anos de 1965 e 2015, com a Nigéria apresentando maiores índices de infertilidade masculina. Congruente a esses fatos, no presente estudo, o continente africano surge como a segunda região do mundo com maior quantidade de estudos em busca de compostos fitoquímicos fenólicos para reversão da infertilidade masculina principalmente no Egito e Nigéria.

A maioria dos estudos publicados utilizou os compostos fitoquímicos fenólicos no tratamento de patologias, intoxicação por poluentes ambientais ou drogas que levam ao

prejuízo da fertilidade masculina. A abordagem preterida nesse trabalho foi utilizar, a administração por via oral por um período subagudo, ou seja, até 30 dias (EATON e GILBERT, 2001). Tais estudos apresentaram resultados promissores na reversão ou atenuamento das respectivas injúrias sobre o parênquima testicular, pois a biotransformação e absorção dos compostos fenólicos, depende da degradação realizada pela microbiota intestinal, tornando-os mais hidrossolúveis e de fácil transporte e distribuição através da corrente sanguínea (CROZIER and DEL RIO, 2010). No entanto, as interações com moléculas, presentes no estômago e intestino delgado, ou até mesmo interações com outros alimentos podem diminuir a sua disponibilidade sérica, o que torna a administração subaguda adequada, para que seja alcançada a quantidade de compostos fenólicos ideal para indução dos efeitos protetivos sobre as células e tecidos (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Portanto a administração por via oral, com duração subaguda, parece ser a mais adequada para promover proteção da fertilidade masculina. Em relação a dose administrada, os estudos apresentaram extrema variabilidade, o que torna a padronização dos tratamentos difícil, principalmente dentre os estudos que visaram a crioproteção de espermatozoides utilizando compostos fenólicos. No entanto, entre os estudos realizados utilizando extratos de plantas em modelos murinos, foi possível estabelecer que as doses entre 200 e 400 mg/kg, são efetivas para o tratamento de injúrias ao trato reprodutivo masculino sem complicações.

7.2 DISCUSSÕES SOBRE O EXPERIMENTO

7.2.1 Papel do cádmio como indutor de injúria celular e tecidual

O presente estudo investigou os possíveis efeitos provocados pelo cádmio sobre as células de Leydig e parênquima testicular, assim como a viabilidade da utilização dos tratamentos com óleo e polpa de *E. edulis*, em diferentes doses, para a mitigação de tais efeitos. O cádmio é capaz de produzir toxicidade celular através de três principais mecanismos, sendo esses a (1) interação cádmio-cálcio, onde o cádmio irá para o meio intracelular utilizando os canais de cálcio, competindo com esse íon pelos sítios de ligação da calmodulina, alterando os processos biológicos e bioquímicos dependentes dessa estrutura (AKINLOYE et al., 2006; VANDENBERG et al., 2012); através da (2) alteração de

proteínas, pois o metal pesado possui afinidade com os grupos mercapto, hidroxila e amino das proteínas, formando complexos proteína-cádmio que levam a supressão ou a inativação de múltiplos sistemas enzimáticos (LUEVANO e DAMODARAN, 2014) e (3) induzindo a expressão anormal de genes; a exposição ao cádmio aumenta o nível da expressão do mRNA do gene Bax (pró-apoptótico) e diminuição da expressão do mRNA do gene Bcl-2 (anti-apoptótico), o que desencadeia o processo de apoptose celular (NIKNAFS e SALEHNIA, 2015; VEERIAH et al., 2015).

No parênquima testicular o cádmio induz alterações morfológicas de forma dose-dependente. O trabalho realizado por Ren et al. (2019), administrou cloreto de cádmio em camundongos em doses crescentes. Nesse estudo, a toxicidade pelo cádmio foi induzida diariamente durante 8 semanas, e observou-se que a (1) baixa dose (2mg/kg), provocou alterações como: a ligeira diminuição da espessura das paredes dos túbulos seminíferos e desaparecimento parcial dos contornos tubulares, (2) a dose média (4mg/kg), ocasionou diminuição da espessura do epitélio germinativo, sangramento esporádico no espaço intersticial, diminuição da espermatogênese e destruição considerável das células de Leydig e, por fim, (3) a alta dosagem (8mg/kg) resultou na diminuição expressiva da espessura do epitélio seminífero, surgimento de túbulos seminíferos com morfologia aberrante, vários pontos de sangramento e anormalidades no estroma testicular.

As células de Leydig são particularmente vulneráveis a exposição ao cádmio, pois o metal pesado é capaz de afetar o funcionamento normal da enzima citocromo P450, responsável pela clivagem do colesterol para a forma de pregnenolona (MAINES, 1984). Logo, o cádmio é capaz de diminuir a síntese de testosterona, prejudicando a função endócrina testicular, o que reverbera em alterações como: prejuízo na regulação da espermatogênese e manutenção da barreira hematotesticular, diminuição da adesão dos espermatozoides às células de Sertoli, além de afetar a liberação de espermatozoides maduros para o lúmen dos túbulos seminíferos (REY et al., 2009; SMITH e WALKER, 2014).

Entretanto, no presente estudo, a administração de 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio via gavagem, em dose única, não foi capaz de induzir alterações significativas no peso corporal e gonadal e na morfologia testicular e das células de Leydig. Este fato implica que a frequência de exposição ao composto constitui um importante fator para a indução da toxicidade provocada pelo cádmio. Conforme observado nos trabalhos realizados por Mouro et al. (2020) e Ren et al. (2019), onde as doses diárias de 4.28 mg/kg por 7 dias e de 4mg/kg durante 8 semanas, respectivamente, foram capazes de originar modificações

testiculares. Esse fenômeno pode ter ocorrido graças a relação absorção-retenção desse metal pesado. Embora o cloreto de cádmio possua maior capacidade de absorção que as outras formas de apresentação do cádmio, como o sulfito de cádmio e sulfoselenúrio de cádmio (ILZRO, 1997,) é estimado que em camundongos apenas 0.27%-3.2% da dose fica retida no organismo após 3-5 dias após a exposição oral (BRARRACHARYYA et al. 1981; ENGSTROM e NORDBERG, 1979). No nosso estudo, os animais que receberam apenas o cloreto de cádmio foram eutanasiados após 42 dias, levantando a hipótese que nesse período a dose de cádmio absorvida foi metabolizada por mecanismos como a captura do metal do pesado pelas metalotioneínas, seguida pela excreção através urina e fezes desses animais.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a idade dos animais, como demonstrado por Sasser e Jaboe (1977), que verificaram que ratos com 12h, 24h e 6 semanas após o nascimento apresentaram taxas de absorção de cádmio de 12, 5 e 0.5%, o que revela uma relação inversamente proporcional entre a idade do animal e taxa de absorção. No presente estudo, os animais possuíam 12.5 semanas de idade o que pode ter contribuído para uma possível baixa absorção do composto. Por fim, o estudo realizado por Ren et al. (2019), revelou que os animais que receberam até a dose média de cloreto de cádmio (4mg/kg) demonstram potenciais mecanismos compensatórios para o estresse induzido pelo cádmio, marcados pela superexpressão de eNOS, 17- α -hidroxilase e LHR, o que pode justificar a ausência de maiores modificações no parênquima testicular, embora tenha sido observado, na análise histopatológica, diminuição da proporção dos túbulos seminíferos normais do grupo CD em relação ao grupo CTL.

7.2.2 Potencial uso das antocianinas como agentes antioxidantes

As antocianinas são compostos fenólicos pertencentes a um subgrupo de flavonoides, sendo consideradas heterosídeos das antocianidinas (BUENO et al. 2012). Essas moléculas possuem natureza hidrofílica e estrutura química polihidroxilíca, diferindo entre si de acordo com a posição e número de seus substituintes, podendo ser encontradas em pigmentos de pétalas, frutas e vegetais (HE e GIUSI, 2010). Essas substâncias são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética como corantes (CLIFFORD, 2000; PUTTA et al., 2017). No entanto, estudos recentes revelaram o seu potencial terapêutico para o tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo,

como: doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatórias (BODET et al., 2008; LI et al., 2017; PUTTA et al. 2017; JIANG et al., 2018).

Os frutos da *E. edulis* são considerados uma fonte importante de antocianinas conforme demonstrado por BORGES et al. (2011), que observaram o conteúdo total de antocianinas dos frutos da palmeira Juçara de 5 regiões diferentes. Apesar das diferenças geográficas como latitude, longitude e altitude, e climáticas como a temperatura e estação em foi realizada a coleta dos frutos, todas as amostras demonstram quantidade significativa, embora diferentes, desses compostos. Ademais, os frutos de *E. edulis* de apresentam o perfil fitoquímico fenólico constituído por duas classes de compostos: (1) ácidos fenólicos: ácido felúrico, gálico, protocatecuico e p-coumárico; (2) flavonoides: catequina, epicatequina e quercetina, demonstrando também atividade antioxidante mensurada através do método DPPH.

O ganho de peso e o peso final dos animais tratados com óleo e polpa de *E. edulis* não variaram estatisticamente, o que indica que os tratamentos não afetaram de forma tóxica e sistêmica o organismo dos animais tratados. Estes dados corroboram o observado para *Euterpe oleracea*, (MOURO et. al., 2020), que possui perfil de flavonoides e ácidos fenólicos similar ao perfil da *E. edulis* (BORGES et al., 2011). No trabalho conduzido por Mourou et al. (2020), o óleo de *E. oleracea* foi capaz normalizar a morfologia das células de Leydig após o estresse provocado pelo cádmio, visualizada através da diminuição do volume do núcleo e citoplasma desse tipo celular, além de aumentar os níveis de testosterona e atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD em relação grupo que recebeu apenas o cloreto de cádmio como intervenção.

Alterações no processo espermatogênico podem ser verificadas através da observação de parâmetros da morfologia testicular, como altura do epitélio germinativo, diâmetro e área dos túbulos seminíferos (RUSSEL et al.,1993). Todavia, esses parâmetros permaneceram inalterados após a administração do óleo de *E. edulis*. Apesar disso, o espaço intersticial, sobretudo as células de Leydig, foram os principais alvos de modificações em ambos os tratamentos. Entre os grupos experimentais tratados com a polpa de *E. edulis*, o grupo PoAa apresentou aumento do diâmetro tubular do túbulo seminífero em relação ao grupo P300, acompanhado pelo aumento do raio do lúmen e área do lúmen. Foi possível observar ainda que área do lúmen do túbulo seminífero do grupo controle cádmio estava estatisticamente maior que a dos grupos PoAa, P100 e P200.

O aumento luminal acompanhado pela redução da proporção de túbulos seminíferos normais observados nos grupos CD e PoAa, indicam um possível dano ao testículo (Mouro *et al.* 2020) porém por etiologias diferentes, enquanto o cádmio pode gerar danos ao parênquima testicular através do estresse oxidativo de forma direta. Paradoxalmente o tratamento com a polpa pode ter se tornado prejudicial ao tecido, à medida que moléculas antioxidantes podem se tornar agentes pró-oxidantes, a depender da dose administrada.

O trabalho realizado por Seon e Lee (2002), que objetivou observar a ação do ácido ascórbico sobre as funções secretoras e microsomais hepáticas no decorrer da isquemia e reperfusão hepática, verificou que altas doses do composto foram capazes de induzir a peroxidação lipídica. De forma semelhante, flavonoides como a quercetina, kaempferol são capazes de produzir efeitos como danos ao DNA e peroxidação lipídica, gerando estresse redutor na presença de metais de transição como o cádmio (RAHAL *et al.*, 2014).

As células de Leydig constituem importante componente endócrino testicular, pois são responsáveis pela síntese de testosterona e di-hidrotestosterona e essa função pode ser influenciada por diversos fatores como quantidade de LHR e LH disponível, e da velocidade de secreção testosterona das células de Leydig e distribuição desse hormônio pelos vasos linfáticos e sanguíneos presentes no interstício o que pode provocar o aumento do volume da célula de Leydig (ZIRKIN *et al.* 1980).

No nosso estudo foi detectado o aumento significativo do diâmetro do núcleo das células de Leydig dos grupos O50 e O100 em relação ao grupo CLT. Foi observado ainda o aumento do diâmetro e volume do nuclear progressivo dos grupos P100, P200 e P300 em relação ao grupo PoAa. O aumento desses parâmetros não acompanhados pelo aumento do número de células de Leydig por testículo, configura o cenário de hipertrofia das células de Leydig. Ademias esse crescimento celular pode estar relacionado com o aumento da produção de testosterona. Não obstante, essa hipótese torna-se plausível dado que doses baixas ou médias de cádmio, geram mecanismos compensatórios como a superexpressão de LHR (REN *et al.*, 2019), que podem aumentar a produção de testosterona acentuado aos efeitos pró-androgênicos das antocianinas (MOURO *et al.*, 2020).

Os efeitos menos expressivos sobre as células de Leydig observados nos grupos tratados com óleo de *E. edulis*, podem estar relacionados à menor quantidade de antocianinas e atividade antioxidante desse extrato quando comparado com polpa de desengordurada conforme verificado por Freitas *et al.* (2016). Esse comportamento ocorre

devido à natureza lipofóbica das antocianinas que as tornam mais miscíveis em meio hidrofílico, o que sugere um possível estresse redutor observado no grupo PoAa que apresentou uma menor proporção dos túbulos seminíferos normais em relação ao grupo CTL, durante a análise histopatológica. Estudos completos que contemplem marcadores celulares indicadores de estresse oxidativo, como óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA) e atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx) e expressão de genes como Bax podem ajudar a solucionar e a entender as alterações fisiológicas teciduais.

8. COMENTÁRIOS

Em relação aos estudos analisados na revisão sistemática, foi possível observar o grande potencial e versatilidade do uso dos compostos fenólicos para o tratamento de injúrias que afetem o sistema reprodutor masculino. A partir das análises realizadas, na parte experimental desse estudo, foi possível verificar que o tratamento com 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio em dose única, não foi capaz de induzir danos ao testículo, corroborando a hipótese que a frequência de exposição é um fator importante para a toxicidade desse metal pesado. Além disso, observou-se que óleo de *E. edulis* induziu efeitos mais discretos às células de Leydig e parênquima testicular, do que aqueles observados entre os grupos tratados com a polpa, o que pode estar ligado a maior concentração de antocianinas na polpa desengordurada de *E. edulis*, dado que esses flavonoides possuem natureza hidrofílica conferindo maior potencial antioxidante para essa forma do extrato. Ademais, verificou-se que a hipertrofia das células de Leydig nos animais tratados com cádmio concomitantemente com as doses de 50, 100 ou 150 mg/kg de óleo de *E. edulis* ou com as doses de 100, 200, 300 mg/kg da polpa de *E. edulis*, o que acreditamos estar ligada aos mecanismos compensatórios induzidas pelas baixas doses de cádmio aliados as propriedades pró-androgênicas das antocianinas presentes nos frutos da palmeira Juçara. Todavia, são necessárias análises ultraestruturais e de marcadores celulares, como os de morte e proliferação celular, assim como marcadores de enzimas da rota esteroidogênica para determinação das alterações fisiológicas sofridas pelas células de Leydig, assim como elucidar os mecanismos de ação dos tratamentos propostos no parênquima testicular.

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, Elikanah Olusayo; RAHMAN, Md Saidur; PANG, Myung-Geol. Bisphenols threaten male reproductive health via testicular cells. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 624, 2020.
- AGARWAL, Ashok et al. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2015.
- AKINLOYE, Oluyemi *et al.* Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reprod Biol*, v. 6, n. 1, p. 17-30, 2006.
- ALAZEMI, B. M.; LEWIS, J. W.; ANDREWS, E. B. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environmental Technology*, v. 17, n. 3, p. 225-238, 1996.
- ATES, Ilker et al. The oxidative DNA base damage in testes of rats after intraperitoneal cadmium injection. *Biometals*, v. 17, n. 4, p. 371-377, 2004.
- ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY). Toxicological profile for cadmium. US Department of Health and Human Services, Public Health Service., 1999.
- ATSDR, Thallium. ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry). Prepared by clement international corp., under contract, v. 205, p. 88-0608, 2000.
- BAKER, HW Gordon et al. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertility and sterility*, v. 65, n. 2, p. 411-419, 1996.
- BENOFF, Susan; JACOB, Asha; HURLEY, Ian R. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Reproduction Update*, v. 6, n. 2, p. 107-121, 2000.
- BEVERIDGE, T. J. *et al.* Metal-microbe interactions: contemporary approaches. *Advances in microbial physiology*, v. 38, p. 177-243, 1996.
- BORGES, Graciele Da Silva Campelo et al. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2128-2133, 2011.
- BUENO, Julia Martín et al. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part I: general considerations concerning polyphenols and flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 42, n. 2, p. 102-125, 2012.
- DE BRITO, Edy Sousa et al. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.
- CHENG, C.Y., MRUK, D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological Reviews* 82:825-874,2002.

- CHENG, C.Y., MRUK, D.D. The blood-testis barrier and its implications for male. contraception. *Pharmacological Reviews* 64:16-64, 2011.
- CLIFFORD, Michael N. Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 7, p. 1063-1072, 2000.
- COOKE, BA. Transduction of the luteinizing hormone signal within the Leydig cell. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.), *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, Cap 16:352-363, 1996.
- CROZIER, Alan; DEL RIO, Daniele; CLIFFORD, Michael N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular aspects of medicine*, v. 31, n. 6, p. 446-467, 2010.
- DAL SECCO V., *et al.* Mouse Sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigenpresenting cells in response to interferon g. *Biology of Reproduction*. 78:234– 242, 2008.
- DALTON, Timothy P. et al. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 9, p. 3401-3406, 2005.
- DAVIES, Kelvin JA (Ed.). *Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medical aspects*. Elsevier, 899p, 2013.
- DE ANGELIS, Cristina et al. The environment and male reproduction: the effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. *Reproductive Toxicology*, v. 73, p. 105-127, 2017.
- DE, SWAPAN K. et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology*, v. 133, n. 1, p. 389-396, 1993.
- DEJUCQ, NATHALIE et al. Interferon-alpha and-gamma expression in the rat testis. *Endocrinology*, v. 136, n. 11, p. 4925-4931, 1995.
- DIAS, Nivea MP et al. Isotermas de adsorção de cádmio em solos ácidos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 5, p. 229-234, 2001.
- DOHLE, G. R.; SMIT, Marij; WEBER, R. F. A. Androgens and male fertility. *World journal of urology*, v. 21, n. 5, p. 341-345, 2003.
- ESCAP, U. N. *Economic and social survey of Asia and the Pacific 2020: towards sustainable economies*. 2020.
- FAWCETT, Don W.; NEAVES, William B.; FLORES, Martha N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, v. 9, n. 5, p. 500-532, 1973.
- FERGUSSON, Jack E. *The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects*\Jack E. Fergusson. 1990.

- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. Male reproduction: a multidisciplinary overview, v. 197, p. 219, 1998.
- GEBARA, O. C. et al. Cardiovascular effects of testosterone. Arquivos brasileiros de cardiologia, v. 79, n. 6, p. 644-649, 2002.
- FREITAS, Rodrigo Barros et al. Euterpe edulis extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. Oxidative medicine and cellular longevity, v. 2016, 2016.
- GÉRARD, Nadine et al. Sertoli cells are the site of interleukin-1 α synthesis in rat testis. Molecular and cellular endocrinology, v. 82, n. 1, p. R13-R16, 1991.
- GOERING, P. L.; WAALKES, M. P.; KLAASSEN, C. D. Toxicology of cadmium. In: Toxicology of metals. Springer, Berlin, Heidelberg, 1995. p. 189-214.
- GOLDHABER, Susan B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. Regulatory toxicology and pharmacology, v. 38, n. 2, p. 232-242, 2003.
- GOMEZ, Edith et al. Type I and type II interleukin-1 receptor expression in rat, mouse, and human testes. Biology of reproduction, v. 56, n. 6, p. 1513-1526, 1997.
- GOYER, Robert A.; CLARKSON, Thomas W. Toxic effects of metals. Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Fifth Edition, Klaassen, CD [Ed]. McGraw-Hill Health Professions Division, v. 23, p. 813-858, 1996.
- GUILHERME, Luiz Roberto Guimarães et al. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. Tópicos em ciências do solo, v. 4, n. 3, p. 345-90, 2005.
- GUNN, Samuel A.; GOULD, Thelma Clark; ANDERSON, W. A_ D_. Mechanisms of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium-induced vascular injury to mouse testis. Reproduction, v. 15, n. 1, p. 65-70, 1968.
- GUYTON, Arthur Clifton. Tratado de fisiologia médica. Elsevier Brasil, p 973, 2006..
- HAKOVIRTA, Harri et al. Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. Molecular and cellular endocrinology, v. 108, n. 1-2, p. 193-198, 1995.
- HALES, Dale Buchanan; DIEMER, Thorsten; HALES, Karen Held. Role of cytokines in testicular function. Endocrine, v. 10, n. 3, p. 201-217, 1999.
- HALES, Dale Buchanan. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. Journal of reproductive immunology, v. 57, n. 1-2, p. 3-18, 2002.
- HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, USA, p. 704p, 2015.
- HAUGEN, Trine B. et al. The mature form of interleukin-1 α is constitutively expressed in immature male germ cells from rat. Molecular and cellular endocrinology, v. 105, n. 2, p. R19-R23, 1994.
- HEDGER, Mark P.; MEINHARDT, Andreas. Cytokines and the immune-testicular axis. Journal of reproductive immunology, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2003.

