

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**MIRTILO (*Vaccinium ashei* Reade) MELHORA O DANO
OVARIANO INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO SUB-CRÔNICA
AO CÁDMIO EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aryele Pinto Izaguirry

Uruguaiiana, RS, Brasil.

2013

ARYELE PINTO IZAGUIRRY

**MIRTILO (*Vaccinium ashei* Reade) MELHORA O DANO OVARIANO INDUZIDO
PELA EXPOSIÇÃO SUB-CRÔNICA AO CÁDMIO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Francielli Weber Santos
Cibin

Uruguaiiana

2013

**MIRTILO (*Vaccinium ashei* Reade) MELHORA O DANO OVARIANO
INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO SUB-CRÔNICA AO CÁDMIO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação Stricto sensu em Bioquímica
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica

Área de concentração: Bioprospecção
Molecular

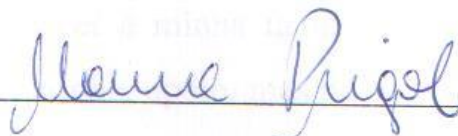
Dissertação defendida e aprovada em: 03 de Agosto de 2013
Banca examinadora:



Profª. Drª. Francieli Weber Santos Cibin
Orientadora
(UNIPAMPA)



Profª. Drª Lucielli Savegnago
(UFPel)



Prof. Drª Marina Prigol
(UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora, Francielli, por todos estes anos de dedicação, compreensão e ensinamentos. Obrigada pelos puxões de orelha, pelas pressionadinhas (no meu caso quase sempre necessário algo do tipo: “- Ary não deixa pra última hora!!!”), pelo incentivo, pelo carinho, pela amizade, por ensinar tudo o que sei hoje, mas principalmente por ser mais que uma orientadora, por ser o nosso maior exemplo... Muito Obrigada!

Agradeço à família Biotech, Ísis, Leandra, Maiquel, Suzi pela convivência, pelo trabalho, pelas risadas e brincadeiras. Em especial à Laura e a Melina que estiveram comigo desde o início, com todas as dificuldades encontradas durante a faculdade e o pouco tempo livre para o laboratório, porém tudo isto nos uniu, fortaleceu e nos ensinou a trabalhar em grupo, assim em equipe conseguimos dar conta! Muito obrigada meninas por tudo!

Ao Cristiano, que muito me ajudou todo esse tempo, compartilhando de curiosidades, dúvidas, padronizações de técnicas e sempre sendo o refúgio quando algum problema surgia, pois sempre tinha alguma solução ou uma alternativa, muito obrigada!

Aos meus queridos Mariane e Matheus, muito obrigada pela convivência agradável, pela constante ajuda e auxílio, pelas boas risadas e brincadeiras e a Simone pela companhia, amizade, exemplo e especialmente pela contribuição para a qualidade do trabalho.

Ao meu amor, Flávio, por entender os meus momentos de ausência, sempre me apoiar e cuidar, com amor, carinho, amizade e paciência.

Gostaria de agradecer à minha família, meus pais, Jone e Luiza, pelo amor, cuidado, ensinamentos, carinho, apoio, mas por principalmente sempre estarem do meu lado, acreditando em mim, mesmo quando eu não acreditava, me incentivando e nunca deixando desistir... Vocês foram essenciais! Aos meus irmãos Crhistian, Fabrício, Leonardo e Luzardo, e ao Vovô, José Pedro, por sempre me dar suporte, apoio e carinho, muito obrigada!

Ao final desta jornada, gostaria de agradecer à todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e à UNIPAMPA por proporcionarem essa oportunidade.

Muito Obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Fundação Universidade Federal do Pampa

MIRTILO (*Vaccinium ashei Reade*) MELHORA O DANO OVARIANO INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO SUB-CRÔNICA AO CÁDMIO EM CAMUNDONGOS