- HEKMAN, A. C. et al. Interferon expression in the testes of transgenic mice leads to sterility. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 24, p. 12151-12155, 1988.
- HEW, Kok-Wah et al. Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biology of reproduction*, v. 49, n. 4, p. 840-849, 1993.
- HUSSAIN, Muhammad Bilal et al. Bioavailability and metabolic pathway of phenolic compounds. In: *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen, 2019.
- IWAKURA, Y. et al. Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon-beta gene under the control of the metallothionein enhancer-promoter. *The EMBO journal*, v. 7, n. 12, p. 3757-3762, 1988.
- JANEWAY, C. A., *et al.* *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, ed 6. New York, Garland Science, 2006
- JEFCOATE, Colin et al. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. *The Journal of clinical investigation*, v. 110, n. 7, p. 881-890, 2002.
- KJELLSTRÖM, Tord; NORDBERG, Gunnar F. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environmental research*, v. 16, n. 1-3, p. 248-269, 1978.
- KONG, Jin-Ming et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.
- LEE, Nikki PY et al. Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis?. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 2, p. 489-508, 2003.
- LEITE, Cibele; BERNARDES, Ricardo S.; OLIVEIRA, Sebastião A. de. Método Walkley-Black na determinação da matéria orgânica em solos contaminados por chorume. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 8, p. 111-115, 2004.
- LIN, SHIOW SHONG. Efeito do tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de palmito. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 8, n. 1, p. 57-66, 1988.
- LIU, Jie; QU, Wei; KADIISKA, Maria B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 238, n. 3, p. 209-214, 2009.
- LUEVANO, Joe; DAMODARAN, Chendil. A review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, v. 33, n. 3, 2014.
- MAINES, Mahin D. Characterization of heme oxygenase activity in Leydig and sertoli cells of the rat testes: differential distribution of activity and response to cadmium. *Biochemical pharmacology*, v. 33, n. 9, p. 1493-1502, 1984.
- MATTIAZZO-PREZOTTO, M.M. Comportamento de cobre, cádmio, cromo, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, p.197, 1994

- IRANDA, C.E.S. Determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com pré-concentração em resina de troca iônica empregando sistema FIA. Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, p.89. 1993.
- MIKULSKI, Marek A. *et al.* Toxic metals in ayurvedic preparations from a public health lead poisoning cluster investigation. *International journal of occupational and environmental health*, v. 23, n. 3, p. 187-192, 2017.
- MRUK, Dolores D.; CHENG, C. Yan. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.
- MUNIZ, D.H.F., OLIVEIRA-FILHO, E.C Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. *Oecological Brazilian*, p.680-693, 2008.
- NEWSHOLME, E.A., LEECH, A.R. 1994. *Biochemistry for the medical science*. Chischester: John Willey & Sons, p.982, 1984.
- NIKNAFS, Behrooz; SALEHNIA, Mojdeh; KAMKAR, Mahmood. Induction and determination of apoptotic and necrotic cell death by cadmium chloride in testis tissue of mouse. *Journal of reproduction & infertility*, v. 16, n. 1, p. 24, 2015.
- NOGAWA K, Kido T. Itai-itai disease and health effects of cadmium. Chang LW, ed. *Toxicology of metals*. New York: CRCpress, p.353–69, 2006.
- OTEIZA, P.I., *et al.* Oxidative defense system in testes from zinc deficient rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicin*, p.85-91, 1997.
- PAN, J., *et al.* 2010. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environmental Geochemistry and Health* 32:1-12.
- PAYNE AH., HALES DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* 25, 947–970, 2004
- PELLINIEMI LJ., *et al.* The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.), *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, 1996.
- PEREIRA, Mauricio Gomes; GALVÃO, Taís Freire. Etapas de busca e seleção de artigos em revisões sistemáticas da literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, p. 369-371, 2014.
- PEROTTONE, J. Avaliação dos efeitos promovidos pelo chumbo, selênio e/ou sacarose em parâmetros oxidativos em roedores. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, p.100, 2006.
- PICOLI, L.C. Efeito do cádmio no soalho da boca de ratos durante a lactação. *Brazilian Oral Review*, p.105-109, 2004.
- POWERS, S. K.; *et al.* Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, p.987–997, 1999.

- POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Review*, p.1243-1276, 2008.
- PREDES, F.S, *et al.* Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology*, p.125–131, 2010.
- PROZIALECK, Walter C.; LAMAR, Peter C. Interaction of cadmium (Cd²⁺) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1451, n. 1, p. 93-100, 1999.
- PROZIALECK, Walter C. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 164, n. 3, p. 231-249, 2000.
- PUTTA, Swathi *et al.* Anthocyanins: Multi-target agents for prevention and therapy of chronic diseases. *Current pharmaceutical design*, v. 23, n. 41, p. 6321-6346, 2017.
- RAHAL, Anu *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. 1985. New York: Hemisphere, v. 666.
- REN, Yaping *et al.* Mechanism of cadmium poisoning on testicular injury in mice. *Oncology letters*, v. 18, n. 2, p. 1035-1042, 2019.
- REY, Rodolfo A. *et al.* Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microscopy research and technique*, v. 72, n. 11, p. 787-795, 2009.
- ROSS, M.H., *et al.* *Histology: A text and atlas*. 4Ed, p. 682-72, 2008.
- RUSSELL, L. D. Mammalian spermatogenesis. *Histological and histopathological evaluation of the testis*, p. 1-40, 1990.
- RUSSELL, Lonnie D. *et al.* *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1993.
- RUSYNIAK, Daniel E. *et al.* Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. *Molecular, clinical and environmental toxicology*, p. 365-396, 2010.
- SAALU, L. C. *et al.* Moringa oleifera Lamarck (drustick) leaf extract modulates the evidences of hydroxyurea-induced testicular derangement. 2011.
- SCALBERT, Augustin; WILLIAMSON, Gary. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.
- SCHLATT, Stefan; MEINHARDT, Andreas; NIESCHLAG, Eberhard. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology*, v. 137, n. 2, p. 107-117, 1997.
- SEO, Min-Young; LEE, Sun-Mee. Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Journal of hepatology*, v. 36, n. 1, p. 72-77, 2002.

- SETCHELL, B. P.; WAITES, G. M. H. Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat. *Journal of Endocrinology*, v. 47, n. 1, p. 81-86, 1970.
- SENGUPTA, Pallav et al. Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015. *African health sciences*, v. 17, n. 2, p. 418-427, 2017.
- SENGUPTA, Pallav et al. Role of *Withania somnifera* (Ashwagandha) in the management of male infertility. *Reproductive biomedicine online*, v. 36, n. 3, p. 311-326, 2018.
- SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. *The physiology of reproduction*, v. 1, p. 1363-1434, 1994.
- SIEWIT, Christina L. et al. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER α and c-Jun. *Molecular Endocrinology*, v. 24, n. 5, p. 981-992, 2010.
- STOCCO, Douglas M.; CLARK, Barbara J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocrine reviews*, v. 17, n. 3, p. 221-244, 1996.
- SU, Linlin et al. Drug transporters and blood–testis barrier function. *The Journal of endocrinology*, v. 209, n. 3, p. 337, 2011.
- SVECHNIKOV, Konstantin V.; SULTANA, Taranum; SÖDER, Olle. Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 182, n. 2, p. 193-201, 2001.
- SYED, V. et al. Ontogeny and cellular origin of an interleukin-1-like factor in the reproductive tract of the male rat. *International journal of andrology*, v. 11, n. 5, p. 437-447, 1988.
- SYLVESTER, S. R. Leydig cell Sertoli cell interaction. *The Leydig cell*. Cache River Press, Vienna, p. 468-475, 1996.
- VANDENBERG, Laura N. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*, v. 33, n. 3, p. 378-455, 2012.
- VARMA, A. *Handbook of atomic absorption analysis*. CRC Press, Boca Raton, 464p, 1986
- VOLESKY, B. *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, Boca Raton, 396p, 1990.
- WAALKES, Michael P. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 533, n. 1-2, p. 107-120, 2003.
- WHO (World Health Organization). Cadmium, in *Air Quality Guidelines*, World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, p 136–138, 2000.
- WHO/FAO/IAEA. World Health Organization. Switzerland: Geneva; 1996. *Trace Elements in Human Nutrition and Health*
- WIRTH, Julia J.; MIJAL, Renee S. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Systems biology in reproductive medicine*, v. 56, n. 2, p. 147-167, 2010.

- WONG, Ching-Hang; CHENG, C. Yan. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Current topics in developmental biology*, v. 71, p. 263-296, 2005.
- WONG, Elissa WP; CHENG, C. Yan. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends in pharmacological sciences*, v. 32, n. 5, p. 290-299, 2011.
- XIONG, YUTING; HALES, DALE BUCHANAN. Expression, regulation, and production of tumor necrosis factor-alpha in mouse testicular interstitial macrophages in vitro. *Endocrinology*, v. 133, n. 6, p. 2568-2573, 1993.
- YANG, Jian-Ming et al. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive toxicology*, v. 17, n. 5, p. 553-560, 2003.
- YANO, C. L.; DOLDER, H. Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment. *Contraception*, v. 66, n. 6, p. 463-467, 2002.
- YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G. A.; KAMEL, K. I. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal reproduction science*, v. 76, n. 1-2, p. 99-111, 2003. YOUSEF, Mokhtar I.; ESMAIL, Alshaimaa M.; BAGHDADI, Hoda H. Effect of isoflavones on reproductive performance, testosterone levels, lipid peroxidation, and seminal plasma biochemistry of male rabbits. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 39, n. 5-6, p. 819-833, 2004.
- YOUSEF, Mokhtar I.; SALAMA, Afrah F. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and chemical toxicology*, v. 47, n. 6, p. 1168-1175, 2009
- YOUSAF, Balal et al. Bisphenol A exposure and healing effects of *Adiantum capillus-veneris* L. plant extract (APE) in bisphenol A-induced reproductive toxicity in albino rats. ***Environmental Science and Pollution Research***, v. 23, n. 12, p. 11645-11657, 2016.
- ZIRKIN, B. R. et al. Testosterone secretion by rat, rabbit, Guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with ley dig cell ultrastructure. *Endocrinology*, v. 107, n. 6, p. 1867-1874, 1980.

ANEXO I

Comprovante de aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais, UFV.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 58/2016, intitulado “Avaliação da atividade antioxidante do açaí da Mata Atlântica *Euterpe edulis* e da Amazônia *Euterpe oleracea* sobre órgãos internos de camundongos machos adultos submetidos ao estresse oxidativo pelo cádmio”, coordenado pelo professor Sérgio Luís Pinto da Matta do Departamento de Biologia Geral, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 30/08/2019, com validade de 12 meses.

ANEXO II**Effects of phenolic phytochemicals in the treatment of male infertility**

Revisão submetida ao periódico Journal of Ethnopharmacology

João Vitor Lopes-Ferreira^a, Júlia Eduarda Mesquita Matos^a, Fernanda Carolina Ribeiro Dias^a, Marcos de Lucca Moreira Gomes^{a*}

^aLaboratório de Interações Celulares, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

*Author for correspondence: MLM Gomes. Praça Manoel Terra 330, Bairro Abadia. Uberaba Minas Gerais, CEP 38025-015. Email: marcos.gomes@uftm.edu.br, tel: (+55)34 3700 6440

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Oxidative stress occurs when the damages caused by high concentrations of reactive oxygen species (ROS), overpass the protective effects of antioxidants enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx). Such imbalance has deleterious action in many systems and organic processes, mainly in the male reproductive system, since oxidative stress leads to damage to deoxyribonucleic acid (DNA) and cellular proteins and lipids. Such events can culminate in the destruction of blood-testis-barrier (BTB), which in turn impairs spermatogenesis, leading to a decrease in sperm count and, motility. In addition, steroidogenesis impairment takes place, leading to a lower production of androgens, which can interfere with male fertility.

Aim of the study: To identify the main phenolic phytochemical compounds and their respective effects when used for the treatment of male infertility.

Methods: Related information concerning phenolic phytochemical compounds was gathered from studies were selected from PubMed, Scopus, and Web of Science databases according to the PRISMA statement. The search was conducted using the combinations of six terms: “phenolic compounds”, “male infertility”, “testis”, “spermatozoa”, “testosterone” and “male fertility”

Results: A total of 1554 articles were found, 830 duplicate documents were excluded, from these, 652 records were excluded in the first selection phase and 3 studies in the second selection phase, leaving 66 articles that met all the eligibility criteria, which were analyzed in this revision. Asia was the region with the most studies with phenolic phytochemical compounds, followed by Africa. Pre-clinical studies showed that rats were the most used animal models and the oral route the most used to test the herbal compounds. The phytochemical phenolic compounds were effective in reversing the damage in testis provoked by environmental pollutants, drugs, pathologies, and sperm cryopreservation. On other hand, high doses of phenolic compounds can cause deleterious effects in sperm.

Conclusions: Phenolic compounds have antagonistic actions to male fertility, depending on the administered dose, and can be used as potential male contraceptives.

Keywords: Phenolic compounds. Male infertility. Phytotherapy. Oxidative Stress. Antioxidants, Reproduction

LIST OF ABBREVIATIONS

- AChE - Acetylcholine esterase
ACTEX - Acetone extract from the cladodes *Opuntia ficus-indica*
BPA - Bisphenol A
BTB- Blood- testis-barrier
CAT - Catase
DM - *Diabetes mellitus*
DNA - Dexorribonucleic acid
ER α e ER β - Estrogens receptors α and β
FSH - Stimulating follicle hormone
GPx - Glutathione peroxidase
GST- Reduced glutathione
iNOS - Nitric oxide synthase
LH - Luteinizing hormone
MTX- Methotrexate
MDA - Malondialdehyde
NF-Kb- Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
NO - Oxid Nitric
TNF- α - Tumoral necrosis factor
ROS- Reactive Oxygen Species
SOD- Superoxide Dismutase

1. INTRODUCTION

Infertility is a prevalent worldwide health problem, characterized by the inability of a couple to achieve pregnancy without the use of contraceptive methods, after one year (Borghet and Wyns, 2018). It is estimated that infertility affects about 9% of couples worldwide, with the male factor contributing 50% in the cases in question (Fainberg and Kashanian, 2019). Male infertility takes place due to genetic, anatomical, physiological, and immunological factors, as well as due to infections, varicocele, age, and lifestyle. Regardless of the cause, all these conditions induce oxidative stress, which plays an important role as the molecular basis of male infertility (Leaver, 2016; Noordin et al., 2020; Sengupta et al., 2018).

Oxidative stress results from an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS) and a reduction in antioxidant defense mechanisms (Noordin et al., 2020; Tvrdá et al., 2016). Human semen contains endogenous antioxidants to protect sperm from oxidative stress, which can be enzymatic and non-enzymatic antioxidants (Sengupta et al., 2018). Although small amounts of ROS are essential for sperm capacitation, hyperactivation, acrosome reaction, and gamete fusion (Sengupta et al., 2018; Mani et al., 2021), problems such as lipid peroxidation of the sperm cell membrane, DNA fragmentation and, thus, apoptosis, can occur when the level of ROS production becomes excessive, negatively affecting sperm parameters (Takeshima et al., 2020).

Phenolic phytochemicals are natural bioactive compounds with high antioxidant potential, which protects biomolecules (such as proteins, nucleic acids, polyunsaturated lipids, and sugars), avoiding the deleterious effects caused by oxidative damage through the elimination of ROS and free radicals, in addition to inhibit or delay the oxidation of substrates (Mahfuz et al., 2021; Mani et al., 2021). Therefore, several studies have reported the use of phenolic phytochemical compounds, such as flavonoids, tannins, and phenolic acids, in the treatment of male infertility (Noordin et al., 2020; Mani et al., 2021).

This systematic review aims to compile the most relevant information regarding the use of phenolic phytochemical compounds as a therapeutic tool in male infertility, answering the following questions: what are the main phenolic phytocompounds associated with the treatment of male infertility? What are the effects of these compounds when used in the treatment of male infertility? Can they be used as a therapeutic tool to reverse the problem at hand? How and on which organs or target cells do they act?

2. METHODOLOGY

2.1 Elaboration of the research question and registration on the Prospero platform

The elaboration of the structured question was carried out using the acronym PICOT as a guide for its formulation. The letter “P” refers to the research target population, which, for this work, were infertile males. The letter “I” indicates which interventions will be the target of research, which is the administration of phenolic phytochemical compounds for the treatment of male infertility. The letter “C” refers to the alternative intervention to the treatment, which will be the absence of treatment. The letter “O” refers to the “outcomes” that relate to the expected outcomes at the end of the research, being the protective effects of phenolic phytochemicals on male fertility. Finally, the letter “T” indicates which study designs will be included in this research, namely: randomized clinical trials and pre-clinical tests (Gregory and Denniss, 2018).

The registration number on the Prospero platform is CRD 295297.

2.2 Search strategy

Different key terms such as “phenolic compounds”, “male infertility”, “testis”, “spermatozoa”, “testosterone” and “male fertility” were searched online using PubMed, Scopus, and Web of Science databases. In all chosen databases, the search was carried out using the previously elaborated search strategy. The Boolean operator “AND” was used to combine the term “phenolic compounds” with each of the other terms, resulting in the following combinations: (phenolic compounds* AND male infertility*), (phenolic compounds* AND testis*), (phenolic compounds* AND spermatozoa*), (phenolic compounds* AND testosterone*) and (phenolic compounds* AND male fertility*). The generated database was organized using the “EndNote” software, through which duplicate articles were automatically and manually excluded.

2.3 Articles selection

This systematic review was carried out according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) guidelines (Liberati et al., 2009), which were used as a guide for the selection, screening, and eligibility of studies (Figure 1). The search was performed on August 5th, 2021, at 11:05 AM. (Table S1).

The articles were selected according to the eligibility criteria, answering the following questions: (1) Is this a randomized clinical trial or pre-clinical study?; (2) Does it have phenolic phytochemicals as the only intervention strategy (i.e. the treatment of male infertility)?; (3) Was it written in English or Portuguese? The answer “yes” to all questions, which are inclusion criteria, is a necessary and sufficient condition for inclusion in the study. On the other hand, articles that answered affirmatively to the following questions were excluded: (1) Does it have a design different from that established?; (2) Does it have an exclusively chemical approach?; (3) Were phenolic compounds not extracted from plants?; (4) Is the abstract unavailable online? The answer “yes” to all these questions, which are exclusion criteria, is a necessary and sufficient condition for exclusion from the study. (Pereira and Galvão, 2014).

Articles selection was made into two stages. In the first stage, the article’s analysis was carried out using their title and abstract regarding their eligibility criteria. All articles were classified in a Microsoft Excel spreadsheet as “E – Excluded” and “I – Included”. Then, in the second stage, the articles were carefully explored, considering the full text and the eligibility criteria previously described, updating the spreadsheet with the included and excluded articles. Both stages were performed using the paired and independent selection technique by JVLF and JEMM, to reduce the risk of selection bias. When discrepancies in the selection were noticed, MLMG and FCRD were responsible for checking and making a final decision on the inclusion or exclusion of such articles (Pereira and Galvão, 2014).

2.4 Data extraction and bias analysis

Data extraction was performed by JVLF and JEMM to reduce the risk of measurement bias. The extracted data were: country of publication, species studied, age, weight and number of animals, size of the experimental groups, performance of randomization, type of analysis, submission to the ethics committee, statistical analysis, type of euthanasia, duration of the experiment, species, family, and part of the plant used. In addition, the types of extracts, the form of extraction, doses, route of administration, frequency, and time of exposure to treatment, main phenolic compounds, and main results found were noted. The evaluation of the risk of bias was made using the SYRCLE Rob Tool (Hooijmans et al., 2014).

2.5 Data synthesis

The extracted data were grouped and tabulated according to the converging points between the studies in order to guarantee the minimum comparability between the results. After the synthesis, the data were discussed regarding their limitations and evidence found in this research.

3. RESULTS

3.1 Identification of studies

A total of 1554 articles were found from 1975 to 2021, from which 830 duplicates were excluded, resulting in 724 articles. After the first selection stage, 652 articles were excluded because they did not meet the inclusion criteria, while 1 was not found, resulting in 71 articles. After the second selection stage 5 articles were excluded since they did not meet the inclusion criteria and, therefore, 66 articles remained for analysis.

3.2 Data extraction

The selected studies were performed in the following countries (25): China (n=9), India (n=8), Iran (n=7), Egypt (n=6), Nigeria (n=5), Brazil (n=3), Tunisia (n=2), Thailand (n=2), Poland (n=2), Pakistan (n=2), Turkey (n=2), France (n=2), Iraq (n=2), Japan (n=2), Slovakia (n=2), Germany (n=1), Saudi Arabia (n=1), Argentina (n=1), Cameroon (n=1), United States (n=1), Greece (n=1), Morocco (n=1), Mexico (n=1), South Africa (n=1), Serbia (n=1), and Sweden (n=1). 52% of the studies were carried out on the Asian continent, with emphasis on China and India; 24% in Africa, especially Egypt, 14% in Europe, especially France; 6% in South America, with emphasis to Brazil; 1% in Central America, with emphasis to Mexico and 1% in North America, with emphasis on the United States of America. From all the studies, 67% were performed *in vivo*, 42% conducted randomized trials, 63% explicitly submitted to the ethics committee, 97% performed the statistical analysis, and 24% performed euthanasia after anesthesia. Forty-one plant species and 72 different phenolic compounds were studied. Quercetin was the most common phytochemical compound found in the studies (n=16) and the most studied plant species were *Tetracarpidium conophorum* (Müll.Arg.) Hutch. & Dalziel (n=2), *Punica granatum* L. (n=2), *Origanum vulgare* var. *albidum* Bellynck (n=2), *Moringa oleifera* (n=2) and *Cuscuta chinensis* var. *applanata* (Engelm.) Costea & Stefanov. (n=2).

Rats were the most used animal models, being described the Wistar (n=18), Sprague-Dawley (n=11), *Rattus norvegicus* (n=3), and Druckrey (n=1) strains. The human model (n=5) and Swiss (n=3), Balb/c (n=2), Kunming (n=2) and *Mus musculus* (n=1) strains were also used. Some articles fail to identify the murine models (n=6). Studies were also carried out on Boujaâd sheep (n=1), Lori-Bakhtio-ari (n=1) and Friesian (n=1), Friesian Holstein bulls (n=3), Goats (n=1), Agu 1 pigs and 2 (n=1) and Duroc (n=1), New Zealand rabbits (n=2), Arbo acre chickens (n=1) and unspecified chicken (n=1), *Drosophila* flies (n=1) and Zebrafish (n=1).

The articles selected for this review can be classified into four categories, namely: articles that investigated the testicular protective action of phenolic phytochemicals against damage caused by (1) pathologies (n=10), (2) environmental pollutants (n=23), (3) drugs (n=7) and (4) studies that observed the direct action of phenolic compounds on sperm and testicular parenchyma (n=24).

In the first category, the pathologies with repercussions on male fertility treated with phenolic phytochemicals were: DM (n=2), erectile dysfunction, bacterial infection (n=1), inflammation (n=1), prostatic hyperplasia (n=2), testicular torsion (n=1), obesity (n=1), hyperthyroidism (n=1) and oxidative stress (n=1) (Table 1).

In the second category, the studied environmental stress substances that affect the male reproductive system were: bisphenol A (n=6), lead (n=2), carbon tetrachloride (n=2), cadmium chloride (n=2), di-2-ethyl-hexyl-phthalate (n=1), iron sulfate (n=1), dimethoate (n=1), zearalenone (n=1), sodium arsenite (n=2), sulfur mustard (n=1), 4-nitro-3-phenylphenol (n=1), polychlorinated biphenyl (n=1), aluminum chloride (n=1), hydroxyurea (n=1), and sodium arsenate (n=1) (Table 2).

The third category described the following drugs with testicular toxic potential: cisplatin (n=2), streptomycin (n=1), dexamethasone (n=1), bulsufan (n=1), doxyrubicin (n=1) and methotrexate (n=1) (Table 3).

In the fourth category, the actions of the following extracts and isolated phenolic compounds on the testicular parenchyma and sperm were analyzed: resveratrol (n=3); acetone extract from the cladodes *Opuntia ficus-indica* (ACTEX) (n=1); clove bud extract (*Syzygium aromaticum*) (n=1), essential oil of *Thymus munbyanus* Boiss & Reuters (n=1), extract of *Origanum vulgare* var. *albidum* Bellyneck (n=2), dietary supplementation with sprouted wheat (n=1), crude methanolic extract of *Nigella sativa* L. (n=1), green tea (n=1), extracts obtained from aerial parts *Cocculus hirsutus* (L.) W.Theob. (n=1), the leaf extract

of *Albizia harveyi* E.Fourn. (n=1), tannic acid (n=2), ellagic acid (n=1), polyphenols present in the chemical matrix of guarana (*Paullinia cupana* Kunth) (n=1), Picroliv (n=1), dietary supplementation of pomegranate seed (n=1), *Terminalia chebula* (n=1), gallic and pergalonic acid (n=1) (Table 4).

3.3. Treatment and affected metabolic pathways

Regarding the routes of administration of the extracts, 50% of the studies (n=33) chose the oral route, 6% chose the peritoneal route (n=4), 1.5% used the subcutaneous route (n=1). In addition, 33.3% of studies used cell samples (n=22) and the extracts were administered directly to the samples. For the effects of the compounds on the testicular parenchyma, it is possible to highlight the antioxidant effects of the extracts, marked by the reduction of the lipid peroxidation levels (n=12), and enhancement of antioxidant enzymes activity (i.e. catalase, reduced glutathione peroxidase, and superoxide dismutase, n =17).

Considering the endocrine function and testicular biochemistry, the studies described increased testosterone production (n=10), FSH suppression in immature Sertoli cells (n=1), increased serum LH levels (n=2), reduction in serum estradiol levels (n=1), anti-androgenic effects (n=2), inhibition of P450Ac17 (n=1), estrogenic effects (n=1), inhibition of acrosomal enzymes (n=2), inhibition of plasminogen activator (n=1). =1), anti-hyaluronidase activity (n=1), inhibition of 5 α -reductase expression (n=1), decreased androgen receptor expression (n=1), decreased NF-Kb, iNOS expression, TNF- α gene overexpression (n=1), regulation of ER- α and β (n=1) and improvement of seminal pH (n=1).

At the cellular level, the administration of extracts and isolated phenolic compounds indicates cryoprotection of sperm (n=1), increases motility (n=8), quantity (n=4) and viability of sperm (n=8), decreases abnormalities (n=5) and sperm DNA fragmentation (n=3), with the protection of sperm integrity (n=3), decreased polyspermy (n=1) and increased sperm density (n=1). On the other hand, some studies indicate a decrease in sperm motility (n=3) and viability (n=2), with reduced mitochondrial viability (n=1).

In the testicular parenchyma, the studies show an increase in the number of Leydig cells (n=1) and germ cells (n=2), improvement in morphology (n=1), with a decrease in germ cell apoptosis (n=1), restoration of germ cells (n=1) and attenuation of damage to spermatogenesis (n=3), maintenance of testicular histoarchitecture (n=9), and normalization of the structure of the seminiferous tubules (n=1). In the prostate, there is a

reduction in prostatic cell hyperplasia (n=1), attenuation of prostatic inflammation (n=1), and normalization of prostatic histological parameters (n=1). Finally, the increase in testicular and penile endothelial cell activity is described (n=1).

4. DISCUSSION

4.1 Use of phenolic phytochemicals around the world

Since 3000 B.C., plants have been used a therapeutic resource due to their medicinal properties (SULAMAN and MING, 2016). The extent of the use of herbal medicines by people involves factors linked to culture and economy (Astutik and Pretzsch, 2019). Asia currently comprises many developing countries and this characteristic is present among nations that use traditional medicine, ostensibly, to treat health problems (Escap, 2020). However, even great Asian economic powers, such as China and India, make use of this therapeutic tool and have the export of herbal medicines as an important pillar of the economy. Many of the species are used as aphrodisiacs and for the treatment of male infertility, sustained by the decline in fertility of the male population. According to Sengupta et al. (2018), there has been a 22.17% decline in sperm concentration among Asian men in the last 50 years. The present review corroborates this scenario, pointing out the Asian continent as the greatest exponent in the research for phenolic phytochemical compounds for the treatment of male infertility, especially in China and India (Figure 2).

Such as described for Asia, in Africa 80% of the rural and urban population have traditional medicine as the main form of health care (Mothibe and Sibanda, 2019). The African male population also faces an intense decline in sperm concentration, with a 73.2% decrease in sperm concentration between 1965 and 2015, and Nigeria is the country with the highest rates of male infertility (Sengupta et al., 2017). For this reason, the African continent appears as the second region in the world with the largest number of studies in search of phenolic phytochemical compounds to reverse male infertility, mainly in Egypt and Nigeria (Figure 2).

Most studies using phenolic phytochemicals in the treatment of pathologies, intoxication by environmental pollutants or drugs that lead to male fertility impairment, applied oral administration for a subacute period of time (Eaton and Gilbert, 2001), i.e. for more than up to 30 days. Such studies showed promising results in the reversal or attenuation of the respective injuries to the testicular parenchyma since the

biotransformation and absorption of phenolic compounds depend on the degradation carried out by the intestinal microbiota, making them more water-soluble and of easy transport and distribution through the bloodstream (Crozier and Del Rio, 2010). However, interactions with molecules, present in the stomach and small intestine, or even interactions with other foods can decrease their serum availability, which makes subacute administration adequate, so that the ideal amount of phenolic compounds for inducing protective effects on cells and tissues (Scalbert and Williamson, 2000). Therefore, oral administration, with subacute duration, seems to be the most adequate to promote the protection of male fertility.

There is a wide range of the described administered doses, varying from 0.1 µg/mL - 1000 µg/mL for (*in vitro*) to 5mg/kg - 1000mg/kg for (*in vivo*), which makes it difficult to standardize treatments, especially among studies describing cryoprotection of sperm using phenolic compounds. However, among the studies carried out using plant extracts in murine models, it was possible to establish that doses between 200 and 400 mg/kg are effective for the treatment of injuries to the male reproductive tract without complications.

Most published studies (60%) aimed to use phenolic phytochemical compounds to reverse damage to the testicular parenchyma induced by: (1) pathologies: diabetes mellitus (3.03%); obesity (1.51%); testicular torsion (1.51%); hyperthyroidism (1.51%); prostatic hyperplasia (3.03%); erectile dysfunction (1.51%), inflammation (1.51%) and oxidative stress (1.51%), (3.03%) environmental pollutants: sodium arsenite (3.03%), cadmium chloride (3.03%), aluminum chloride (1.51%), bisphenol A (10.6%), iron sulfate (1.51%), lead (1.51%), lead acetate (1.51%), zearalenone (1.51%), carbon tetrachloride (1.51%), sulfur mustard (1.51%), 4-nitro-3-phenyl-phenol (1.51%), polychlorinated biphenyl (.51%) , hydroxyurea (1.51%), diethylhexyl phthalate (1.51%); (3) drugs: methotrexate (1.51%), cisplatin (3.03%), doxorubicin (1.51%), busulfan (1.51%), dexamethasone (1.51%) and streptomycin (1.51%). After analyzing such studies, we noticed that the phenolic compounds proved to be effective in attenuating or reversing the damage to the testicular parenchyma caused by the mentioned factors, mainly through the modulation of enzymatic antioxidant defenses.

4.2 Mechanism of action of phenolic phytochemical compounds on the testicular parenchyma

Several environmental and physiological stressors have oxidative stress as a way of causing testicular changes such as the reduction in the number and volume of germ and somatic cells, atrophy of the seminiferous tubules, decrease in testosterone synthesis, decrease in sperm motility and viability and fragmentation of the sperm. DNA from these cells (Roy et al., 2015; Allai et al., 2016). The set of these changes is capable of inducing male infertility, and in this sense, antioxidant therapy with phenolic compounds is useful to attenuate this condition.

After the hepatic metabolism, which involves the methylation and glucuronidation processes that give the amphipathic nature of the structure of phenolic compounds, the process of absorption through cell plasma membranes becomes facilitated (Hussain et al., 2019). In the testicular parenchyma, phenolic compounds have antioxidant mechanisms as their primary target; by increasing the activity of enzymes such as catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase, phenolic compounds are able to improve the oxidative status of the testicular environment.

By balancing antioxidant defenses, processes such as lipid peroxidation, DNA fragmentation, and cellular apoptosis are marked by decreased overexpression of the NF- κ B, TNF- α , and iNOS genes (Fahmy et al., 2020). According to Seif et al. (2021), the administration of 100mg/kg of the ethanolic extract of *Zingiber officinale* var. *cholmondeleyi* F.M.Bailey, in mice contaminated with sodium arsenite, was able to increase LH levels, thus testosterone production, showing that phenolic compounds such as gallic acid, quercetin, tannic acid, all present in the extract, are able to act on the pituitary-gonadal axis, favoring the synthesis of testosterone carried out by Leydig cells.

4.3 Action of phenolic compounds in the treatment of diseases of the male reproductive tract

4.3.1 Effects of phenolic phytochemicals on testicular damage caused by diabetes mellitus

Several diseases affect the male reproductive system and some of them, through different mechanisms, lead to infertility. Diabetes Mellitus (DM) is a pathology that causes dysfunction in the metabolism of proteins, lipids, and carbohydrates, due to the absence or non-functioning of the insulin hormone, which in turn generates a constant condition of hyperglycemia (Kharroubi and Darwish, 2015). In the male reproductive system, DM is

capable of producing effects such as decreased testosterone concentration, increased lipid peroxidation of cell membranes, decreased activity of antioxidant enzymes, abnormalities in the morphology of the seminiferous tubules, which in the long term can generate infertility (Omolaoye and Du Plessis, 2018).

Plant extracts with significant amounts of phenolic compounds can help manage the harmful effects of diabetes on the male reproductive system, as these compounds show antioxidant and anti-inflammatory activity. As observed in the study carried out by Afshari et al. (2019), who induced DM in rats through the administration of nicotinamide and streptomycin, and used the hydroalcoholic extract of *Eryngium caucasicum*, rich in flavonoids, as a treatment, at doses of 100, 200 and 300 mg/kg. As a result, the testosterone level was increased, while lipid peroxidation markers such as malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were lower in the treated animals. Similar results were verified by Roy et al. (2015), who induced DM in adult Wistar rats, through the administration of alloxan, and used treatment with 100 and 400 mg/kg of *Mallotus roxburghianus* Müll. Arg methanolic extract. Several phenolic compounds such as malotoxin, myricetin, kaempferol, bergenine, hydroxybenzoic acid, and gallic acid, were described within the extract, which shows great antioxidant biological activity. The extract showed a mitigating effect on the damage caused by DM, such as a decrease in MDA levels, an increase in testosterone levels, and normalization of the histoarchitecture of the seminiferous tubules.

4.3.2 Effects of phenolic phytochemical compounds on testicular damage caused by obesity

Obesity is defined as the excessive accumulation of adipose tissue in the body, and as DM, it is a public health problem. Obesity represents a risk factor for several diseases, such as arterial hypertension, diabetes, acute myocardial infarction, and cerebrovascular accident. Among the harmful mechanisms generated by obesity, such as increased body temperature, insulin resistance, and increased estrogen concentration, it is possible to highlight oxidative stress as one of the main forms of injury, since adipose tissue has a pro-inflammatory action, which in turn facilitates the production and exacerbated release of reactive oxygen species in obese individuals (Katib, 2015).

Obesity can lead to problems such as decreased testosterone concentration, decreased sperm quality, and, ultimately, decreased male fertility (Sallmén et al., 2006).

Treatment with phenolic compounds, such as isoflavones, caused improvement in testosterone levels, increased sperm motility and increased antioxidant activity (Luo et al., 2019). Despite isoflavones show anti-androgenic activity due to their similarity to estrogens, the study showed that the administration of isoflavones resulted in an increase in the antioxidant defenses, leading to higher sperm motility, rates and concentration, with lower gamete abnormalities.

4.3.3 Effects of phenolic phytochemicals on testicular damage caused by hyperthyroidism

Hyperthyroidism can affect male fertility. When in homeostasis, the thyroid has functions such as body energy regulation, as well as influencing the development and growth of testicular cells, helping in the maturation and proliferation of germ cells. However, hyperthyroidism favors the emergence of reactive oxygen species and consequently generates oxidative stress, which is capable of altering testicular cells through plasma membrane destruction, DNA damage, and induction of cellular apoptosis (Krajewska-Kulak, 2013). A study aimed at mitigating the harmful effects of hyperthyroidism on testicular antioxidant defenses and on sperm quality yielded promising results (Ourique et al., 2013). Resveratrol administered at doses of 1 and 100 mg/kg, intraperitoneally, in adult Wistar rats affected by the disease, increased sperm motility and reestablished antioxidant defenses, confirmed by decreased levels of MDA and increased activity of the catalase enzyme.

4.4 Effects of phenolic phytochemical compounds against injuries caused by environmental pollutants

Environmental pollutants represent a major threat to public health, being identified as one of the risk factors for male fertility. Metallic compounds such as iron sulfate, lead acetate, sodium arsenite, aluminum chloride, and cadmium chloride, have harmful effects on the testicular parenchyma, leading to lipid peroxidation of testicular and penile cells, atrophy of the seminiferous tubules, decreased testosterone levels, necrosis of spermatocytes and spermatids, decreased Leydig cells and decreased testicular cell viability (El-Demerdash et al., 2009; Akomolafe et al., 2015; Dewanjee et al., 2015; Aksu et al., 2015; Aksu et al., 2017; Mohamed and El-Moneim, 2017; Mouro et al., 2020).

The main toxicity mechanism used by metallic compounds is oxidative stress, which makes the antioxidant properties of phenolic phytochemical compounds valuable for the treatment of damage mediated by this process. The study conducted by Mouro et al. (2020), used the oil from *Euterpe oleracea* Mart. (50, 100, and 150mg/kg) for the treatment of mice intoxicated by cadmium chloride. The oil was able to restore testosterone levels and the seminiferous tubules architecture, as well as to increase antioxidant activity. Part of this effect can be explained by the content of anthocyanins present in *E. oleracea* oil, conferring an antioxidant capacity to the compound. Similar results were found when using the extract of *Ginkgo biloba* f. *aurea* (J.Nelson) Beissn to attenuate testicular lesions caused by aluminum chloride, with increased levels of testosterone and antioxidant enzymes being observed (Mohamed and El-Moneim, 2017).

Other pollutants that cause testicular deleterious actions are present in plastic materials, such as bisphenol A (BPA) and di-ethylhexyl-phthalate, which compromise antioxidant activity, disorganize the testicular histoarchitecture, and reduce testosterone and luteinizing hormone productions. The study carried out by Grami et al. (2018), used the aqueous extract of *Eruca sativa* var. *eriocarpa* (Boiss.) Post at dosages from 15.6 to 1000 µg/mL to mitigate the harmful effects of BPA. This extract has 5 different phenolic compounds (gallic acid, quercetin, kaempferol, cirisilineol, and acacetin) that reveal the antioxidant potential of the extract. The study showed that low doses of the extract were able to reverse the damage caused by BPA, restoring cell viability and sperm motility, however high doses of the same extract resulted in functional impairment of sperm. Male gametes need a minimum amount of reactive oxygen species for their capacitation, that is, excess antioxidant molecules are also toxic to sperm.

4.5 Role of phenolic phytochemical compounds in the control of adverse drug effects on the male reproductive system

Treatments for neoplasms that involve cytotoxic mechanisms are closely linked to adverse effects linked to testicular damage and male infertility on a temporary or permanent basis. Methotrexate, cisplatin, doxorubicin, and busulfan are chemotherapeutic drugs that have side effects on the testicular parenchyma, such as a decrease in the amount of sperm, germ, and somatic cells. When albino mice took 5 to 40mg/kg/day of methotrexate (MTX), a high number of abnormalities in the sperm head were noticed

(Padmanabhan et al., 2008, Al-Ezzy et al., 2019). Such abnormalities were fully reversed after administration of *Achillea millefolium* extract at doses of 100 and 200 mg/kg (Al-Ezzy et al., 2019). Part of the observed effect can be attributed to the significant amount of phenolic compounds such as caffeic and salicylic acids, which are able to inhibit the formation of free radicals and increase the activity of enzymes with GST and SOD, conferring great antioxidant capacity to the extract (Ibraheem, et al., et al., 2009).