AUTOR: Aryele Pinto Izaguirry

ORIENTADORA: Francielli Weber Santos Cibin

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 03 de Agosto de 2013

O cádmio é um dos poluentes mais tóxicos, amplamente distribuído no meio ambiente. A exposição humana não-ocupacional ao cádmio resulta predominantemente da fumaça do cigarro, da poluição do ar e do consumo de alimentos e água contaminados por cádmio. Este metal apresenta uma baixa taxa de excreção no organismo e um elevado tempo de meia-vida biológico e por esta razão, o cádmio se acumula no sangue, rins e fígado, bem como nos órgãos reprodutivos, incluindo placenta, testículos e ovários. A exposição ao cádmio está fortemente associada com toxicidade reprodutiva em animais e humanos, culminando em infertilidade e câncer nos tecidos reprodutivos. A patogênese do dano ovariano e a redução da viabilidade folicular após exposição ao cádmio tem sido associada a danos oxidativos. Assim, compostos antioxidantes poderiam ser uma terapia alternativa frente a toxicidade do cádmio. Estudos tem sugerido que a ingestão de frutas e vegetais com propriedades antioxidantes podem ajudar na prevenção de várias doenças. A fruta mirtilo (*Vaccinium ashei Reade*) é uma das fontes mais ricas de antioxidantes fitoquímicos, entre frutas e legumes. Sendo assim, verificou-se o potencial antioxidante do extrato de mirtilo *in vitro*, o qual demonstrou atividade *scavenger* de espécies de reativas (ER) e radical DPPH. Este extrato apresentou elevado conteúdo de polifenóis (558,27 µg EAG/mL). Posteriormente, avaliou-se o efeito do extrato hidro-alcoólico de mirtilo sobre o dano ovariano induzido por exposição sub-crônica de camundongas ao cádmio. Os animais receberam CdCl₂ (2,5 mg/Kg) por via subcutânea e extrato de mirtilo (2,5mg/Kg) por via oral por 3 semanas (5 dias por semana). Os animais foram eutanasiados 24 horas após a última administração, e os ovários foram removidos para determinar atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx), glutatona-S-transferase (GST), δ-aminolevulinato-desidratase δ-(ALA-D), 17 β-hidroxiesteróide desidrogenase (17β-HSD), determinação dos níveis de espécies reativas, quantificação de cádmio e avaliação da viabilidade folicular. Os resultados demonstraram que os animais que receberam cádmio apresentaram um aumento de 2 vezes nos níveis de espécies reativas, redução na atividade das enzimas δ-ALA-D e 17β-HSD (30 e 39% de redução, respectivamente) e uma redução de 69% da viabilidade folicular em comparação ao grupo controle. Nenhuma alteração foi observada na atividade das enzimas GPx e GST ovarianas. A terapia foi eficaz em restaurar os níveis de ER, a atividade da δ-ALA-D e melhorou parcialmente a viabilidade folicular alterada pela exposição sub-crônica ao cádmio. No entanto, esta terapia não foi capaz de restaurar a atividade 17β-HSD, o que sugere que o efeito protetor do mirtilo não está relacionado com a atividade hormonal. Desta forma, verificou-se que o cádmio se acumula em ovários de camundongas após exposição subcrônica causando dano neste tecido e o extrato hidroalcoólico de mirtilo apresenta propriedades antioxidantes que poderiam proteger, ao menos em parte, o tecido ovariano dos efeitos tóxicos do cádmio.

Palavras-chave: Cádmio, Ovário, viabilidade folicular, 17 β-hidroxiesteróide desidrogenase, δ-aminolevulinato-desidratase, Mirtilo.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