Studies performed by Fahmy et al. (2020) and Boroja et al. (2018), used the methanolic extracts of *Clinopodium hortense* (L.) Kuntze (200, 400, and 600 mg/kg) and *Ficus carica* Linn (50, 100, and 200 mg/kg), respectively, to mitigate the effects of cisplatin on the testicular parenchyma. The methanolic extract of *C. hortense* is made of 20 phenolic compounds, being rosmarinic acid (24900.67 μ g/g), caffeic acid (1285.42 μ g/g), and naringenin (1061.75 μ g/g) the most abundant ones, giving the extract anti-inflammatory and antioxidant status. Such extracts are able to increase testosterone levels and decrease apoptosis in the testicular tissue, thus attenuating the histological changes caused by cisplatin. Beneficial effects were also observed using the methanolic extract of *F. carica* Linn, which increased the number of sperm in the lumen of the seminiferous tubules.

Other extracts such as *Olea europaea* subsp. *africana* (Mill.) P.S.Green and the alcoholic extract of *Citrus paradisi* Macfad were also used to mitigate the deleterious effects of chemotherapeutics, these being busulfan and doxorubicin. *O. europaea* subsp. *africana* (Mill.) P.S.Green was applied at the doses 200, 400, and 600 mg/kg, decreasing the apoptotic process of spermatogenic cells, increasing the number of Leydig cells and primary spermatocytes, thus fertility (Ganjalikhan Hakemi et al., 2019). Such effects were also described after the use of the alcoholic extract of *C. paradisi* Macfad, at a dose of 10 mg/kg (Saalu et al., 2010).

Plant extracts rich in phenolic phytochemical compounds can also be used to attenuate the testicular toxic effects of dexamethasone, a corticosteroid that has immunosuppressive and anti-inflammatory properties. Dexamethasone is capable of inducing effects such as vacuolization of the nucleus of the cytoplasm of germ cells, obliteration of the lumen of the seminiferous tubules, increase in sperm morphology abnormalities, and degeneration of Leydig cells (El-Wassimy et al., 2014). However, the methanolic extract of *Moringa oleifera* (400 mg/kg) was effective to revert such damage, improving the morphology of testicular germ cells, aiding in testicular antioxidant defense,

inhibiting lipid peroxidation and DNA damage, decrease in sperm abnormalities, and androgenic effect.

4.6 Action of phenolic phytochemical compounds on testicular parenchyma cells

The effects of phenolic phytochemical compounds directly on testicular cells were evaluated by 40% of the studies. Among them, the main cell types studied were sperm (69.23%); germ cells (11.53%); Leydig cells (11.53%), and Sertoli cells (3.84%). The most explored aspect was the protective effects of phenolic compounds on cryopreserved sperm.

Sperm cryopreservation is routinely used to store gametes for future assisted reproduction processes. However, the sperm freezing process results in cellular damage such as DNA fragmentation, plasma membrane peroxidation, and decreased sperm motility and viability, making the fertilization process difficult. Part of the damage induced by freezing is due to the imbalance between antioxidant and cellular pro-oxidant molecules, which in turn generate oxidative stress (Hezavehei et al., 2018). Thus, the administration of extracts containing phenolic compounds or even administration of these compounds in isolation can help in the recovery of sperm parameters.

The oil of *Origanum vulgare* var. *albidum* Bellynck was tested at doses of 2, 4, 8, 12, 16, and 20 mL/dL as a cryoprotectant during the cryopreservation process of sperm samples from Holstein bulls (Daghigh Kia et al., 2016). There was an increase in the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes in the samples that received doses of 4 and 8 mL/dL of the oil, which showed a lower rate of lipid peroxidation. On the other hand, the higher doses (12 and 16 mL/dL) inhibited all sperm oxidative activity, causing damage to sperm motility. Higher doses of the ethanolic extract of the same species (37.5, 75, 150, 300 µg/mL) caused the reduction of sperm motility, viability, and mitochondrial viability, causing irreversible damage to gamete structure and function (Ďuračka et al., 2019). Based on these findings, the importance of maintaining basal levels of reactive oxygen species for the proper functioning of spermatozoa is evident (Figure 3).

CONCLUSION

Although the studies included in this review are heterogeneous in terms of experimental designs, it was clear that the main protective mechanisms of phenolic

phytochemical compounds in the treatment of male infertility involve a reduction in lipid peroxidation, increase in antioxidant enzymes activity, and androgenic effects. In addition, this class of compounds showed substantial efficacy in the treatment of diseases, intoxications, and processes that involve oxidative stress as a harmful mechanism. On the other hand, sperm are particularly sensitive to excess phenolic compounds, thus this cell type needs a basal amount of reactive oxygen species, sufficient to carry out the capacitation process. Based on the above, phenolic compounds have antagonistic actions to male fertility, depending on the administered dose, and can even be used as potential male contraceptives.

LIMITATIONS

Limitations are present in all reviews, being more evident in studies of systematic reviews, as flaws in methods and incomplete information produce imprecise and unreliable conclusions. The main limitations were evidenced by the analysis of bias, where fundamental characteristics, such as generating a random sequence or evaluating the random result and blinding the participants (caregivers and evaluator of the result) were not described in the studies. Our results show that the main limitation was the heterogeneity of the studies, making comparison difficult (Figures 4 and 5). In general, the evidence from the individual studies was quite heterogeneous, preventing statistical comparison of the data. Comparison of heterogeneous data should be avoided, as it promotes a generalization that is not supported by the available data. Thus, this heterogeneity prevents extrapolating the effects to the families of plants studied, or class of compound, and the large dose variation observed in the studies prevents us from making a dose/effect relationship.

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author's contributions

JVLF and JEMM collected and analyzed the data, and wrote the manuscript. FCRD and MLMG revised the data and inclusion/exclusion criteria, as well as corrected the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank FAPEMIG for the financial support (APQ-02736-18).

REFERENCES

- Abd El-Fattah, A. A., Fahim, A. T., Sadik, N. A. H., & Ali, B. M. (2016). Resveratrol and curcumin ameliorate di-(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular injury in rats. *General and comparative endocrinology*, 225, 45-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.006>
- Adegoke, E. O., Rahman, M. S., & Pang, M. G. (2020). Bisphenols threaten male reproductive health via testicular cells. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 624. ASTUTIK, Sri; PRETZSCH, Jürgen; NDZIFON KIMENGSI, Jude. Asian medicinal plants' production and utilization potentials: A review. *Sustainability*, v. 11, n. 19, p. 5483, 2019. doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00624>
- Afshari, M., Malayeri, A. R., & Mohammadshahi, M. (2019). Effects of *Eryngium caucasicum* extract on Testosterone, inflammation and oxidative status of Nicotinamide-Streptozotocin induced Type-2 Diabetes in male rats. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 5(2). doi: <https://doi.org/10.22317/jcms.v5i2.568>
- Akomolafe, S., Oboh, G., Olasehinde, T., Oyeleye, S., & Ogunsuyi, O. (2017). Modulatory effects of aqueous extract from *Tetracarpidium conophorum* leaves on key enzymes linked to erectile dysfunction and oxidative stress-induced lipid peroxidation in penile and testicular tissues. *J Appl Pharm Sci*, 7(01), 051-056. doi: <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2017.70107>
- Aksu, D. S., Sağlam, Y. S., Yildirim, S., & Aksu, T. (2017). Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice on kidney, liver, heart and testis histopathological changes, and the tissues lipid peroxidation and antioxidant status in lead acetate-treated rats. *Cellular and Molecular Biology*, 63(10), 33-42. doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2017.63.10.5>
- Al-Ezzy, R. M., whayeb Abood, K., Abdullah, J. M., & Rdeef, A. K. Evaluation of Sperm Head Abnormality Traits and Anti-bacterial Properties of *Achillea millefolium* Methanolic Extract on Methotrexate-induced Albino Male Mice. doi: <http://dx.doi.org/10.25258/ijddt.v9i3.23>
- Allai, L., Druart, X., Öztürk, M., BenMoula, A., Nasser, B., & El Amiri, B. (2016). Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA

- fragmentation during liquid storage. *Animal reproduction science*, 175, 1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.013>
- Baghshahi, H., Riasi, A., Mahdavi, A. H., & Shirazi, A. (2014). Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*, 69(3), 482-487. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.009>
- Bakır, E., Sariözkan, S., Ünlü Endirlik, B., Baldemir Kılıç, A., Hanım Yay, A., Cantürk Tan, F., ... & Türk, G. (2020). Cherry laurel fruit extract counters dimethoate-induced reproductive impairment and testicular apoptosis. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 71(4), 329-337. doi: <http://dx.doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3412>
- Boroja, T., Katanić, J., Rosić, G., Selaković, D., Joksimović, J., Mišić, D., ... & Mihailović, V. (2018). Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 252-263. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.001>
- Buncharoen, W., Saenphet, K., Saenphet, S., & Thitaram, C. (2016). *Uvaria rufa* Blume attenuates benign prostatic hyperplasia via inhibiting 5 α -reductase and enhancing antioxidant status. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 483-494. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.036>
- Chikhoun, A., Stouvenel, L., Iguer-Ouada, M., Hazzit, M., Schmitt, A., Lorès, P. & Touré, A. (2015). In-vitro effects of Thymus munbyanus essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reproductive Biomedicine Online*, 31(3), 411-420. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.011>
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>
- Daghigh Kia, H., Farhadi, R., Ashrafi, I., & Mehdipour, M. (2016). Anti-oxidative effects of ethanol extract of *Origanum vulgare* on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved Holstein bull spermatozoa. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6(4), 783-789. doi: 0.22034/aej.2020.135491
- Dewanjee, S., Dua, T. K., Khanra, R., Das, S., Barma, S., Joardar, S., & Jaafar, H. Z. (2015). Water spinach, *Ipomoea aquatica* (Convolvulaceae), ameliorates lead toxicity by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *PloS one*, 10(10), e0139831. DOI: 10.1371/journal.pone.0139831

- Ďuračka, M., Galovičová, L., Slávik, M., Árvay, J., & Tvrdá, E. (2021). The in vitro effect of the *Origanum vulgare* extract on semen. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 1089-1092. doi: 10.15414/jmbfs.2019.8.4.1089-1092
- El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., & Radwan, F. M. (2009). Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 249-254. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.013>
- Eleazu, K., Maduabuchi Aja, P., & Eleazu, C. O. (2021). Cocoyam (*Colocasia esculenta*) modulates some parameters of testosterone propionate-induced rat model of benign prostatic hyperplasia. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-11. doi: <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1892956>
- El-Newary, S. A., Afifi, S. M., Aly, M. S., Ahmed, R. F., El Gendy, A. E. N. G., Abd-ElGawad, A. M., ... & Elshamy, A. I. (2021). Chemical Profile of *Launaea nudicaulis* Ethanolic Extract and Its Antidiabetic Effect in Streptozotocin-Induced Rats. *Molecules*, 26(4), 1000. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26041000>
- El-wassimy, M. T., El Haliem, N. G., Hegazy, M. F., Younes, S. H., & Al-Badry, H. A. (2014). Possible protective effect of *Moringa oleifera* leaf extract on dexamethasone-induced histological changes in adult rat testes. *Egyptian Journal of Histology*, 37(1), 112-123. doi: 10.1097/01.EHX.0000444076.09624.f8
- ESCAP, U. (2020). Economic and social survey of Asia and the Pacific 2020: towards sustainable economies. Vander Borght, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62, 2-10
- Fainberg, J., & Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*, 8. doi: <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>
- Fallas-López, M., Rodríguez-De Lara, R., Bárcena-Gama, R., Esqueda, M. S. T., Hernández-Sánchez, D., Martínez-Hernández, P. A., & Aguilar-Romero, O. (2011). Rabbit sexual behavior, semen and sperm characteristics when supplemented with sprouted wheat. *Animal reproduction science*, 129(3-4), 221-228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.12.009>
- Ferrari, R. (2015). Writing narrative style literature reviews. *Medical Writing*, 24(4), 230-235. doi: <http://dx.doi.org/10.1179/2047480615Z.000000000329>

- Gorga, A., Rindone, G. M., Regueira, M., Pellizzari, E. H., Camberos, M. D. C., Cigorraga, S. B., ... & Meroni, S. B. (2018). Effect of resveratrol on Sertoli cell proliferation. *Journal of cellular biochemistry*, 119(12), 10131-10142. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.27350>
- Grami, D., Rtibi, K., Selmi, S., Jridi, M., Sebai, H., Marzouki, L. & De Toni, L. (2018). Aqueous extract of *Eruca Sativa* protects human spermatozoa from mitochondrial failure due to bisphenol A exposure. *Reproductive Toxicology*, 82, 103-110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.10.008>
- Gregory, A. T., & Denniss, A. R. (2018). An introduction to writing narrative and systematic reviews—Tasks, tips and traps for aspiring authors. *Heart, Lung and Circulation*, 27(7), 893-898. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hlc.2018.03.027>
- Hakemi, S. G., Sharififar, F., Haghpanah, T., Babae, A., & Eftekhari-Vaghefi, S. H. (2019). The effects of olive leaf extract on the testis, sperm quality and testicular germ cell apoptosis in male rats exposed to busulfan. *International journal of fertility & sterility*, 13(1), 57. doi: <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5520>
- Hamady, J. J., Ganim, K. G., & Ali, Z. S. (2016). Effect of Methanolic and Phenolic Extracts of *Nigella sativa* Seeds on Testicular Expression Levels of inhibin alpha and beta Genes in Mature Male Wistar Rats. *J. Appl. Pharm. Sci*, 6, 118-121. doi: <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2016.60818>
- Hanchinalmath, J. V., & Londonkar, R. (2014). In-vitro antioxidant activity of *Feronia limonia* in Rat testicular homogenate. *Int J Pharmaceut Sci Rev Res*, 27(1), 168-171.
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive biomedicine online*, 37(3), 327-339. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hooijmans, C. R. Rovers, M. M., de Vries, R. B. M., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M. Langendam, M. W. (2014). SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Medical Research Methodology*, 14:43. doi: <http://10.1186/1471-2288-14-43>
- Ibraheem, N. A., Al-Ezy, R. M., Al-Yasand, M. C., & Al-Naimy, E. H. (2009). The effect of lactobacillus acidophilus concentrated filtrate on sperm head abnormality in albino male mice. *Al-Nahrain Journal of Science*, 12(4). doi: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.13028.22404>
- Ilacqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C., & Aversa, A. (2018). Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reproductive Biology*

- and Endocrinology*, 16(1), 1-11. HUSSAIN, Muhammad Bilal et al. Bioavailability and metabolic pathway of phenolic compounds. In: **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**. IntechOpen, 2019. doi: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-018-0436-9>
- Jahromi, A. R., Rasooli, R., Kamali, Y., Ahmadi, N., & Sattari, E. (2017). Short-term effects of date palm extract (*Phoenix dactylifera*) on ischemia/reperfusion injury induced by testicular torsion/detorsion in rats. *Pharmacognosy research*, 9(1), 69. doi: <http://dx.doi.org/10.4103/0974-8490.199769>
- Joseph, R., & Binitha, R. N. (2020). Screening of potential antiandrogenic phytoconstituents and secondary metabolites of *Terminalia chebula* by docking studies. *Materials Today: Proceedings*, 25, 316-320. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.593>
- Katib, A. (2015). Mechanisms linking obesity to male infertility. *Central European journal of urology*, 68(1), 79. KHARROUBI, Akram T.; DARWISH, Hisham M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 6, p. 850, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.5173/ceju.2015.01.435>
- Kaur, S., & Sadwal, S. (2020). Studies on the phytomodulatory potential of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) on bisphenol-A induced testicular damage in mice. *Andrologia*, 52(2), e13492. doi: <https://doi.org/10.1111/and.13492>
- Krajewska-Kulak, E., & Sengupta, P. (2013). Thyroid function in male infertility. *Frontiers in endocrinology*, 4, 174. doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00174>
- Kumar, P., Laloraya, M., & Laloraya, M. M. (1989). The effect of some of the polyphenolic compounds on sperm motility in vitro: a structure-activity relationship. *Contraception*, 39(5), 531-539. doi: [https://doi.org/10.1016/0010-7824\(89\)90108-x](https://doi.org/10.1016/0010-7824(89)90108-x)
- Kumar, T., Chaiyasut, C., & Suttajit, M. (2011). Screening of steroid 5-reductase inhibitory activity and total phenolic content of Thai plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7), 1265-1271.
- Lara, N. L., Costa, G. M., Avelar, G. F., Lacerda, S. M. S. N., Hess, R. A., & França, L. R. D. (2018). Testis physiology—overview and histology. *Encyclopedia of Reproduction; Skinner, MK, Ed.; Academic Press: New York, NY, USA*, 105-116. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64567-1>
- Leaver, R. B. (2016). Male infertility: an overview of causes and treatment options. *British Journal of Nursing*, 25(18), S35-S40. doi: <https://doi.org/10.12968/bjon.2016.25.18.s35>

- Li, J., Chen, L., Wu, H., Lu, Y., Hu, Z., Lu, B. & Zhang, J. (2015). The mixture of salvianolic Acids from *Salvia miltiorrhiza* and total flavonoids from *Anemarrhena asphodeloides* attenuate sulfur mustard-induced injury. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24555-24573. <https://doi.org/10.3390/ijms161024555>
- Liberati, A., Altman, D. J., Tetzlaff, J., Mulrow, C., Gøtzsche, P. C., Ioannidis, J. P. A., Clarke, M. Devereaux, P. J., Kleijnen, J., Moher, D. (2009) The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*, 339:b2700 doi: <https://10.1136/bmj.b2700>
- Lopez, T., Schriener, S. E., Okoro, M., Lu, D., Chiang, B. T., Huey, J., & Jafari, M. (2014). Green tea polyphenols extend the lifespan of male *Drosophila melanogaster* while impairing reproductive fitness. *Journal of medicinal food*, 17(12), 1314-1321. doi: <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0190>
- Luo, Q., Li, Y., Huang, C., Cheng, D., Ma, W., Xia, Y. & Chen, Z. (2019). Soy isoflavones improve the spermatogenic defects in diet-induced obesity rats through Nrf2/HO-1 pathway. *Molecules*, 24(16), 2966. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24162966>
- Majid, M., Ijaz, F., Baig, M. W., Nasir, B., Khan, M. R., & Haq, I. U. (2019). Scientific validation of ethnomedicinal use of *Ipomoea batatas* L. Lam. as aphrodisiac and gonadoprotective agent against bisphenol A induced testicular toxicity in male Sprague Dawley rats. *BioMed research international*, 2019. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/8939854>
- Mahfuz, S., Shang, Q., & Piao, X. (2021). Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 1-18. doi: <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00565-3>
- Maimunah, S., Amila, A., & Nasution, Z. (2021). Pemberdayaan Masyarakat Melalui Optimalisasi Pemanfaatan Jelatang Pada Kelompok Tani Serdang. *Journal Kreativitas Pengabdian Kepada Masyarakat (PKM)*, 4(6), 1546-1553.
- Mani, J. S., Johnson, J. B., Hosking, H., Ashwath, N., Walsh, K. B., Neilsen, P. M. & Naiker, M. (2021). Antioxidative and therapeutic potential of selected Australian plants: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113580. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113580>
- Mi, Y. L., Zhang, C. Q., Zeng, W. D., Liu, J. X., & Liu, H. Y. (2007). The isoflavonoid daidzein attenuates the oxidative damage induced by polychlorinated biphenyls on cultured

chicken testicular cells. *Poultry science*, 86(9), 2008-2012. doi: <https://doi.org/10.1093/ps/86.9.2008>

- Mohamed, N. E. S., & Abd El-Moneim, A. E. (2017). Ginkgo biloba extract alleviates oxidative stress and some neurotransmitters changes induced by aluminum chloride in rats. *Nutrition*, 35, 93-99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.10.012>
- Mothibe, M. E., & Sibanda, M. (2019). African traditional medicine: South African perspective. *Traditional and Complementary Medicine*, 1-27.
- Mouro, V. G. S., de Melo, F. C. S. A., Martins, A. L. P., Gomes, M. D. L. M., de Oliveira, J. M., de Freitas, M. B. D., ... & da Matta, S. L. P. (2020). Euterpe oleracea (Martius) oil reverses testicular alterations caused after cadmium administration. *Biological trace element research*, 197(2), 555-570. doi: <https://doi.org/10.1007/s12011-019-02004-x>
- Noordin, M. A., Noor, M. M., & Aizat, W. M. (2020). The Impact of Plant Bioactive Compounds on Aging and Fertility of Diverse Organisms: A Review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 20(13), 1287-1299. doi: <https://doi.org/10.2174/1389557520666200429101942>
- Oczkowski, M., Rembiszewska, A., Dziendzikowska, K., Wolińska-Witort, E., Kołota, A., Malik, A., & Gromadzka-Ostrowska, J. (2019). Beer consumption negatively regulates hormonal reproductive status and reduces apoptosis in Leydig cells in peripubertal rats. *Alcohol*, 78, 21-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.01.009>
- Oczkowski, M., Średnicka-Tober, D., Stachoń, M., Kołota, A., Wolińska-Witort, E., Malik, A., & Gromadzka-Ostrowska, J. (2014). The effect of red wine consumption on hormonal reproductive parameters and total antioxidant status in young adult male rats. *Food & function*, 5(9), 2096-2105. doi: <https://doi.org/10.1039/c4fo00108g>
- Olukole, S. G., Ola-Davies, E. O., Lanipekun, D. O., & Oke, B. O. (2020). Chronic exposure of adult male Wistar rats to bisphenol A causes testicular oxidative stress: Role of gallic acid. *Endocrine Regulations*, 54(1), 14-21. doi: <https://doi.org/10.2478/enr-2020-0003>
- Omolaoye, T., & Du Plessis, S. S. (2018). Diabetes mellitus and male infertility. doi: <https://doi.org/10.3109/01485019008987617>
- Ourique, G. M., Finamor, I. A., Saccol, E. M., Riffel, A. P., Pês, T. S., Gutierrez, K., & Barreto, K. P. (2013). Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reproductive Toxicology*, 37, 31-39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.01.006>