**BLUEBERRY (*Vaccinium ashei* Reade) AMELIORATES OVARIAN DAMAGE
INDUCED BY SUB-CHRONIC CADMIUM EXPOSURE IN MICE**

AUTHOR: ARYELE PINTO IZAGUIRRY

ADVISOR: FRANCIELLI WEBER SANTOR CIBIN

Date and Place of Defense: Uruguaiana, August 03rd, 2013

Cadmium is one of the most toxic pollutants which is widely distributed in the environment. Non-occupational human exposure to cadmium predominantly results from cigarette smoke, air pollution and consumption of cadmium contaminated foods and water. This metal presents a low rate of excretion from the body and a long biological half-life and for this reason cadmium accumulates over time in blood, kidney, and liver as well as in the reproductive organs, including the placenta, testis, and ovaries. Cadmium exposure is strongly associated with reproductive toxicity in both animal and human populations culminating in infertility and cancers in reproductive tissues. The pathogenesis of ovarian damage and reduction of follicle viability following cadmium exposure is generally ascribed to oxidative damage. Thus, antioxidant compounds could be an alternative therapy against cadmium toxicity. Emergent evidences suggest that eating more fruits and vegetables with antioxidant properties could help in preventing of several diseases. The blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) fruit is one of the richest sources of antioxidant phytochemicals among fruits and vegetables. This way, we verified the *in vitro* antioxidant potential of the blueberry extract, which demonstrated a significant DPPH radical and reactive species (RS) scavenger activities. This extract showed high total polyphenol content (558.27 μg GAE/mL). After, this study evaluated the protective role of hydro-alcoholic extract of blueberry on the follicular viability and ovarian oxidative damage induced by sub-chronic cadmium exposure in mice. Mice received CdCl_2 (2.5 mg / kg) subcutaneously and blueberry extract (2.5 mg/ kg) orally for 3 weeks (5 days weekly). Animals were euthanized after 24 hours the last administration, and ovaries were removed to determinate the glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) and 17 β -dehydrogenase hydroxysteroid (17 β -HSD) enzymatic activities, RS levels, cadmium content and the follicles viability. The results demonstrated that animals cadmium-exposed presented a enhance of 2-folds on reactive species levels, reduction in δ -ALA-D and 17 β -HSD activities (30 and 39% of reduction, respectively) as well as a decrease around 69% on follicular viability when compared with control group. No alteration was observed on ovarian GPx and GST activities. The therapy was effective in restoring RS levels, δ -ALA-D activity and partially improves the follicles viability altered by sub-chronic cadmium exposure. However, this therapy was not able to restore 17 β -HSD activity, which suggest that the protective effect of blueberry is not related to hormonal activity. Thus, we verified that cadmium accumulates in mice ovary after sub-chronic exposure causing damage on this tissue and blueberry hydro-alcoholic extract presents antioxidant properties that could protect, at least in part, ovarian tissue from cadmium toxic effect.

Key-words: Cadmium, Ovary, Follicular Viability, 17 β -hydroxysteroid deshydrogenase, δ -aminolevulinate dehydratase, Blueberry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES**Artigo**

Figure 1. Reactive species (RS) levels	44
Figure 2. δ -Aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity	44
Figure 3. Glutathione Peroxidase (GPx) activity.....	45
Figure 4. Glutathione-S-transferase (GST) activity.....	45
Figure 5. Follicles viability.....	46
Figure 6. Ovarian fragment (400x).....	46
Figure 7. 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) activity	47
Figure 8. Cadmium content in mice ovary.....	47

LISTA DE TABELAS**Artigo**

Tabela 1. Blueberry extract effect on reactive species and DPPH scavenging activity <i>in vitro</i>	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATSDR – Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (do inglês, Agency for Toxic Substances and Disease Registry)

CAT – Catalase

Cd – Cádmio

CdCl₂ – Cloreto de cádmio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione dissulfeto

GST – Glutathione-S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IARC – Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (do inglês, International Agency for Research on Cancer)

MT – Metalotioneína

O₂ – Oxigênio molecular

O₂•- – Ânion superóxido

OH• – Radical hidroxila

RO• – Radical alcóxila

RO₂• – Radical peróxila

ROOH – Peróxido orgânico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

WHO – World Health Organization

δ-ALA-D - δ – Aminolevulinato desidratase

17 β-HSD - 17β – hidroxiesteroide desidrogenase

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Cádmio	15
2.2 Estresse oxidativo.....	18
2.3 Mirtilo.....	20
3 OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4 MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO	23
Abstract.....	25
1. Introduction.....	26
2. Materials and methods.....	27
2.1. Chemicals	27
2.2. Preparation of extract	27
2.3. Evaluation of antioxidant potential from blueberry extract in vitro	28
2.3.1. DPPH radical scavenging activity.....	28
2.3.2. RS measurement.....	28
2.3.3 Determination of total polyphenols content	29
2.4. Protective role of blueberry extract on mice ovary sub-chronically exposed to cadmium.....	29
2.4.1. Animals.....	29
2.4.2. Exposure	29
2.4.3. Reactive species (RS) levels	30
2.4.4. δ -Aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity.....	30
2.4.5. Glutathione peroxidase (GPx) activity	30
2.4.6. Glutathione S-transferase (GST) activity	31
2.4.7. Viability of follicles.....	31
2.4.8. Determination of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) activity	31
2.4.9. Determination of cadmium content	32
2.4.10. Protein determination	32
2.5. Statistical Analysis	32
3. Results	32
3.1 Evaluation of antioxidant potential from blueberry extract in vitro	32
3.1.1. DPPH radical scavenging activity.....	32
3.1.2. Reactive Species (RS) in vitro	32
3.1.3. The total polyphenols content	33
3.2. Protective role of blueberry extract on mice ovary sub-chronically exposed to cadmium.....	33
3.2.1. RS levels	33
3.2.2. δ -ALA-D activity	33
3.2.3. GPx and GST activities	33