- Padmanabhan, S., Tripathi, D. N., Vikram, A., Ramarao, P., & Jena, G. B. (2008). Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 655(1-2), 59-67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.01.006>
- Patil, S. A., Sujaya, M., & Patil, S. B. (2014). Aphrodisiac and phytochemical studies of *Cocculus hirsutus* extracts in albino rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3(1), 23-29. doi: [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60180-3](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60180-3)
- Pereira, M. G., & Galvão, T. F. (2014). Etapas de busca e seleção de artigos em revisões sistemáticas da literatura. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 23, 369-371. doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742014000200019>
- Rad, M. K., Ghani, A., & Ghani, E. (2021). In vitro effects of Capparis spinosa L. extract on human sperm function, DNA fragmentation, and oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 269, 113702. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2020.113702>
- Refat, M. S., Hamza, R. Z., Adam, A. M. A., Saad, H. A., Gobouri, A. A., Al-Salmi, F. A. & El-Megharbel, S. M. (2021). Potential therapeutic effects of new ruthenium (III) complex with quercetin: characterization, structure, gene regulation, and antitumor and anti-inflammatory studies (RuIII/Q novel complex is a potent immunoprotective agent). *Crystals*, 11(4), 367. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/cryst11040367>
- Roy, V. K., Chenkual, L., & Gurusubramanian, G. (2015). Protection of testis through antioxidant action of Mallotus roxburghianus in alloxan-induced diabetic rat model. *Journal of ethnopharmacology*, 176, 268-280. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.006>
- Salah-Abbès, J. B., Abbès, S., Abdel-Wahhab, M. A., & Oueslati, R. (2009). Raphanus sativus extract protects against zearalenone induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice. *Toxicol*, 53(5), 525-533. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.01.013>
- Saalu, L. C., Osinubi, A. A., Akinbami, A. A., Yama, O. E., Oyewopo, A. O., & Enaibe, B. U. (2011). *Moringa oleifera* Lamarck (drustick) leaf extract modulates the evidences of hydroxyurea-induced testicular derangement. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 4(2), 32 – 45.
- Saalu, L. C., Osinubi, A. A., Oguntola, J. A., Adeneye, I. O., & Benebo, A. S. (2010). The delayed testicular morphologic effects of doxorubicin and the rejuvenating role of

- grapefruit seed extract. *IJP-International Journal of Pharmacology*, 6(3), 192-199. doi: <https://dx.doi.org/10.3923/ijp.2010.192.199>
- Seif, M., Abd El-Aziz, T., Sayed, M., & Wang, Z. (2021). Zingiber officinale ethanolic extract attenuates oxidative stress, steroidogenic gene expression alterations, and testicular histopathology induced by sodium arsenite in male rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16), 19783-19798. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11509-1>
- Sengupta, P., Nwagha, U., Dutta, S., Krajewska-Kulak, E., & Izuka, E. (2017). Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015. *African health sciences*, 17(2), 418-427. doi: <https://doi.org/10.4314/ahs.v17i2.16>
- Sallmén, M., Sandler, D. P., Hoppin, J. A., Blair, A., & Baird, D. D. (2006). Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology*, 520-523. doi: <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000229953.76862.e5>
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S. doi: <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073s>
- Sengupta, P., Agarwal, A., Pogrebetskaya, M., Roychoudhury, S., Durairajanayagam, D., & Henkel, R. (2018). Role of *Withania somnifera* (Ashwagandha) in the management of male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 36(3), 311-326. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.11.007>
- Sobeh, M., Hassan, S. A., El Raey, M. A., Khalil, W. A., Hassan, M. A., & Wink, M. (2017). Polyphenolics from *Albizia harveyi* exhibit antioxidant activities and counteract oxidative damage and ultra-structural changes of cryopreserved bull semen. *Molecules*, 22(11), 1993. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22111993>
- Svechnikov, K., Spatafora, C., Svechnikova, I., Tringali, C., & Söder, O. (2009). Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 29(8), 673-680. doi: <https://doi.org/10.1002/jat.1456>
- Taitzoglou, I. A., Tsantarliotou, M., Zervos, I., Kouretas, D., & Kokolis, N. A. (2001). Inhibition of human and ovine acrosomal enzymes by tannic acid in vitro. *Reproduction-Cambridge*, 121(1), 131-137.
- Takehima, T., Usui, K., Mori, K., Asai, T., Yasuda, K., Kuroda, S., & Yumura, Y. (2021). Oxidative stress and male infertility. *Reproductive Medicine and Biology*, 20(1), 41-52. doi: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>

- Techer, D., Milla, S., Fontaine, P., Viot, S., & Thomas, M. (2017). Influence of waterborne gallic and pelargonic acid exposures on biochemical and reproductive parameters in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology*, 32(1), 227-240. doi: <https://doi.org/10.1002/tox.22228>
- Tokeshi, I., Yoshimoto, T., Muto, N., Nakamura, S., Ashizawa, K., Nakada, T., & Tatemoto, H. (2007). Antihyaluronidase action of ellagic acid effectively prevents polyspermy as a result of suppression of the acrosome reaction induced by sperm-zona interaction during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4), 755-764. doi: <https://doi.org/10.1262/jrd.18173>
- Tvrda, E., Tušimová, E., Kováčik, A., Paál, D., Greifova, H., Abdramanov, A., & Lukáč, N. (2016). Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, 172, 10-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.06.008>
- Wei, Y., Han, C., Li, S., Cui, Y., Bao, Y., & Shi, W. (2020). *Cuscuta chinensis* flavonoids down-regulate the DNA methylation of the H19/Igf2 imprinted control region and estrogen receptor alpha promoter of the testis in bisphenol A exposed mouse offspring. *Food & Function*, 11(1), 787-798. doi: <https://doi.org/10.1039/c9fo02770j>
- Werner, C., Cadoná, F. C., da Cruz, I. B. M., da Silveira Flôres, E. R., Machado, A. K., Fantinel, M. R., & Montano, M. A. E. (2017). A chemical compound based on methylxanthine–polyphenols lowers nitric oxide levels and increases post-thaw human sperm viability. *Zygote*, 25(6), 719-730. doi: <https://doi.org/10.1017/s0967199417000600>
- Yadav, N., Dogra, R. K. S., Khan, M. Y., & Khandelwal, S. (2005). Prevention of acute cadmium toxicity by Picroliv. *Human & Experimental Toxicology*, 24(10), 529-536. doi: <https://doi.org/10.1191/0960327105ht563oa>
- Yousaf, B., Liu, G., Wang, R., Qadir, A., Ali, M. U., Kanwal, Q., & Abbas, Z. (2016). Bisphenol A exposure and healing effects of *Adiantum capillus-veneris* L. plant extract (APE) in bisphenol A-induced reproductive toxicity in albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11645-11657. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6330-0>
- Zahra, Z., Khan, M. R., Majid, M., Maryam, S., & Sajid, M. (2020). Gonadoprotective ability of *Vincetoxicum arnottianum* extract against bisphenol A-induced testicular toxicity and hormonal imbalance in male Sprague Dawley rats. *Andrologia*, 52(6), e13590. doi: <https://doi.org/10.1111/and.13590>

- Zarepourfard, H., Riasi, A., Frouzanfar, M., Hajian, M., & Esfahani, M. H. N. (2019). Pomegranate seed in diet, affects sperm parameters of cloned goats following freezing-thawing. *Theriogenology*, *125*, 203-209. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.030>
- Zhu, Z., Li, R., Fan, X., Lv, Y., Zheng, Y., Hoque, S. A., & Zeng, W. (2019). Resveratrol improves Boar sperm quality via 5AMP-activated protein kinase activation during cryopreservation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2019*. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/5921503>

Figure captions

Figure 1: Flow diagram. Literature search results based on 'Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. <http://www.prisma-statement.org>. From: Liberati et al., (2009).

Figure 2: Distribution of publications about the phytochemicals phenolic compounds for male fertility protection worldwide.

Figure 3: Effects of phenolic compounds in spermatozoa post cryopreservation.

Figure 4: Risk of bias. The evaluation of the risk of bias was performed based on the following questions: 1. Has the allocation sequence been generated and applied properly? 2. Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis? 3. Has the allocation to different groups been adequately concealed? 4. Were the animals randomly housed during the experiment? 5. Were caregivers and/or investigators blinded to knowledge about which intervention each animal received during the experiment? 6. Were the animals randomly selected for evaluation of results? 7. Was the result blind to the evaluator? 8. Were incomplete results data handled properly? 9. Are study reports free from selective results reports? 10. Was the study free of other problems that could result in a high risk of bias? 11. Was the study submitted to the ethics committee? 12. Did the study perform statistical analyses? 13. Did the study make the process of obtaining the extract/phenolic compound clear? 14. Did the study carry out the phytochemical prospection of the extract? 15. Were the extract/phenolic compound dosages clear? 16. Did the study make it clear which parts of the plant were used? 17. Did the study demonstrate the frequency and duration of treatments? 18. Did the study make clear the type of solvent used?

Figure 5: Risk of bias summary showing the quality assessment of studies, at an individual level.

Table 1. The action of phenolic compounds in the treatment of diseases of the male reproductive tract

Reference	Pathology	Damage caused by pathology	Extract used	Dose administered	Principal effects of the compound
Afshari et al., 2019	Diabetes Mellitus	* Decreased testosterone levels in diabetic subjects *Increased MDA levels	Hydroalcoholic extract of <i>Eryngium caucasium</i> Trautv.	100, 200 and 300 mg/kg	*Increased serum testosterone levels in individuals diabetics, * Decreased MDA, decreased NO
Akomolafe et al., 2017	Erectile dysfunction	*Increased arginase activity *Increased AChE activity	Aqueous extract of <i>Tetracarpidium conophorum</i> (Müll.Arg.) Hutch. & Dalziel	0-200 µL/mg	*Increased penile and testicular endothelial cell function *Inhibition of AChE activity
Eleazu et al., 2021	Prostatic hyperplasia	*Increased prostate weight *Increased levels of pro-inflammatory cytokines *Increased lipid peroxidation and oxidative stress	Hydroalcoholic extract of <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott.	100,200 e 400 mg/kg	*Attenuation of prostatic inflammation * Decreased concentration of swelling-related prostate proteins *Normalization of prostatic histological parameters
Jahromi et al., 2017	Testicular torsion	*Increased severity of lesions in the testicular parenchyma * Increased MDA levels *Damage to spermatogenesis	Aqueous extract of <i>Phoenix acaulis</i> Roxb..	500 mg/kg	*Recovery from damage in spermatogenesis * Decreased plasma MDA level * Testicular protective effect *Inhibition of testicular oxidative stress
Luo et al., 2019	Obesity	* Decreased sperm motility *Increased sperm malformations * Decreased sperm concentration * Decreased antioxidant defenses	Isolated isoflavones	0, 50, 150 450 mg/kg	*Increased sperm motility *Increased sperm density * Decreased spermatogenic abnormalities *Increased expression of antioxidant enzymes

Ourique et al., 2013	Hyperthyroidism	<ul style="list-style-type: none"> * Decreased sperm motility *Increased lipid peroxidation * Significant decrease in antioxidant defenses 	Isolated resveratrol	1 e 10 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Protection of sperm motility *Increased GST activity
Rad et al., 2021	Oxidative stress	<ul style="list-style-type: none"> * Decreased sperm motility * Decreased sperm viability 	Hydroalcoholic extract of <i>Capparis spinosa var. aegyptia</i> (Lam.) Boiss.	15, 30 e 45 ppm	<ul style="list-style-type: none"> * Preservation of sperm motility *Increased sperm viability
Refat et al., 2021	Inflammation	<ul style="list-style-type: none"> *Increased pro-inflammatory cytokines *Increased oxidative stress * Decreased antioxidant enzymes 	Quercetin isolated	20mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Combats testicular oxidative stress * Decreased inflammatory cytokines *Increased antioxidant activity
Roy et al., 2015	Diabetes Mellitus	<ul style="list-style-type: none"> *Alteration in the histoarchitecture of the seminiferous tubules *Increased MDA levels *Reduced testosterone levels * Decreased levels of antioxidant enzymes *Increased MDA levels * Decreased levels of antioxidant enzymes 	Methanolic extract of <i>Mallotus roxburghianus</i> Müll.Arg	100 and 400 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * Decreased MDA levels *Increased testosterone level *Increased antioxidant enzymes *Improvement of the structure of the seminiferous tubules
Buncharoen et al., 2016	Prostatic hyperplasia	<ul style="list-style-type: none"> * Increased prostate weight *Increased expression of androgen receptors 	Ethanollic extract of <i>Uvaria rufa</i> Blume	10 and 20 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Reduction of benign prostatic hyperplasia *5α-reductase inhibition *Reduced expression of androgen receptors in prostate tissue

Table 2. The action of phenolic compounds in the treatment of diseases of the male reproductive tract.

Reference	Environmental pollutant	Extract/compound	Dose	Main effects of the compound
Abd El-Fattah et al., 2016	Di-ethylhexyl-phthalate	Resveratrol and Curcumin	80mg/kg (RSV), 200mg/kg (Curcumin)	*Testicular weight increase, normalization of GSH, MDA, LDH and serum testosterone levels; *Increased ALP, ACP activity
Akomolafe et al., 2015	Iron sulfate	Aqueous extract of <i>Tetracarpidium conophorum</i> (Müll.Arg.) Hutch. & Dalziel	(0-100)µL 1mL 100-400µL	*The extract was able to inhibit lipid peroxidation in the testes and epididymis by 50%.
Aksu et al., 2015	Lead acetate	<i>Punica granatum</i> L.	30 and 60 µL	*Increased amount of Zinc in the testes, *Attenuates the effects of lead contamination on the testes
Baklr et al., 2020	Dimethoate	Methanolic extract of <i>Laurocerasus officinalis</i> M.Roem	4mg/kg	* Improved oxidant/antioxidant balance, sperm DNA integrity, and seminal parameters and decreased testicular apoptosis
Ben Salah-Abbès et al., 2009	Zearalenone	Extract of <i>Raphanus raphanistrum</i> subsp. <i>sativus</i> (L.) Domin	15 mg/kg	*Increased testicular SOD and GPx, *Inhibition of lipid peroxidation * DNA repair
Dewanjee et al., 2015	Lead	Aqueous extract of <i>Ipomoea aquatica</i> Forssk.	100 mg/kg	* Decreased histological abnormalities in the testes caused by lead *Protection against oxidative stress through binding to metal ions
El-Demerdash et al., 2009	Sodium arsenite	Curcumin	15 mg/kg	* Decreased testicular oxidative stress induced by sodium arsenite
Grami et al., 2018	Bisphenol A	Aqueous extract of <i>Eruca sativa</i> var. <i>eriocarpa</i> (Boiss.) Post	15.6, 62.5, 250 and 1000 µg/mL	*Restoration of sperm viability and progressive motility *Deleterious effects at high doses
Hanchinalmath 2014	Carbon tetrachloride	<i>Feronia limonia</i> (L.) Swingle	100 and 400 mg/kg	*Increased levels of intracellular antioxidants * Decreased reactive oxygen species and free radicals
Kaur and Sadwa, 2020	Bisphenol A	Aqueous extract of <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	200mg/kg	*Improves testicular histoarchitecture * Reduced serum MDA *Increased antioxidant enzymes
Li et al., 2015	Sulfur mustard	Extracts of <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge and <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	30, 60 and 120 mg/kg	*Increased production of GSH *Acts in the regulation of signaling pathways such as cancer, antigen processing and presentation
Mi et al., 2010	4-nitro-3-phenyl-phenol	Quercetin	1 µg/mL	*Attenuation of oxidative stress * Decreased MDA production *Increased activity of antioxidant enzymes

Mi et al., 2007	Polychlorinated biphenyl	Daidzein	0.1-10 µg/mL	<ul style="list-style-type: none"> *Increase in the number of germ cells, *Increased GSH level * Inhibition of cytotoxicity
Mohamed and Abd El-Moneim, 2017	Aluminum chloride	Extract of <i>Ginkgo biloba</i> L.	200 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * Protection against peroxidation *SOD increase *Protective effect on testicles
Mouro et al., 2020	Cadmium chloride	<i>Euterpe oleracea</i> Mart. Oil	50,100 and 150 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> * Decreased damage to the seminiferous tubules *Increased testosterone levels *Recovery of the tubular architecture * Oxidizing activity
Olukole et al., 2020	Bisphenol A	Galic acid	20 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Improvement of antioxidant enzymes *Reduced MDA level *Maintenance of testicular architecture
Saalu et al., 2011	Hydroxyurea	Aqueous extract of <i>Moringa Olifera</i> Lamarck	50 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Conservation of testicular weight and volume *Improvement of testicular histomorphometric profile * MDA and ROS reduction *Protection from oxidative stress *Increased gene expression of steroidogenic enzymes *Increased levels of cholesterol, testosterone and LH *Increased sperm count and *Recovery of histological parameters
Seif et al., 2021	Sodium arsenite	Ethanollic extract of <i>Zingiber officinale</i> var. <i>cholmondeleyi</i> F.M.Bailey	100 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Restrict BPA-induced hormone reduction *Regulation of ERα and ERβ expression *Reduced DNA methylation
Wei et al., 2020	Bisphenol A	<i>Cuscuta chinensis</i> var. <i>applanata</i> (Engelm.) Costea & Stefanov. oil	20, 30 and 40 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *BPA-induced apoptosis inhibition
Wei et al., 2019	Bisphenol A	<i>Cuscuta chinensis</i> var. <i>applanata</i> (Engelm.) Costea & Stefanov. oil	20, 30 and 40 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *BPA-induced apoptosis inhibition
Yadav et al., 2005	Cadmium chloride	Picroliv	12 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Oxidative stress relief * Testicular protector
Yousaf et al., 2016	Bisphenol A	Extrato aquoso de <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	25 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Increased testosterone levels *Improvement of testicular histological parameters * Antioxidant effects
Zahra et al., 2020	Bisphenol A	Extrato metanólico de <i>Vincetoxicum arnottianum</i> (Wight) Wight	150 and 300 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> *Protection against reproductive toxicity *Attenuation of ROS production *Prevention of lipid peroxidation *Maintenance of normal histological features * Protection of spermatogenesis * Decreased DNA damage

Table 3. Effects of phenolic phytochemical compounds against injuries caused by environmental pollutants.

Reference	Drug	Drug damage	Extract/compound	Dose	Main effects of the compound
Al-Ezzy et al., 2019	Methotrexate	*Increased sperm head abnormalities	Extract of <i>Achillea millefolium</i> L.	100mg/kg and 200 mg/kg	* Decreased spermatozoa head abnormalities at moderate dose *Increased abnormalities in the sperm head at high doses
Boroja et al., 2018	Cisplatin	* Decreased testosterone levels *Increased apoptosis in testicular tissue *Testicular histoarchitecture modification	Methanolic extract of <i>Clinopodium hortense</i> (L.) Kuntze.	50, 100 and 200 mg/kg,	*Increased testosterone levels * Decreased apoptosis in testicular tissue *Attenuation of the histological changes caused by cisplatin
El-Newary et al., 2021	Streptomycin	*Increased gonadal weight * Decreased activity of antioxidant enzymes	Ethanollic extract of <i>Launaea nudicaulis</i> (L.) Hook.f	250mg/kg	*Normalization of gonadal weight in diabetic subjects *Activation of serum antioxidant enzymes * Restoration of spermatogenic cells *Improvement of testicular histological parameters
El-Wassimy et al., 2014	Dexamethasone	*Germ cells with a pychnotic nucleus and vacuolization of the cytoplasm *Obliteration of the lumen of the seminiferous tubules *Increased sperm abnormalities * Degeneration of Leydig cells	Methanolic extract of <i>Moringa oleifera</i> Lam. Lam.	400 mg/kg	*Improved testicular germ cell morphology *Aid in testicular antioxidant defense *Inhibition of lipid peroxidation and DNA damage * Decreased sperm abnormalities *androgenic effect

Fahmy et al., 2020	Cisplatin	*Reduction in the number of sperm in the lumen of the seminiferous tubules	Methanolic extract of <i>Ficus carica</i> Linn	200, 400 and 600 mg/kg	* Dose-dependent increase in the number of sperm in the seminiferous tubules
Ganjalikhan Hakemi et al., 2019	Busulfan	*Reduced sperm viability * Decreased number of primary spermatocytes and Leydig cells	<i>Olea europaea</i> subsp. <i>africana</i> (Mill.) P.S.Green. oil	250,500 and 750 mg/kg	*Anti-apoptotic, antioxidant activity, increased fertility and spermatogenesis, increased number of Leydig cells and primary spermatocytes
Saalu et al., 2010	Doxorubicin	* Decreased testicular weight and volume *Induction of oxidative stress	Alcoholic extract of <i>Citrus paradisi</i> Macfad	10 mg/kg	*Improvement of testicular histomorphometric parameters *Overcoming oxidative stress

Table 4. The action of phenolic phytochemical compounds on testicular parenchyma cells

Reference	Extract/compound	Dose	Main effects	Target cell/organ
A, G., et al., 2018	Isolated resveratrol	10 and 50 μ M	* Inhibition of immature Sertoli cell proliferation * FSH hormone suppression in immature Sertoli cells	Sertoli cell
Allai et al., 2016	Acetonic extract of <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	0%,2%,4% and 8%	*Increases total and progressive motility, sperm viability * Decreases abnormal sperm and DNA fragmentation	Spermatozoa
Baghshahi et al., 2014	Extract of <i>Syzygium aromaticum</i> L.	0, 35, 75, and 115 μ g/mg	*Increased sperm viability, *Deleterious effects at high dosages	Spermatozoa
Chikhouné et al., 2015	<i>Thymus munbyanus</i> Boiss. & Reut. oil	100,250,500.750 and 1000 μ g/mL	* Decreased sperm motility * Spermicidal potential	Spermatozoa
Daghigh Kia et al., 2016	Óleo de <i>Origanum vulgare</i> var. <i>albidum</i> Bellynck	2, 4, 8, 12, 16 and 20 mL/dL	*Increased CAT and SOD activity *Increased intracellular defenses and cell membrane components * Decreased histological abnormalities in the testes caused by lead *Protection against oxidative stress through binding to metal ions	Spermatozoa
Ďuračka et al., 2019	Ethanollic extract of <i>Origanum vulgare</i> var. <i>albidum</i> Bellynck	37.5, 75, 150 and 300 μ g/mL	*High concentrations decreased sperm motility, mitochondrial viability, inhibitory effect on sperm viability *Irreversible damage to the structure and function of male gametes	Spermatozoa
Fallas-López et al., 2021	<i>Triticum aestivum</i> L. subsp. <i>aestivum</i> sprouts	300g	*Improve sperm viability and morphology *Improvement of seminal pH	Spermatozoa

Hamady et al., 2016	Methanolic extract of <i>Nigella sativa</i> L.	0.3 and 1 g/kg	*Increased expression of alpha and beta subunits of testicular inhibins **Structure-dependent effect on sperm motility	Spermatozoa
Kumar et al., 1989	Benzoic acid, o-coumaric acid, coumarin, quercetin	10 ⁻⁴ M	*Phenolic compounds are able to decrease sperm motility *Coumarins and flavonoids are less active in inhibiting sperm motility	Spermatozoa
Lopez et al., 2014	Extract of <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	0, 5, 10, 20 and 40 mg/mL	*Increased lifespan * Protection against iron toxicity * Decreased male fertility	Spermatozoa
Majid et al., 2019	Ethyl acetate and methanolic extract of <i>Ipomea batatas</i> L. Lam	150 and 300 mg/kg	*Increased sexual potency, penile erections, *Increased sperm production and viability * Maintenance of testicular histology *Body weight increase	Germ epithelium and spermatozoa
Oczkowski et al., 2019	Wine	5ml/kg	*In low or moderate doses it maintains the structure of the seminiferous tubules	Germ epithelium and Leydig cells
Oczkowski et al., 2014	Beer	4,6,8 and 10%	*Increased serum LH *Increased serum testosterone *Damage to hormone regulation * Decreased serum estradiol	Leydig cell
Patil et al., 2014	Chloroform and alcoholic extract of <i>Capparis spinosa</i> var. <i>aegyptia</i> (Lam.) Boiss.	25mg/100g	*Stimulation of testicular activity *Increased spermatogenesis *Increased weight of accessory organs *Increased testosterone	Germ epithelium and spermatozoa
Rad et al., 2021	Hydroalcoholic extract of <i>Capparis spinosa</i> var. <i>aegyptia</i> (Lam.) Boiss.	15,30 and 45 ppm	* Preservation of sperm motility *Increased sperm viability	Spermatozoa
Sobeh et al., 2017	Methanolic extract of <i>Albizia harveyi</i> E.Fourn.	0.5, 1 and 1.5 µg/mL	*Increased progressive motility, viability and integrity of sperm plasma membrane * Decreased abnormality and apoptosis	Spermatozoa
Svechnikov et al., 2009	Resveratrol	0.1-25 µM	* **Suppression of steroidogenesis by Leydig cells	Leydig cells

Taitzoglou et al., 2001	Tanic acid	0, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 µmol	*Inhibition of cytochrome P450Ac17 * Estrogenic effects * Inhibition of acrosomal enzymes, which may lead to male infertility *Inhibition of plasminogen activity activator * Decreased sperm motility	Spermatozoa
Tvrđá et al., 2016	Galic acid	0.05, 0.5 and 5 mg/L	*Increased activity of antioxidant enzymes *Increased sperm viability	Spermatozoa
Werner et al., 2017	Hydroalcoholic extract of <i>Paullinia cupana</i> Kunth	0.1, 1, 5 and 10mg/mL	* Decreased oxidative stress * Cryoprotectant *Increased sperm parameters	Spermatozoa
Zarepourfard et al., 2019	Dietary supplementation with seeds of <i>Punica granatum</i> L.	0, 30 and 60%	*Increased sperm quality *Increased sperm viability, membrane integrity and motility	Spermatozoa
Zhu et al., 2019	Resveratrol	0, 20 ,50, 75 , 100 and 125µM	*Reduced lipid peroxidation *Increased motility, viability and integrity of plasma membrane and acrosome membrane after freezing	Spermatozoa
Joseph and Binitha, 2020	Elagitanins	-	Possible antiandrogenic effect	
Techer et al., 2016	Galic acid	0.05, 0.5 and 5 mg/L	*Increased activity of antioxidant enzymes	Spermatozoa

FIGURES

Figure 1. Flow diagram.

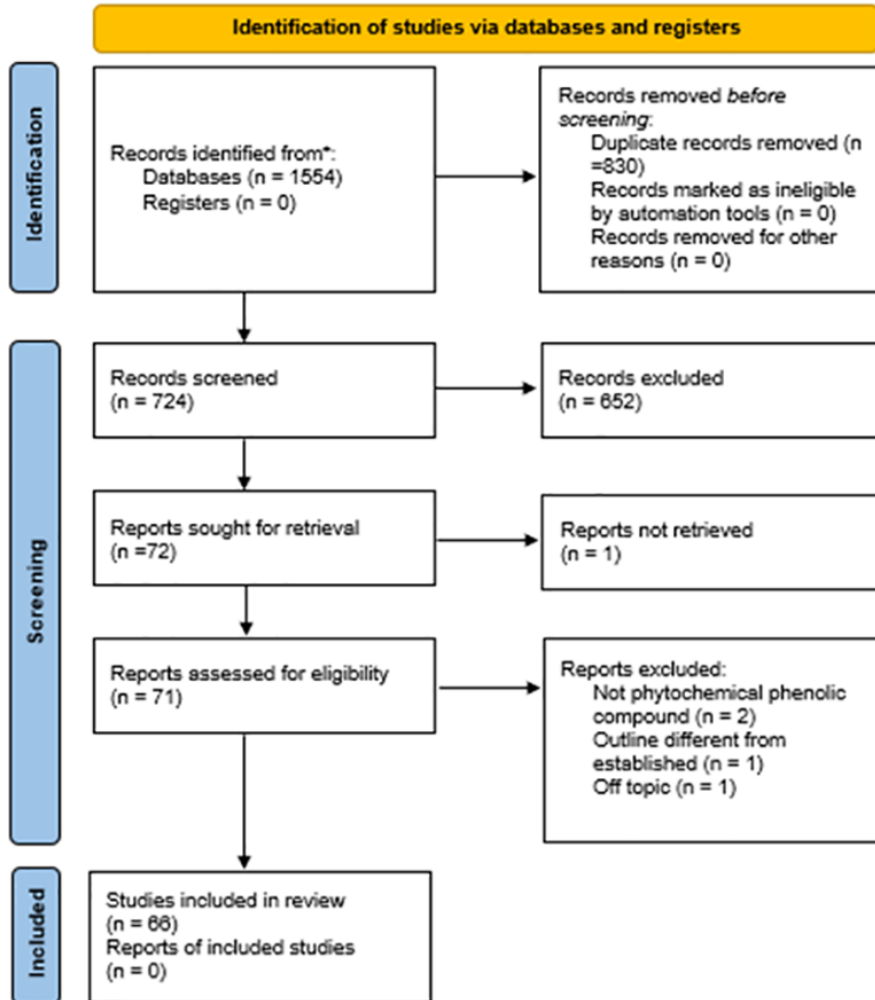


Figure 2. Distribution of publications about the of phytochemicals phenolic compounds for male fertility protection worldwide.

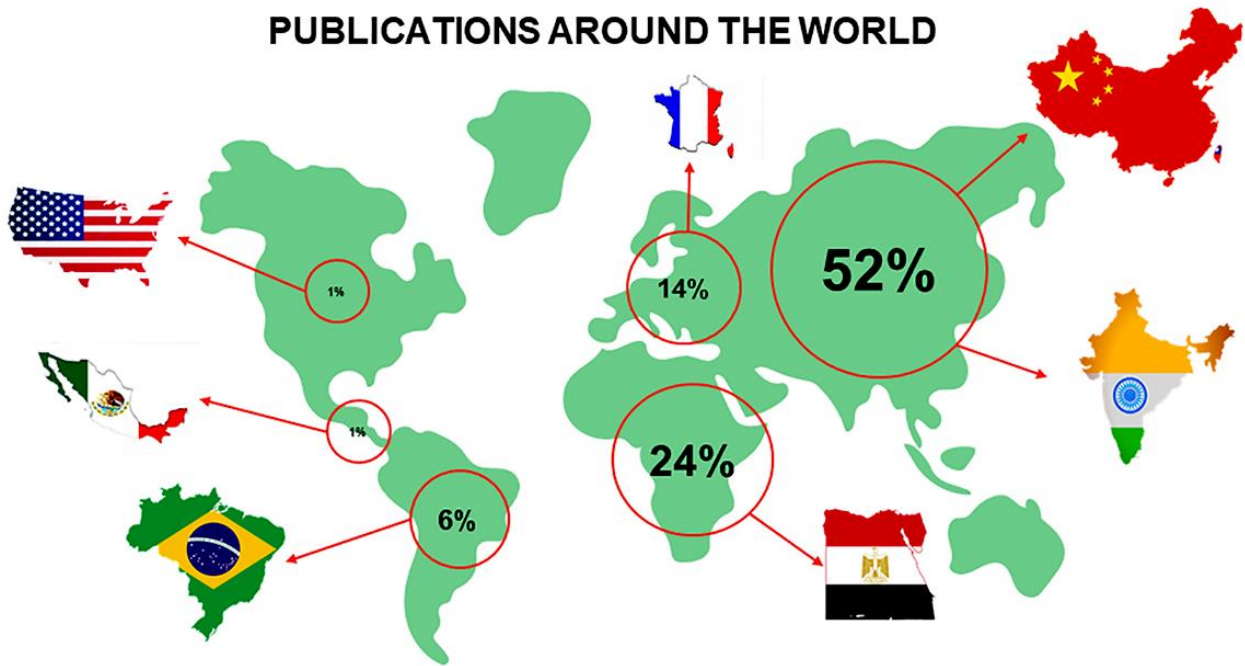


Figure 3. Effects of phenolic compounds in spermatozoa post cryopreservation.

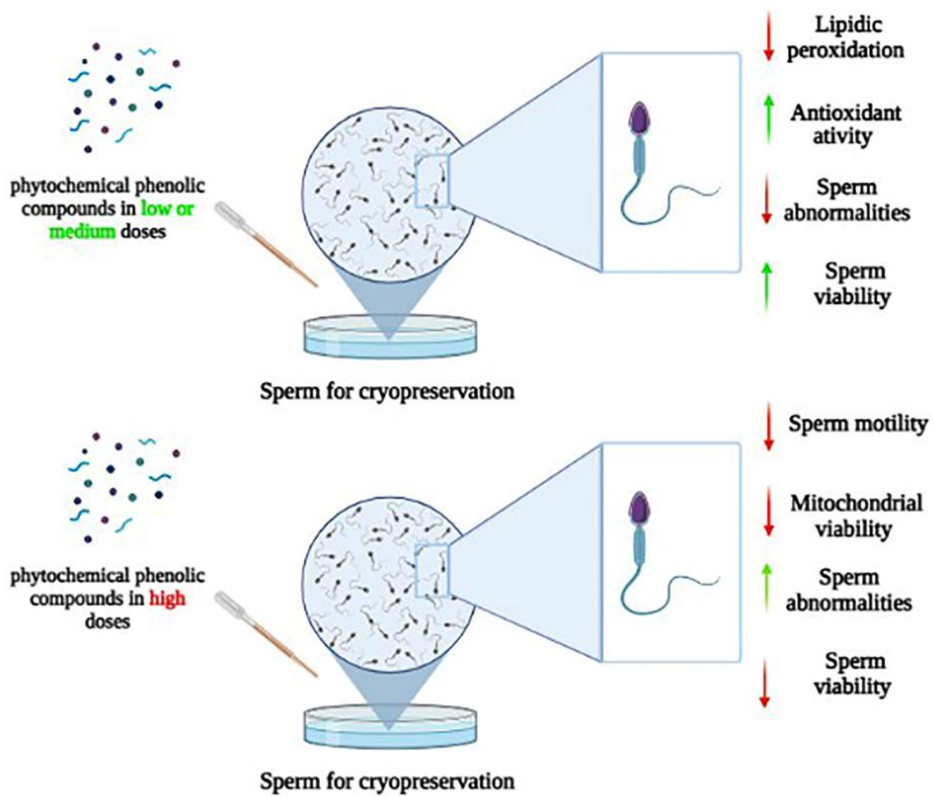


Figure 4. Risk of bias

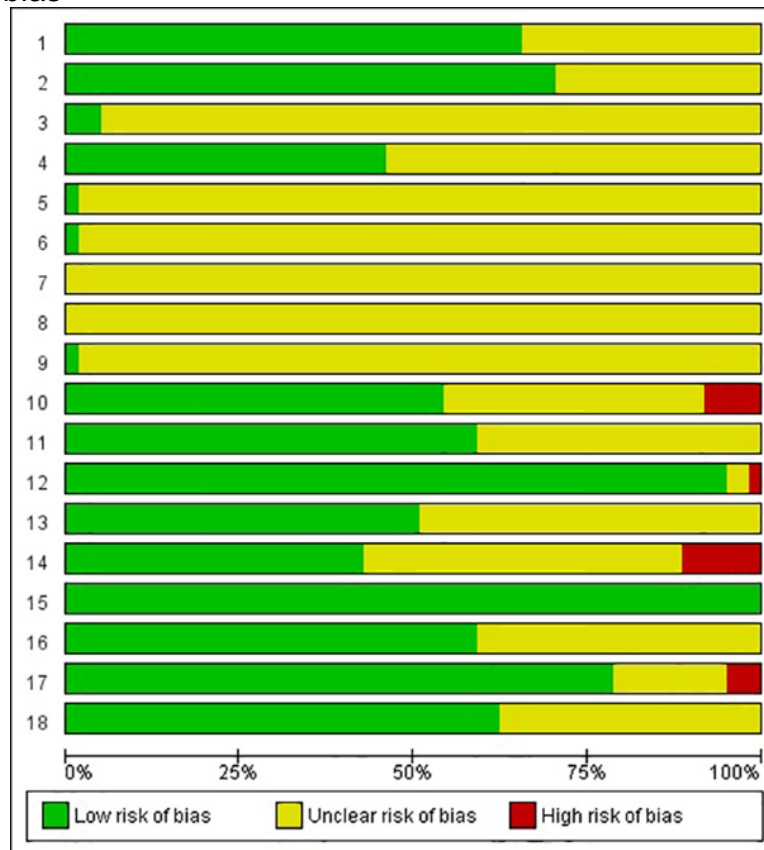


Figure 5. Risk of bias summary showing the quality assessment of studies, at an individual level

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Abd El-Fallah, A. A., et al., 2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Afshar, M., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Akomolafe, S., et al., 2017	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Akomolafe, S. F., et al., 2015	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Al-Ezzy, R. M., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Allal, L., et al., 2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Baghshahi, H., et al., 2014	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Bakir, E., et al., 2020	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ben Salah-Abbès, J., et al., 2009	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Beneja, T., et al., 2018	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Bunchareon, W., et al., 2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Chikhoane, A., et al., 2015	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Daghigkha, H., et al., 2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Dewanjo, S., et al., 2015	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Đuračka, M., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
El-Dammerdash, F. M., et al., 2009	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Eleazu, K., et al., 2021	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
El-Newany, S. A., et al., 2021	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
El-Wassimy, M. T., et al., 2014	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fallas-López M., et al., 2021	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ganjilikhani Hakemi, S., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Grami, D., et al., 2010	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Hamady, J. J., et al., 2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Hanchinalmath, J. V., 2014	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Jahromi, A. R., et al., 2017	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Joseph, R. and R. N. Binliths, 2020	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Kaur, S. and S. Sadwal, 2020	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Kamar, P., et al., 1989	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Kumar, T., et al., 2011	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Li, J. Z., et al., 2015	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Luo, Q., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Majid, M., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mi, Y., et al., 2010	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mohamed, N. E. and A. E. Abd El-Moneim, 2017	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mouro, V. O. G., et al., 2020	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Nima, S. N., et al., 2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Oczkowski, M., et al., 2014	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Oczkowski, M., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Olukole, S. O., et al., 2020	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ourioue, G. M., et al., 2013	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Pall, S. A., et al., 2014	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Rad, M. K., et al., 2021	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Refai, M. S., et al., 2021	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Roy, V. K., et al., 2015	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Saalu, L. C., et al., 2010	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Saalu, L. C., et al., 2011	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Saif, M., et al., 2021	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Soheib, M., et al., 2017	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Svechnikov, K., et al., 2009	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Taitzoglou, I. A., et al., 2001	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Techer, D., et al., 2017	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tokeshi, I., et al., 2007	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Turdá, E., et al., 2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Wei, Y., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Wei, Y., et al., 2020	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Warner, C., et al., 2017	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Yadav, N., et al., 2005	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Yousaf, B., et al., 2016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Zahro, Z., et al., 2020	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Zarepourard, H., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Zhu, Z., et al., 2019	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

Journal of Ethnopharmacology

Effects of phenolic phytochemicals in the treatment of male infertility

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Review Article
Keywords:	Phenolic compounds. Male infertility. Phytotherapy. Oxidative Stress. Antioxidants; Reproduction
Corresponding Author:	Marcos L M Gomes UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro Uberaba, Minas Gerais BRAZIL
First Author:	João Vitor Lopes-Ferreira
Order of Authors:	João Vitor Lopes-Ferreira Júlia Eduarda Mesquita Matos Fernanda Carolina Ribeiro Dias Marcos L M Gomes
Abstract:	<p>Ethnopharmacological relevance</p> <p>The oxidative stress occurs when the damages caused by high concentrations of reactive oxygen species (ROS), overpass the protective effects of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). Such imbalance has deleterious action in many systems and organic processes, mainly in male reproductive system, since oxidative stress leads to damage on deoxyribonucleic acid (DNA) and cellular proteins and lipids. Such events can culminate in destruction of blood-testis-barrier (BTB), which in turn impairs spermatogenesis, leading a decrease in sperm count and, motility. In addition, steroidogenesis impairment takes place, leading to a lower production of androgens, which can interfere with male fertility.</p> <p>Aim of the study</p> <p>To identify the main phenolic phytochemical compounds and their respective effects when used for the treatment of male infertility.</p> <p>Methods</p> <p>Related information concerning phenolic phytochemical compounds was gathered from studies were selected from PubMed, Scopus, and Web of Science databases according to the PRISMA statement. The search was conducted using the combinations of six terms: "phenolic compounds", "male infertility", "testis", "spermatozoa", "testosterone" and "male fertility"</p> <p>Results</p> <p>A total of 1554 articles were found, 830 duplicate documents were excluded, from these, 652 records were excluded in the first selection phase and 3 studies in the second selection phase, leaving 66 articles that met all the eligibility criteria, which were analyzed in this revision. Asia was the region with the most studies with phenolic phytochemical compounds, followed by the Africa. Pre-clinical studies showed that rats were the most used animal models and the oral route the most used to test the herbal compounds. The phytochemical phenolic compounds were effective in reverse the damage in testis provoked by environmental pollutants, drugs, pathologies and sperm cryopreservation. On other hand, high doses of phenolic compounds can cause deleterious effects in sperm.</p> <p>Conclusions</p>

	Phenolic compounds have antagonistic actions to male fertility, depending on the administered dose, and can be used as potential male contraceptives.
Suggested Reviewers:	Juliana C. Monteiro-Pirovani UFES: Universidade Federal do Espírito Santo julianacmonteiro@gmail.com
	Heidi Dolder UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas heid@unicamp.br

ANEXO III

Avaliação da atividade antioxidante do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis*) sobre a morfofisiologia da célula de Leydig após o estresse oxidativo causado pelo cádmio

RESUMO

O cádmio foi escolhido agente oxidante, pois os testículos são órgãos que sofrem com sua bioacumulação, afetando a produção de testosterona pelas células de Leydig. Logo, foram utilizados o óleo e polpa de *Euterpe edulis* como agentes antioxidantes, a fim de mitigar os efeitos do cádmio sobre as células de Leydig. Para tanto, foram utilizados 60 camundongos da linhagem BALB/c, separados em 10 grupos com 6 animais: grupo controle: tratado com 0.7ml de água destilada; grupo controle cádmio: tratado com 4.28mg/kg de CdCl₂ dose única; grupo controle óleo: tratado com 150mg/kg de óleo durante 42 dias; grupo controle polpa: tratado com 300mg/kg da polpa desengordurada tamponada com ácido cítrico; grupos tratados com 4.28mg/kg de CdCl₂ e 50, 100 e 150mg/kg de óleo; grupos tratados com 4.28mg/kg de CdCl₂ e 100, 200 e 300 mg/kg de polpa. O material biológico foi incluído em glicolmetacrilato. A partir dos cortes semifinos dos testículos analisados sob microscopia de luz, foram obtidos: proporção intersticial e tubular, diâmetro e volume nuclear da célula de Leydig, proporção nuclear e citoplasmática, volume citoplasmático da célula de Leydig, volume da célula de Leydig por grama de testículo e por testículo, número de células de Leydig por grama de testículo e por testículo. Os resultados sugerem diminuição dos efeitos do cádmio sobre o núcleo da célula de Leydig no tratamento com óleo, no entanto as alterações nos grupos tratados com polpa sugerem estresse redutor.