3.2.4. Viability of follicles	33
3.2.5. Determination of 17β-HSD activity	33
3.2.6. Cadmium content	33
4. Discussion	34
Acknowledgements	36
Conflict of interest	37
References	37
Legends	41
Tables	43
Figures	44
5 CONCLUSÕES	48
6 PERSPECTIVAS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICE A – Esquema representativo dos resultados	58
ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA	59
ANEXO B – Carta de submissão do artigo à revista Food and Chemical Toxicology.	60

1 INTRODUÇÃO

O aumento da poluição ambiental mundial tem elevado a exposição dos seres vivos a diversos contaminantes tóxicos. As intoxicações por metais pesados, especialmente por chumbo, cádmio, arsênio e mercúrio, constituem uma séria ameaça para a saúde humana (WENNEBERG, 1994; HU, 2000; JARUP et al., 1998). O cádmio é uma das substâncias mais tóxicas no meio ambiente, ocorrendo na natureza em baixas concentrações, principalmente em associação com os minérios de sulfeto de zinco, chumbo e cobre (THOMPSON e BANNIGAN, 2008).

As atividades humanas contribuem para o aumento da quantidade de cádmio no ambiente, devido à utilização deste metal industrialmente na fabricação de baterias níquel-cádmio, galvanização, pigmentos plásticos e fertilizantes fosfatados (STOHS et al., 1995; WHO, 2010). Outras formas de dispersão de cádmio incluem a queima de combustíveis fósseis e incineração de resíduos urbanos (WHO, 2010). Além disto, a exposição não ocupacional ao cádmio se dá através da ingestão de água ou alimentos contaminados ou ainda pela exposição à fumaça do cigarro, a qual apresenta quantidades significativas deste metal (ATSDR, 2008; JARUP et al., 2009).

A emissão de cádmio na atmosfera tem sido um problema de saúde mundial devido ao seu elevado tempo de meia-vida biológica em muitos seres vivos, incluindo os seres humanos (10-35 anos) (WHO, 2011). Este metal pode se acumular em vários órgãos, tais como fígado, rins (JIHEN et al., 2008), pulmões (KLIMISCH, 1993), testículos (HAOUEM et al., 2008) e ovários (NAMPOOTHIRI e GUPTA, 2006).

Muitos estudos indicam que o efeito tóxico do cádmio está relacionado principalmente com o estresse oxidativo. Ognjanović e colaboradores (2010) demonstraram que, a exposição a este metal leva a uma redução na atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e glutatona-S-transferase (GST) em testículo de camundongos. A diminuição destas defesas antioxidantes contribui para o aumento na quantidade de espécies reativas, que, por sua vez, reagem com proteínas, lipídios e DNA, provocando deterioração oxidativa (KRYSTON et al., 2011). Desta maneira, compostos com propriedades antioxidantes poderiam ser uma alternativa na proteção ou tratamento do dano oxidativo induzido pela exposição ao cádmio.

Nutracêuticos são alimentos ou frações de alimentos que possuem atividades benéficas na prevenção e tratamento de doenças (MORAES e COLLA, 2006). Um exemplo de nutracêutico que se encontra em evidência é o Blueberry (*Vaccinium ssp*), popularmente conhecido como mirtilo, uma planta de espécie frutífera originária da Europa e América do Norte (SILVA et al., 2008).