Palavras-chave: Infertilidade masculina. Metais pesados. Fitoterapia. Estresse oxidativo. Célula de Leydig.

1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes observaram um vertiginoso declínio da fertilidade masculina nas últimas décadas (AGARWAL *et al*, 2015), assim como, o aumento da incidência de doenças do trato reprodutivo masculino como câncer testicular e anomalias congênitas (criptorquidia e hipospadia) (MATHUR, 2008). Esse cenário pode estar associado, em parte, com o intenso processo de industrialização em grandes centros urbanos, que por sua vez, resultam no lançamento de metais pesados no meio ambiente, o que leva a poluição do ar, água e solo, que caso em contato com seres humanos e outros animais, acabam por inviabilizar diversos processos celulares nos indivíduos contaminados (AGARWAL *et al*, 2015).

Segundo Rand e Petrolezzi (1985), metais pesados como o cádmio (Cd), são capazes de gerar o estresse oxidativo, o qual ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH⁻), ultrapassam a capacidade antioxidante endógena que é realizada por enzimas como a glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Tal desequilíbrio provoca danos ao sistema reprodutor masculino como o adelgaçamento das paredes dos túbulos seminíferos, diminuição no número de células espermatogênicas como as espermatídes e espermatogônias, e de células somáticas como as células de Sertoli e de Leydig (REN *et al.*, 2019) (LIU *et al.*, 2009). A célula de Leydig é responsável pela síntese dos andrógenos responsáveis por produzir e manter as características sexuais masculinas secundárias e estimular o processo de espermatogênese. Esse tipo celular é vulnerável as ações deletérias provocadas pelo cádmio.

Nesse sentido, antioxidantes exógenos como a vitamina E e compostos fenólicos como flavonoides e taninos podem auxiliar no reestabelecimento das defesas antioxidantes endógenas através de mecanismos como: ligação a íons metálicos, proteção da membrana plasmática das células contra a peroxidação lipídica, estimulação da atividade de enzimas antioxidantes endógenas, eliminação de EROs, além da modulação da resposta inflamatória (MANI, *et al.* 2021). O fruto da palmeira Juçara, *Euterpe edulis*, pertencente à família das *Aracaceae* e remanescente do território da Mata Atlântica brasileira, pode ser considerado uma importante fonte substâncias antioxidantes como a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-6-rutinosídeo que são moléculas de natureza hidrofílica e que fazem parte de um subgrupo de flavonoides denominados antocianinas (CARDOSO, *et al.* 2015).

O extrato de *E. edulis*, já se mostrou capaz de atenuar a dislipidemia por determinação genética e esteatose em camundongos *knockout* para a Apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) (CARDOSO *et.al*, 2015), mostrando também potencial antioxidante tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* (Freitas *et al.*, 2016). Nestes, a polpa liofilizada não desengordurada e desengordurada e o óleo de *E. edulis* foi utilizada em quadro de esteatose hepática induzida por dieta hipercalórica, neutralizando metabólitos reativos, com consequente modulação do status oxidativo. No presente estudo pretendemos avaliar a atividade do óleo e da polpa de *E. edulis* sob a morfofisiologia na célula de Leydig, após o estresse oxidativo causado pela contaminação com cádmio, além de suas implicações sob a fertilidade masculina e rota esteroidogênica

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL

2.1.1. Coleta dos frutos

Os frutos do *E. edulis* foram obtidos no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), Minas Gerais, Brasil. A colheita e pós-colheita dos frutos foram realizadas conforme orientações da Embrapa para o açaí da Amazônia, *E. oleraceae* (EMBRAPA, 2005). Um coletor escalou a palmeira *E. edulis* e cortou o cacho de frutos na sua base, tendo cuidado para não desprender muitos frutos do cacho. Após o corte, o cacho de frutos foi depositado ao solo sobre uma lona ou um plástico para que não tivesse contato direto com o solo, evitando a contaminação dos frutos. Após a colheita, houve a seleção manual, com a remoção de produtos indesejáveis. Os frutos foram debulhados diretamente em caixas de plástico e os frutos verdes e em estado fitossanitário precário ou com qualquer outro defeito, que os tornassem inadequados ao processamento, foram descartados. O material foi protegido da luz solar e acondicionado em caixas de plástico com aberturas laterais, para facilitar a aeração, uma vez que essas caixas são resistentes e de fácil higienização, o que aumenta a proteção dos frutos contra danos mecânicos.

2.1.2. Produção da polpa

Os frutos foram despulpados no prazo máximo de 24 horas após a colheita, devido a sua alta perecibilidade. Durante o processo de despulpa, os frutos passaram pelas

seguintes fases de beneficiamento, conforme orientações da (EMBRAPA, 2005): (1) pré-lavagem: na qual os frutos foram imersos em água para a retirada de impurezas seguido pelo (2) amolecimento: no qual foi feita a imersão dos frutos em água a 40-60°C, tendo por finalidade facilitar o despulpamento por amolecimento do epicarpo e mesocarpo dos frutos, após esse procedimento foi realizada a (3) lavagem com água clorada: na qual os frutos são lavados em uma solução com cloro ativo, por cerca de 20 a 40 minutos, seguida pela (4) retirada do excesso do cloro, que consiste na retirada do cloro por meio de lavagem por aspersão com água potável e por fim o (5) despulpamento, realizado com o uso de despulpadeira, consiste na operação de remoção da polpa do fruto.

2.1.3. Preparo do extrato

A polpa dos frutos de *E. edulis* foi liofilizada e acondicionada em sacos de polietileno com revestimento de folha de alumínio para impedir a passagem da luz e armazenados à temperatura ambiente até o início do tratamento. A polpa liofilizada foi utilizada na obtenção do óleo de açaí. Para isso, foi realizada a extração com éter de petróleo no Soxhlet por 12 horas, após esse período o solvente foi removido pelo rota-evaporador, produzindo ao final o óleo de açaí. A polpa remanescente chamada de polpa desengordurada, após a remoção do óleo, sofrerá evaporação completa do éter de petróleo para posteriormente ser administrada aos animais via gavagem. Para isso, a polpa desengordurada foi ressuspensa em água e tamponada com ácido cítrico e ofertada aos animais via gavagem.

2.2. Desenho experimental

Foram utilizados camundongos BALB/c machos em idade reprodutiva (50 dias). Os tratamentos foram fornecidos por gavagem, a cada 24h no mesmo horário do dia. Cada animal recebeu 0.7mL de solução, por 41 dias. Os animais foram acondicionados em gaiolas contendo 3 ou 4 indivíduos cada, em sala climatizada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), com livre acesso à água e ração comercial peletizada. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da UFV (protocolo nº58/2016).

Os grupos experimentais foram divididos como descrito abaixo (n=6, por grupo):

- Controle (CTL): 0.7 ml de água destilada
- Tratado com cádmio (CD): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única
- Tratado com óleo de açaí (OA): 150 mg/kg de óleo de *E. edulis* durante 42 dias

- Tratado com polpa desengordurada de açaí (PoAa): 300 mg/kg da polpa desengordurada tamponada com ácido cítrico
- Tratado com cádmio+óleo (O50): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 50 mg/kg de óleo de açaí
- Tratado com cádmio+óleo (O100): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 100 mg/kg de óleo de açaí
- Tratado com cádmio+óleo (O150): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 150 mg/kg de óleo de açaí
- Tratado com cádmio+polpa (P100): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 100 mg/kg da polpa desengordurada tamponada ácido cítrico
- Tratado com cádmio+polpa (P200): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 200 mg/kg da polpa desengordurada tamponada ácido cítrico
- Tratado com cádmio+polpa (P300): 4.28 mg/kg de cloreto de cádmio dose única + 300 mg/kg da polpa desengordurada tamponada ácido cítrico

2.3. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Os animais foram eutanasiados após anestesia intramuscular, aplicada no quadríceps femoral esquerdo com mistura de xilazina e ketamina (10 e 100 mg/kg, respectivamente), considerando o peso de cada indivíduo. O testículo esquerdo foi retirado e fixado em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2.5% + paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1mol/L, pH 7.4) por 24h. O testículo direito foi fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,2, por 24h e será utilizado a posteriori para análise imunohistoquímica.

2.4. MICROSCOPIA DE LUZ

O material biológico fixado em Karnovsky foi pesado e lavado em tampão fosfato de sódio 0.1mol/L, pH 7,2 (3 lavagens de 10 minutos cada). Posteriormente, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol e incluído rotineiramente em resina glicolmetacrilato Leica (Historesin). Os cortes semifinos (1µm) foram obtidos para microscopia de luz em micrótomo rotativo automático (Leica RM 2055, Germany), sendo montados em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina/borato de sódio 1% para análise morfológica e morfométrica testicular.

As imagens digitais do parênquima testicular foram capturadas utilizando-se o sistema de câmera Zeiss® AxioCam ICc5, integrado ao microscópio óptico Zeiss® AxioLab E, em objetivas de 20X, 40X e 100X. Com o Software Image Pro Plus foram determinados a proporção tubular e intersticial, proporção nuclear e citoplasmática das células de Leydig assim como o diâmetro nuclear dessas células.

2.5 PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA DA CÉLULA DE LEYDIG NO INTERSTÍCIO

Para a obtenção da proporção volumétrica (%) das células de Leydig foram contados 1000 pontos projetados sobre imagens digitais tiradas da região do interstício, nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal. Cada ponto é referente à interseção de linhas de um grid projetado sobre as imagens digitais. Foram registrados os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig (NC e CL). O percentual foi obtido multiplicando-se por 100 o número de pontos contados sobre estas células, dividindo-se o valor obtido por 1000.

2.6 MORFOMETRIA DE CÉLULAS DE LEYDIG

O diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi obtido a partir de imagens digitais feitas em objetiva 100x, no material fixado em glutaraldeído. Trinta núcleos de células de Leydig foram mensurados para cada animal, sendo medidos aqueles que apresentaram o contorno mais circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nucleares ($VN = \frac{4}{3} \pi r^3$, onde r = raio nuclear) e citoplasmático ($VC = \% \text{ citoplasma} \times VN / \% \text{ núcleo}$) e, em seguida, o volume de uma célula de Leydig (somando-se o VN ao volume citoplasmático). Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3).

O cálculo do volume que as células de Leydig ocupam por testículo foi feito a partir da proporção das células de Leydig no parênquima testicular multiplicada pelo peso do parênquima de um testículo/100. O peso do parênquima testicular foi obtido subtraindo-se a massa ocupada pela albugínea do peso total dos testículos, obtendo-se assim o peso líquido do órgão.

O volume que as células de Leydig ocupam por grama de testículo foi obtido utilizando-se o peso bruto dos testículos. O número total de células de Leydig por testículo foi calculado a partir do volume que as células de Leydig ocupam por testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3). Para calcular o número total de células de Leydig por grama

de testículo foi utilizada a fórmula: volume que a célula de Leydig ocupa por grama de testículo (μm^3)/volume de uma célula de Leydig (μm^3).

A fim de se quantificar o investimento em células de Leydig, em relação à massa corporal, foi calculado o índice Leydigossomático (ILS), utilizando-se a fórmula: $\text{ILS (\%)} = \frac{\text{volume total de célula de Leydig no parênquima testicular}}{\text{PC}} \times 100$, onde PC= peso corporal.

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados através do teste de Shapiro-Wilk para avaliação quanto a normalidade dos dados. Para os dados com distribuição gaussiana foi utilizada one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Para dados que não apresentaram distribuição não gaussiana foi usado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância adotado para o presente estudo será de 5%. Por fim, foram realizadas correlações para determinar o poder de previsão de uma variável sobre a outra, sendo utilizado o teste de Pearson para os dados paramétricos e o teste de Spearman para os dados não-paramétricos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Medidas biométricas

Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas no ganho de peso corporal e ao peso final entre os grupos experimentais de ambos tratamentos. No entanto, o índice gonadossomático (IGS) apresentou decréscimo significativo somente no grupo tratado com 4.28 mg/kg de cádmio + 50 mg/kg de óleo de *E. edulis* em relação ao grupo CD (Tabela 1 e 2). Deste modo, inferimos que os tratamentos não afetaram de forma tóxica e sistêmica o organismo dos animais tratados, conforme observado por Mouro *et. al* (2020), que realizaram o tratamento de animais contaminados por cádmio com concentrações crescentes de óleo *Euterpe oleracea*, espécie que possui perfil de flavonoides e ácidos fenólicos similar ao perfil da *E. edulis* (BORGES *et al.*, 2011).

3.2 Morfometria e histopatologia dos túbulos seminíferos

Podemos verificar alterações no processo espermatogênico através da observação de parâmetros da morfologia testicular como altura do epitélio germinativo, diâmetro e área

dos túbulos seminíferos (RUSSEL et al.,1993). Todavia esses parâmetros permaneceram inalterados após a administração do óleo de *E. edulis* (Tabela 3), sendo que o espaço intersticial, sobretudo as células de Leydig, foram os principais alvos de modificações em ambos os tratamentos. No entanto, entre os grupos experimentais tratados com a polpa de *E. edulis*, o grupo PoAa apresentou aumento do diâmetro tubular do túbulo seminífero em relação ao grupo P300, acompanhado pelo aumento do raio do lúmen e área do lúmen (Tabela 4). Foi possível observar ainda que área do lúmen do túbulo seminífero do grupo controle cádmio estava estatisticamente maior que a dos grupos PoAa, P100 e P200 (Tabela 4).

O aumento luminal acompanhado pela redução da proporção de túbulos seminíferos normais observados nos grupos CD e PoAa, indicam um possível dano ao por etiologias diferentes, o cádmio pode gerar danos ao parênquima testicular através do estresse oxidativo de forma direta, induzindo o acréscimo da área luminal (Mouro *et al.* 2020). Paradoxalmente, o tratamento com a polpa pode ter se tornado prejudicial ao tecido, a medida que moléculas antioxidantes podem se tornar agentes pró-oxidantes, a depender da dose administrada.

O trabalho conduzido por Seon e Lee (2002), que objetivou observar a ação do ácido ascórbico sobre as funções secretoras e microsossomais hepáticas no decorrer da isquemia e reperfusão hepática, verificou que altas doses do composto foram capazes de induzir a peroxidação lipídica, de forma semelhante, flavonoides como a quercetina, kaempferol são capazes de produzir efeitos como: danos ao DNA e peroxidação lipídica gerando o denominado estresse redutor na presença de metais de transição como o cádmio (RAHAL et al, 2014).

3.3 Morfometria e estereologia das células de Leydig

Houve aumento significativo do diâmetro do núcleo das células de Leydig dos grupos O50 e O100 em relação ao grupo CTL e aumento do diâmetro e volume do nuclear dos progressivo dos grupos P100, P200 e P300 em relação ao grupo PoAa, não acompanhados com o aumento do número de células de Leydig por testículo. Tais achados são congruentes a um cenário de hipertrofia das células de Leydig, que pode estar relacionado com o aumento da produção de testosterona. Essa hipótese torna-se plausível dado que doses baixas ou médias de cádmio, geram mecanismos compensatórios como a

superexpressão de LHR (REN et al., 2019), que podem aumentar a produção de testosterona somado aos efeitos pró-androgênicos das antocianinas, presentes no extrato hidroalcolico de *E.edulis*, o que gera o aumento volumétrico da célula de Leydig (MOURO et al., 2020).

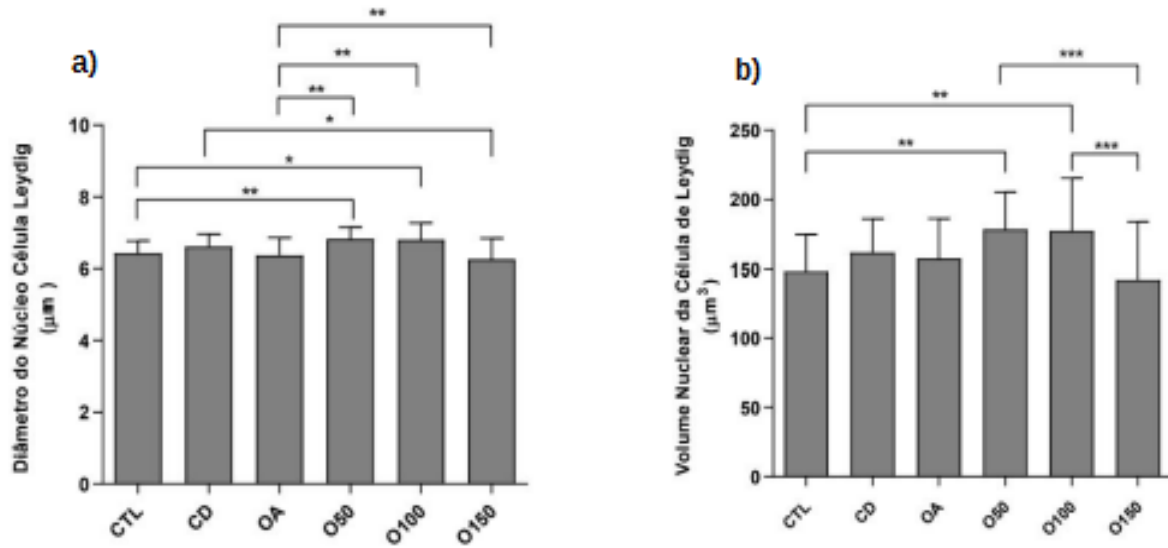
Os efeitos menos expressivos sobre as células de Leydig observados nos grupos tratados com óleo de *E. edulis*, podem estar relacionados à menor quantidade de antocianinas e atividade antioxidante desse extrato quando comparado com a polpa desengordurada conforme verificado por Freitas et al. (2016). Esse comportamento ocorre devido à natureza lipofóbica das antocianinas que as tornam mais miscíveis em meio hidrofílico.

CONCLUSÃO

As análises morfométricas não foram suficientes para esclarecer quais mecanismos envolvem a ação do óleo e da polpa desengordurada de *E.edulis* sobre o parênquima testicular, sobretudo nas células de Leydig. Nesse sentido análises com marcadores celulares envolvidos na rota esteroidogênicas como, CYP, StAR e 3 β -HSD, auxiliariam na elucidação das alterações fisiológicas sofridas pelas células esteroidogênicas após a administração dos tratamentos propostos. Logo, são necessárias análises complementares para compreensão sobre a eficácia e uso seguro dos tratamentos com óleo e polpa de *E.edulis*.

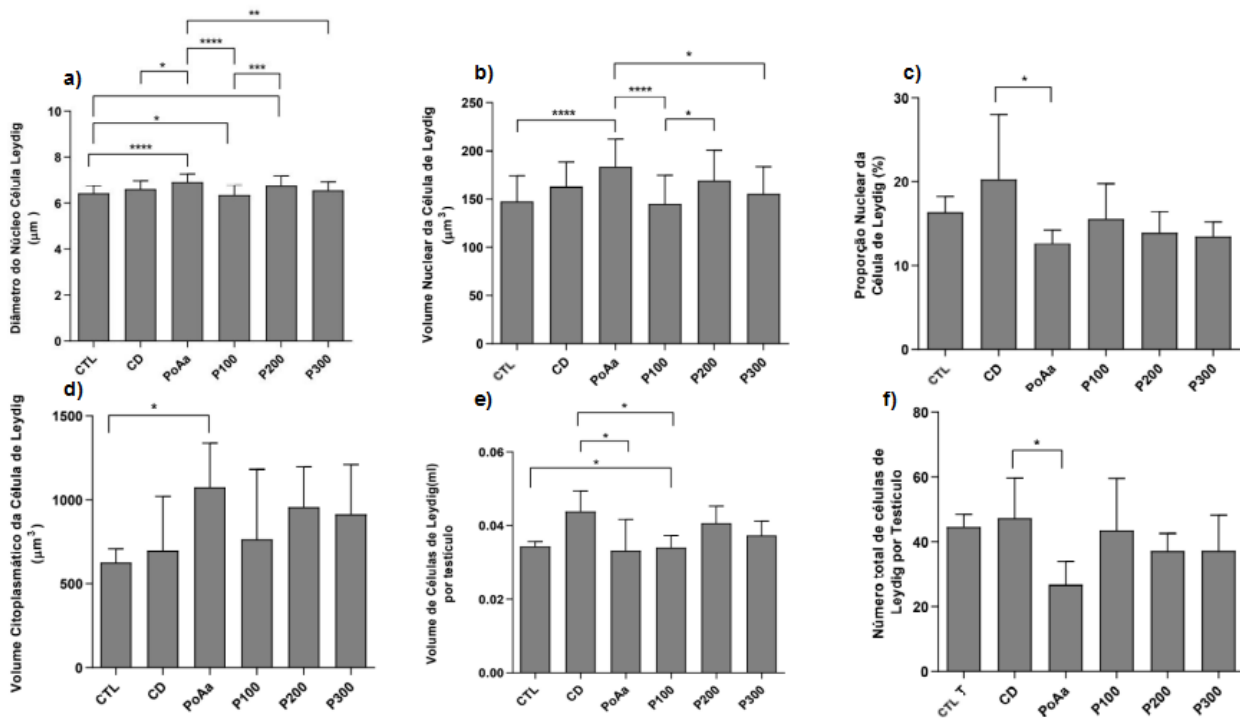
FIGURAS

Figura 1. Diâmetro e volume nuclear da células de Leydig dos grupos tratados com óleo de *E.edulis*



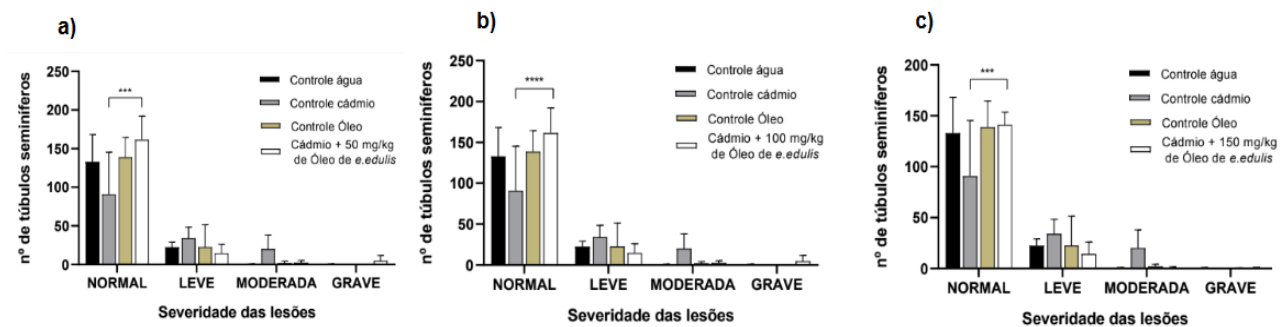
CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); O: 100, 200 e 300 = 4.28mg/kg de CdCl₂ + 50, 100 e 150 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores foram expressos em média $SD \pm$ onde as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por: $p < 0.05^*$, $p < 0.02^{**}$, $p < 0.01^{***}$ (one-WAY ANOVA).

Figura 2. Diâmetro e volume nuclear da células de Leydig dos grupos tratados com polpa de *E. edulis*



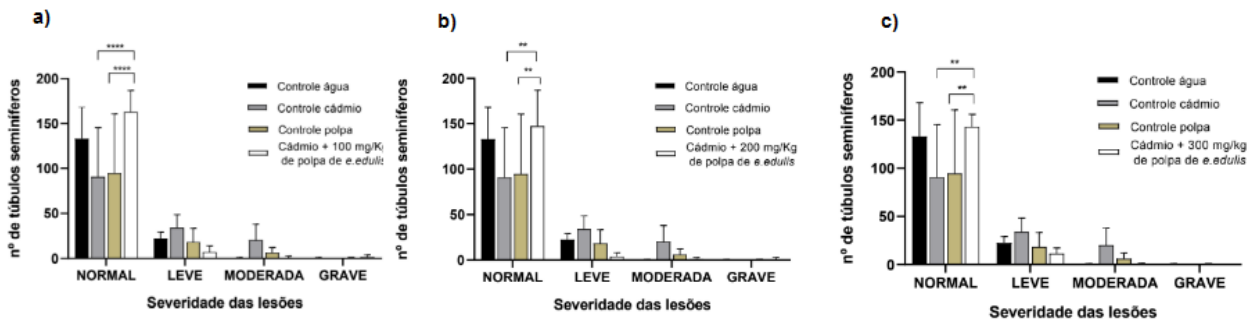
CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); P: 100, 200 e 300 = 4.28mg/kg de CdCl₂ + 100, 200 e 300 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores foram expressos em média SD± onde as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por: p<0.05*, p<0.02**, p<0.01***, (one-WAY ANOVA).

Figura 3. Histopatologia dos túbulos seminíferos dos animais tratados com óleo de *E. edulis*



Os valores foram expressos em média SD± onde as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por: p<0.01***, p<0.001****(two-WAY ANOVA).

Figura 4. Histopatologia dos túbulos seminíferos dos animais tratados com polpa de *E.edulis*



Os valores foram expressos em média $SD \pm$ onde as diferenças estatisticamente significativas foram expressas por: $p < 0.05^*$, $p < 0.02^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$ (two-WAY ANOVA).

TABELAS

Tabela 1 – Dados biométricos dos camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl₂) e tratados com óleo de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	OA	O50	O100	O150
Peso corporal (g)	38.84±1.53	42.09±1.4	37.37±2.49	40.74±2.74	37.23±2.28	37.29±1.87
Peso do testículo (g)						
Ganho de peso	2.89± 0.81	2.52±0.51	4.91±1.32	3.02±1.23	2.64±0.48	2.59±0.66
IGS (%)	0.503±0.03	0.586±0.02	0.505±0.01	0.448±0.01 ^a	0.495±0.02	0.5±0.02

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); OA= Controle – óleo (150mg/kg de óleo de *E. edulis*); O 50, 100 e 150 = 4.28mg/kg de CdCl₂ + 50, 100 e 150 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média ± SD.

Tabela 2 – Dados biométricos dos camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl₂) e tratados com polpa de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	PoAa	P100	P200	P300
Peso corporal (g)	38.84±1.528	42.09±1.403	38.09±1.38	38.93±2.245	39.753±1.876	38.018±1.159
Peso do testículo (g)						
Ganho de peso	2.888± 0.809	2.52±0.513	4.294±2.554	1.952±1.23	1.53±1.201	3.695± 1.554
IGS (%)	0.503±0.03	0.586±0.02	0.480±0.03	0.493±0.03	0.542±0.04	0.527±0.01

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); P: 100, 200 e 300 = 4.28mg/kg de CdCl₂ + 100, 200 e 300 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média ± SD.

Tabela 3 – Parâmetros morfométricos dos túbulos seminíferos de camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratado com óleo de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	OA	O50	O100	O150
Diâmetro do túbulo seminífero (μm)	214 \pm 1.9	218.1 \pm 2.42	216.6 \pm 2.87	208.5 \pm 1.9	213.9 \pm 3.17	218.2 \pm 3.28
Altura do epitélio seminífero (μm)	78.11 \pm 0.91	75.81 \pm 1.74	77.19 \pm 1.27	75.46 \pm 1.75	81.5 \pm 1.02	77.59 \pm 1.76
Área do túbulo seminífero (μm^2)	36337 \pm 645.7	37632 \pm 900	37125 \pm 1001	34500 \pm 655	36658 \pm 1169	37731 \pm 1178
Área do epitélio do seminífero (μm^2)	3400 \pm 588.5	30058 \pm 2286	31572 \pm 707	34088 \pm 94	31572 \pm 709	34235 \pm 948.5
Relação Epitélio-Túbulo	0.919 \pm 0.003	0.898 \pm 0.008	0.91 \pm 0.009	0.914 \pm 0.009	0.933 \pm 0.005	0.909 \pm 0.01

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

C = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl_2); OA = Controle – óleo (150mg/kg de óleo de *E. edulis*); O: 50, 100, 150 = 4.28mg/kg de CdCl_2 + 50, 100 e 150mg/kg de óleo de *E. edulis*. Os valores aqui foram expressos em média \pm SD (one-WAY ANOVA).

Tabela 4 – Parâmetros morfométricos dos túbulos seminíferos de camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl_2) e tratado com polpa de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	PoAa	P100	P200	P300
Raio do lúmen (μm)	28.89 \pm 2.325	33.22 \pm 4.430	24 \pm 10.01	28.45 \pm 4.35	26.93 \pm 7.69	31.23 \pm 3.909 ^c
Área do lúmen (μm^2)	2937 \pm 386.9	3906 \pm 1002	2093 \pm 1514	2597 \pm 787 ^b	2445 \pm 1104 ^b	3107 \pm 776.6
Área do túbulo seminífero (μm^2)	36337 \pm 645.7	37632 \pm 900	32636 \pm 5846	34406 \pm 3218	34172 \pm 4982	38537 \pm 3397
Relação Epitélio-Túbulo	0.919 \pm 0.003	0.898 \pm 0.008	0.9359 \pm 0.05	0.9243 \pm 0.22	0.9308 \pm 0.02	0.9202 \pm 0.0155

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl_2); OA= Controle – óleo (150mg/kg de óleo de *E. edulis*); O:50, 100 e 150 = 4.28 mg/kg de CdCl_2 + 50, 100 e 150 mg/kg de óleo respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média \pm SD e as diferenças entre os tratamentos ($p \leq 0.05$) são sinalizadas por “a” quando em relação ao controle cádmio na mesma linha e “b” em relação ao controle óleo na mesma linha, “c” quando em relação ao controle-água na mesma linha.

Tabela 5 – Estereologia e morfometria das células de Leydig de camundongos expostos ao cloreto de cádmio (CdCl₂) e tratados com óleo de *E. edulis*

GRUPOS	CTL	CD	OA	O50	O100	O150
Diâmetro nuclear (µm)	6.43±0.06	6.61±0.06	6.37±0.09	6.83±0.0 ^{b,c}	6.81±0.08 ^{b,c}	6.26±0.11 ^a
Vol. nuclear (µm ³)	147.5± 4.85	163.2±4.6	157.0±5.21	177.2±4.97 ^c	179.5±7.14 ^c	142.4±7.54
Vol. citoplasmático (µm ³)	626.3±33.34	697.9±144.5	646.9±112.2	632.3±129.5	673±110.1	702.7±110.3
Proporção nuclear (%)	16.36±0.767	20.27±3.464	15.03±1.27	16.36±1.58	19.40±1.50	15.63±1.67
Proporção citoplasmática (%)	69.7±2.047	72,86±2.231	74.02±2.33	75.77±1.56	70±4.59	71.086±4.33
Vol. da célula (µm ³)	773.9±40.75	866.7±160.1	803.9±124.3	1108±134.5	852.4±123.2	861.5±118.7
Vol. ocupado pela célula/testículo (mL)	0.0343±0.0006	0.0438±0.002	0.0341±0.002	0.0342±0.002	0.0340±0.003	0.0316±0.0006
Vol. de célula de Leydig/g de testículo (mL)	0.1773±0.004	0.1832±0.009	0.1833±0.005	0.1890±0.004	0.1857±0.008	0.174±0.0116
Nº total de células de Leydig/testículo	44.56±1.62	47.29±6.2	39.59±6.91	34.51±6.37	44.73±6.73	39.59±5.79
Nº de células de Leydig/g de testículo (x10 ⁶)	231.6±9.69	195.3±37.59	209.5±31.48	178.0±21.07	246.8±28.49	202.7±20.13
ILS (%)	0.082±0.002	0.102±0.006	0.083±0.005	0.08±0.005	0.08±0.006	0.078±0.003

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); OA= Controle – óleo (150mg/kg de óleo de *E. edulis*); O:50, 100 e 150 = 4.28 mg/kg de CdCl₂ + 50, 100 e 150 mg/kg de óleo respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média ± SD e as diferenças entre os tratamentos (p≤0.05) são sinalizadas por “a” quando em relação ao controle cádmio na mesma linha e “b” em relação ao controle óleo na mesma linha, “c” quando em relação ao controle-água na mesma linha.

Tabela 6– Estereologia e morfometria das células de Leydig.

GRUPOS	CTL	CD	PoAa	P100	P200	P300
Diâmetro nuclear (μm)	6.43 \pm 0.06	6.61 \pm 0.06	6.91 \pm 0.06 ^c	6.35 \pm 0.08 ^b	6.76 \pm 0.07 ^{abc}	6.55 \pm 0.06 ^b
Vol. nuclear (μm^3)	147.5 \pm 4.85	163.2 \pm 4.60	183.5 \pm 5.23	144.9 \pm 5.42 ^b	179.5 \pm 7.14 ^{ab}	169.3 \pm 5.72 ^b
Vol. citoplasmático (μm^3)	626.3 \pm 33.34 ^b	697.9 \pm 144.5	1075 \pm 107.2	766 \pm 170.3	956.9 \pm 97.91	914.4 \pm 120,9
Proporção nuclear (%)	16.36 \pm 0.767 ^{bc}	20.27 \pm 3.464	12.70 \pm 0.625	15.57 \pm 1.72	13.9 \pm 1.047	13.46 \pm 0.711
Proporção citoplasmática (%)	69.70 \pm 2.047	72.86 \pm 2.231	73.85 \pm 1.95	74.69 \pm 1.973	79.22 \pm 1.616	76.61 \pm 1.53
Vol. da célula (μm^3)	773.9 \pm 40.75 ^b	866.7 \pm 160.1	1259 \pm 120.6	909.2 \pm 182	1120 \pm 101.03	1070 \pm 1304
Vol. ocupado pela célula/testículo (mL)	0.034 \pm 0.001	0.044 \pm 0.002	0.033 \pm 0.001	0.034 \pm 0.002	0.041 \pm 0.001	0.037 \pm 0.001
Vol. de célula de Leydig/g de testículo (mL)	0.177 \pm 0.004	0.1832 \pm 0.009	0.1785 \pm 0.004	0.186 \pm 0.003	0.192 \pm 0.003	0.186 \pm 0.002
Nº total de células de Leydig/testículo	44.56 \pm 1.62 ^b	47.29 \pm 6.20	26.84 \pm 2.88	43.50 \pm 6.55	37.14 \pm 2.23	37.23 \pm 4.48
Nº de células de Leydig/g de testículo ($\times 10^6$)	231.6 \pm 9.69 ^b	195.3 \pm 37.59	146.5 \pm 10.20	236.9 \pm 21.07	178.2 \pm 15.40	183.5 \pm 16.69
ILS (%)	0.09 \pm 0.004	0.11 \pm 0.007	0.086 \pm 0.007	0.092 \pm 0.007	0.104 \pm 0.009	0.009 \pm 0.003

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

CTL = Controle – água; CD = Controle – cádmio (4.28mg/kg CdCl₂); P100, P200 e P300 = 4.28mg/kg de CdCl₂ + 100, 200 e 300 mg/kg de polpa respectivamente. Os valores aqui foram expressos em média \pm SD e as diferenças entre os tratamentos ($p \leq 0.05$) são sinalizadas por “a” quando em relação ao controle cádmio na mesma linha e “b” em relação ao controle polpa na mesma linha, “c” quando em relação ao controle-água na mesma linha.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Ashok et al. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2015.
- AKINLOYE, Oluyemi *et al.* Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reprod Biol*, v. 6, n. 1, p. 17-30, 2006.
- CARDOSO, Luciana Marques et al. Chemical composition, characterization of anthocyanins and antioxidant potential of *Euterpe edulis* fruits: applicability on genetic dyslipidemia and hepatic steatosis in mice. *Nutrición Hospitalaria*, v. 32, n. 2, p. 702-709, 2015.
- DE ANGELIS, Cristina *et al.* The environment and male reproduction: the effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. *Reproductive Toxicology*, v. 73, p. 105-127, 2017.
- FREITAS, Rodrigo Barros et al. *Euterpe edulis* extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, 2016.
- JEVTIĆ, Predrag; LEVY, Daniel L. Mechanisms of nuclear size regulation in model systems and cancer. *Cancer Biology and the Nuclear Envelope*, p. 537-569, 2014.
- LAZO, John S. et al. Enhanced Sensitivity to Oxidative Stress in Cultured Embryonic Cells from Transgenic Mice Deficient in Metallothionein I and II Genes (*). *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 10, p. 5506-5510, 1995.
- LIU, J., *et al.* 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238:209-214.
- MAINES, Mahin D. Characterization of heme oxygenase activity in Leydig and sertoli cells of the rat testes: differential distribution of activity and response to cadmium. *Biochemical pharmacology*, v. 33, n. 9, p. 1493-1502, 1984.
- MATHUR, P. P.; SARADHA, B.; VAITHINATHAN, S. Impact of environmental toxicants on testicular function. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)*, v. 8, n. 1, p. 79-90, 2008.
- MANI, Janice S. et al. Antioxidative and therapeutic potential of selected Australian plants: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 268, 2021.
- MOURO, Viviane Gorete Silveira *et al.* Cadmium-induced testicular toxicity in mice: subacute and subchronic route-dependent effects. *Biological trace element research*, v. 193, n. 2, p. 466-482, 2020.
- MOURO, Viviane Gorete Silveira et al. *Euterpe oleracea* (Martius) oil reverses testicular alterations caused after cadmium administration. *Biological trace element research*, v. 197, n. 2, p. 555-570, 2020.

- RAHAL, Anu et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.
- RAJASEKARAN, Namakkal Soorappan *et al.* Sustained activation of nuclear erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling promotes reductive stress in the human mutant protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Antioxidants & redox signaling*, v. 14, n. 6, p. 957-971, 2011.
- REN, Yaping et al. Mechanism of cadmium poisoning on testicular injury in mice. *Oncology letters*, v. 18, n. 2, p. 1035-1042, 2019.
- ROSS, M.H., *et al.* 2008. *Histology: A text and atlas*. 4Ed. 682-724.
- WONG, E.W., *et al.* 2010. Cell junctions in the testis as targets for toxicants. In: HOYER, P.B., RICHBURG, J.H. (Eds.). *Reproductive and Endocrine Toxicology*, Academic Press/Elsevier, Oxford, pp 167-188.
- XIAO, Wusheng; LOSCALZO, Joseph. Metabolic responses to reductive stress. *Antioxidants & redox signaling*, v. 32, n. 18, p. 1330-1347, 2020.
- ZHANG, Chengcheng Christine et al. Metallothionein is elevated in liver and duodenum of Atp7b (-/-) mice. *BioMetals*, v. 31, n. 4, p. 617-625, 2018.