Os trabalhos com mirtilo no Brasil iniciaram em 1983, na Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS), com a introdução de cultivares de baixa exigência em frio do grupo ‘rabbiteye’ (olho- de-coelho), oriundas da Universidade da Flórida (Estados Unidos). Os frutos do mirtilo apresentam significativo valor de mercado, devido ao sabor exótico, seu valor econômico e suas propriedades medicinais. (RASEIRA e ANTUNES, 2004). Este nutracêutico têm demonstrado propriedades antioxidantes *in vitro* (CASTREJÓN, et al. 2008) e *in vivo* (DULEBOHN et al., 2008; MOLAN, 2008), as quais tem sido atribuídas a elevada quantidade de compostos fenólicos contidos nesta fruta, sendo antocianinas a substância majoritária (BORNSEK et al., 2012; KÄHKÄONEN et al., 2003).

Tendo em vista que intoxicações por cádmio induzem dano oxidativo em diversos órgãos, incluindo os do sistema reprodutivo, a busca de terapias com propriedades antioxidantes poderiam ser uma alternativa frente ao dano provocado por este metal. Desta forma, este trabalho avaliou o efeito da exposição sub-crônica ao cádmio sobre o tecido ovariano, bem como o papel protetor do extrato hidroalcoólico de mirtilo (*Vaccinium ashei Reade*) frente a toxicidade induzida pelo metal em ovários de camundongas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cádmio

Devido ao aumento da poluição industrial e atividade de combustão natural, a população está voluntariamente e involuntariamente exposta a alguns poluentes ambientais como hidrocarbonos orgânicos, pesticidas e metais pesados (SALEH et al., 2011). A exposição humana a uma variedade de metais pesados, especialmente chumbo, mercúrio, arsênico e cádmio tem sido um problema de saúde pública (WENNEBERG, 1994; Hu, 2000; JARUP et al., 1998).

O cádmio é uma das substâncias mais tóxicas no meio ambiente, ocorrendo na natureza em baixas concentrações, principalmente em associação com os minérios de sulfeto de zinco, chumbo e cobre (THOMPSON e BANNIGAN, 2008). Este metal foi descoberto como um elemento em 1817, pelo químico alemão Friedrich Strohmeyer. Um século depois, Stephens (1920) relatou intoxicações de trabalhadores por cádmio e as primeiras contribuições toxicológicas sobre a farmacologia deste metal foram descritas por Schwartze e Alsberg (1923).

Em torno de 1930, a doença de Itai-itai foi notada pela primeira vez na região da bacia do rio Junzu em Toyama na região central do Japão. No entanto, somente nos anos 60 foi identificada como um doença provocada por intoxicação com cádmio. Um médico local, com a colaboração de especialistas externos, confirmou que o doença foi causada pela poluição de uma mina de cobre (Kamioka), localizada próxima ao rio (KAJI, 2012). A doença de Itai-itai é a forma mais severa de intoxicação crônica por cádmio causada por ingestão prolongada deste metal, sendo a principal característica clínica da doença o dano renal manifestado por disfunção tubular e glomerular combinados com osteomalácia e osteoporose (INABA et al., 2005).

Atualmente o cádmio está em 7º lugar na lista prioritária de substâncias perigosas da Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR), que classifica os compostos conforme a ameaça significativa que esses apresentam a saúde humana devido a sua toxicidade conhecida ou suspeita, e a potencial exposição humana a essas substâncias (ATSDR, 2011). Além disso, o cádmio também é classificado como carcinogênico pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (IARC, 1993).

O cádmio encontra-se relativamente disperso no ambiente, principalmente pela poluição causada por indústrias de baterias, pigmentos, plásticos, fertilizantes e galvanoplastia (ATSDR, 2008). Outras fontes de liberação de cádmio para o ambiente são mineração, fundição, queima de combustíveis fósseis, eliminação de resíduos (WHO, 2010) e fumaça de cigarro, a qual apresenta quantidades significativas deste metal (STOHS et al., 1997).

Devido a sua distribuição generalizada, o cádmio pode ser encontrado em quantidades mensuráveis em quase tudo o que comemos, bebemos e respiramos (WHO, 1992). Porém, este metal é uma das substâncias mais tóxicas aos seres vivos possuindo um elevado tempo de meia vida para eliminação (10-35 anos) (WHO, 2011). Para prevenir o dano celular, as células respondem à exposição ao cádmio aumentando a expressão de metalotioneínas (MT), uma proteína que se liga a metais (essenciais e não essenciais) em nível transicional, a fim de torná-los menos reativos e diminuir sua toxicidade (KLAASSEN, et al., 1999; TRINCHELLA et al., 2006)

O organismo possui uma capacidade limitada para responder a exposição ao cádmio, como o metal não pode sofrer degradação metabólica para espécies menos tóxicas e é apenas fracamente excretado, o armazenamento em longo prazo é uma opção viável para lidar com este elemento tóxico (WAALKES, 2003). Desta forma, o cádmio acumula-se em diversos órgãos como fígado, rins (JIHEN et al., 2008), pulmões (KLIMISCH, 1993), testículos (HAOUEM et al., 2008) e ovários (NAMPOOTHIRI e GUPTA, 2006) causando toxicidade.

2.2 Efeito do cádmio sobre o sistema reprodutor

O efeito do cádmio sobre o sistema reprodutor feminino tem sido bem evidenciado. Varga e colaboradores (1993) demonstraram que o cádmio acumula-se em ovários humanos entre os 30 e os 65 anos de idade. O cádmio tem o potencial de afetar a reprodução e o desenvolvimento em todos os estágios do processo reprodutivo (THOMPSON & BANNIGAN, 2008). Em relação aos estudos sobre os efeitos tóxicos do cádmio sobre o sistema reprodutivo feminino experimentalmente em roedores devemos considerar que o cádmio pode levar a alterações histopatológicas em ovário e útero (PAKSY et al., 1997; MASSÁNYI et al., 2007) e alterar a morfogênese ovariana (ZHANG et al., 2007; PIASEK E LASKEY, 1999)

Piasek (2002) demonstrou alteração na esteroidogênese de ovário e placenta após exposição ao cádmio *in vitro* e *in vivo*. Zhang et al. (2007) verificou que após incubação de células da granulosa de ovários com CdCl₂ (10, 20 ou 40 µM) *in vitro*, houve diminuição dos níveis de progesterona dose-dependente. Posteriormente foi demonstrado que o cádmio pode inibir a liberação de progesterona e estrogênio nos ovários, um importante mecanismo de desregulação endócrina, que pode ter influenciado na diminuição do crescimento folicular e aumento de folículos atrésicos encontrados (ZHANG, et al., 2008).

O estradiol é o mais potente esteróide do sexo feminino e um dos responsáveis pela ação estrogênica em mulheres (VIHKO et al., 2001). A família das 17β-hidroxiesteróide desidrogenases afeta a disponibilidade de estrógenos e andrógenos biologicamente ativos. Paksy et al. (1992) relataram que o cádmio entra nas células da granulosa e provoca uma diminuição dose-dependente na produção de estradiol, o que poderia ser mediada por um efeito de interferência do metal.

Os mecanismos de toxicidade do cádmio ainda não estão totalmente elucidados. Têm-se demonstrado que o cádmio tem uma elevada afinidade por sítios de ligação de zinco e de cálcio e pode deslocar esses metais de complexos preexistentes (PREDKI e SARKAR, 1994,. ARAMINI et al., 1995). Ognjanovi'c e colaboradores (2010) demonstrou que cádmio reduziu a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR e GST) de testículo após exposição aguda ao metal. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a exposição a uma única dose de cádmio (2,5 mg/kg) inibe a atividade da enzima δ-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D) de ovário de camundongas (SOARES et al., 2013; VARGAS et al., 2013). Esta enzima é considerada um marcador de intoxicação por metais bem como a redução de sua atividade está relacionada a situações pró-oxidantes (ROCHA et al., 2012). Além disto, o dano intracelular causado pela exposição ao cádmio inclui a diminuição dos níveis de glutathiona (GSH), ligação a grupos sulfidríla, desnaturação de proteínas (LIU et al., 2009), peroxidação lipídica e ruptura dos filamentos de DNA (HENGSTLER et al., 2003; LOPEZ et al., 2006).

Sendo assim, o dano provocado pelo cádmio ao sistema reprodutivo tem sido associado ao estresse oxidativo por muitos autores, tanto por formação de radicais livres quanto pela inibição de defesas celulares enzimáticas e não-enzimáticas (SANTOS, et al., 2004; ACHARYA, et al., 2008; OGNJANOVIĆ, et al., 2010).

2.2 Estresse oxidativo

Espécies que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência são chamadas de radicais livres e são altamente reativas (HALLIWELL, et al., 1990). Nos organismos aeróbios isso geralmente ocorre com a redução de uma molécula de oxigênio (O_2) a ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Visto que esta é uma reação de óxido-redução, é importante ressaltar que a formação do ânion superóxido e outros radicais livres em seres vivos podem ser formados por processos de oxidação proveniente do metabolismo aeróbico, sendo portanto produzidos naturalmente ou por uma disfunção biológica (HALLIWELL, 1991; BARREIROS et al., 2006).

Entretanto, o termo radical livre não é ideal para designar todos os agentes reativos, pois alguns destes não possuem elétrons desemparelhados, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar do peróxido de hidrogênio não ser um radical livre, ele pode ser bastante danoso às células, principalmente devido à reação entre ele e o ânion superóxido, mediado por íons de ferro ou cobre, formando o radical OH^{\bullet} que é altamente reativo (HALLIWELL, 1991).

Como a maioria desses agentes são derivados do metabolismo do oxigênio, eles são usualmente chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), mas há também espécies reativas de nitrogênio e cloro (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). As EROs mais estudadas são o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mas há também aquelas provenientes de moléculas orgânicas como os radicais peroxila (RO_2^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}), e peróxidos orgânicos (ROOH) (SIES, 1991).

As EROs possuem um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é a participação destas na resposta imune a infecções. Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de oxigênio. Nesse processo, o oxigênio consumido é convertido em ânion superóxido através do complexo da NADPH oxidase, que é usado para eliminar bactérias e partículas englobadas pelos fagócitos, no processo chamado de fagocitose (HALLIWELL, 1991; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Há evidências de que as EROs também desempenham um papel importante na sinalização celular (RAY, et al., 2012).

Todavia, os radicais podem reagir com não-radicaís de diversas maneiras. Ele pode doar o seu elétron desemparelhado para uma molécula não-radical reduzindo-a,

pode extrair um elétron de outra molécula, por sua vez oxidando-a, ou pode unir-se à um não-radical. Qualquer que seja a reação que ocorra, dentro dessas três possibilidades, a espécie que até então era não-radical acaba por tornar-se um radical (HALLIWELL, 1991).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (BIANCHI et al., 1999).

Os antioxidantes produzidos pelo organismo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD ou, não enzimaticamente a exemplo de glutathiona reduzida, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolípico. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o *α*-tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), minerais antioxidantes (selênio e zinco) e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BIANCHI et al., 1999; BARREIROS et al., 2006; PUTAROV, 2010).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a formação de EROs e as defesas antioxidantes celulares, acontece o que chamamos de estresse oxidativo. As EROs estão relacionadas com a patogênese de diversas condições que afetam praticamente todos os sistemas do corpo humano, entre elas está aterosclerose, câncer, diabetes, dano hepático, artrite reumatóide, catarata, doença inflamatória intestinal, desordens do sistema nervoso, doença de Parkinson, doenças neuromotoras, e condições associadas com o nascimento prematuro (AGARWAL, et al., 2004). Além disso, o estresse oxidativo tem sido bastante associado com a infertilidade (MAKKER, et al., 2009; BANSAL, et al., 2011).

As evidências abundantes sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de várias doenças tem atraído a atenção dos cientistas e público em geral para o papel dos antioxidantes na manutenção da saúde e prevenção e tratamento de doenças (NIKI et al., 2010). Nutracêuticos são alimentos ou partes de alimentos que possuem propriedades benéficas à saúde, na prevenção ou cura de doenças (MORAES e COLLA, 2006). Estes alimentos ou compostos isolados de alimentos tem sido foco de

pesquisas a fim de utilizá-los como terapia ou na prevenção de patologias, através da dieta. Desta forma, a utilização de nutracêuticos poderia ser uma terapia alternativa frente a diversos distúrbios.

2.3 Mirtilo

O mirtilo é uma planta frutífera que pertence a família Ericaceae, e é classificado dentro da subfamília Vaccinioideae, na qual se encontra o gênero *Vaccinium* (TREHANE, 2004). Os frutos com diâmetro entre 8 e 22 mm, de sabor agridoce (CHILDERS e LYRENE, 2006), apresentam propriedades nutracêuticas e alto potencial antioxidante (KALT et al., 2007). No mundo, existem três grupos principais de mirtilo cultivados comercialmente: os de arbustos baixos (lowbush), os de arbustos altos (highbush) e os do tipo olho-de-coelho (rabbiteye) (CHILDERS e LYRENE, 2006; STRIK, 2007). O cultivo comercial do mirtilo está em franca expansão em países da América do Sul como Chile, Argentina, Uruguai e Brasil (STRIK, 2005; BAÑADOS, 2006).

No Brasil, os principais cultivares pertencem ao grupo rabbiteye (*V. ashei* Reade) (ANTUNES e RASEIRA, 2006), com plantas que podem atingir até 10 metros de altura e originárias mais especificamente do norte da Flórida e sul de Alabama e Geórgia. Esta espécie é considerada pelos produtores como a que oferece as maiores possibilidades para a adaptação, pois é tolerante a uma variação maior de pH do solo e a altas temperaturas, além disso apresenta certa resistência à seca e baixa necessidade em frio (ECK et al., 1990). Apresentam como características: elevado vigor, plantas longevas, alta produtividade, tolerância ao calor e à seca, baixa exigência na estação fria, floração precoce, longo período entre floração e maturação (EHLENFELDT et al., 2007) e frutos firmes, com longa vida pós-colheita se conservados adequadamente (ANTUNES, 2008).

Os trabalhos com mirtilo no Brasil iniciaram em 1983, na Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS), com a introdução da coleção de cultivares de baixa exigência em frio do grupo rabbiteye, oriundas da Universidade da Flórida (Estados Unidos). O plantio comercial iniciou em 1990, na cidade de Vacaria (RS). Estima-se a produção de mirtilo em cerca de 60 toneladas, concentradas nas cidades de Vacaria e Caxias do Sul (RS), Barbacena (MG) e Campos do Jordão (SP), totalizando uma área de

aproximadamente 35 hectares. A região de Vacaria foi pioneira no cultivo dessa espécie e é a grande referência em termos de produção (RASEIRA e ANTUNES, 2004).

Os frutos do mirtilo apresentam significativo valor de mercado, devido ao sabor exótico, seu valor econômico e suas propriedades medicinais (RASEIRA e ANTUNES, 2004). Muitos trabalhos têm sugerido que as frutas de mirtilo possuem atividades biológicas, incluindo a prevenção de infecções do trato urinário (JEPSON e CRAIG, 2007), atividade antiinflamatória e antitumoral (NETO, 2007; YI, et al., 2005; PRIOR, et al., 2003). Além disto, este nutracêutico têm demonstrado propriedades antioxidantes *in vitro* (CASTREJÓN, et al. 2008) e *in vivo* (DULEBOHN et al., 2008; MOLAN, 2008). Grande parte da natureza protetora do mirtilo pode ser atribuída aos elevados níveis de compostos fenólicos encontrados na fruta (BORNSEK et al., 2012; KÄHKÄONEN et al., 2003). Polifenóis, como os flavonóides, podem reduzir o estresse oxidativo por neutralizar diretamente radicais livres e quelar metais de transição (PRIOR, 2003; DUTHIE, 2007). Os frutos de mirtilo são ricos em flavonóides, principalmente em antocianinas e proantocianidinas, substâncias as quais têm se atribuído os efeitos benéficos desta planta. (GU et al., 2002; PRIOR, et al., 2001).

As antocianinas são pigmentos que conferem as cores vermelho e azul observados em muitos frutos e flores (MARKIDES, 1982). Existe um interesse crescente na utilização de alimentos funcionais e nutracêuticos ricos em antocianinas devido aos seus potenciais benéficos à saúde (ZHANG, et al., 2004), que incluem a redução do risco de doença cardíaca coronária (RENAUD e LORGERIL, 1992), melhora da visão (MATSUMOTO, et al., 2003), e efeitos anti-cancerígenos (BOMSER, et al., 1996; KAMEI et al., 1995), anti-mutagênicos (TATE, et al., 2003), anti-inflamatórios (HU, et al., 2003; WANG e MAZZA, 2002) e hipoglicemiantes (GRACE, 2009).

Desta forma, a associação de dietas ricas em frutas e vegetais e a redução do risco de doenças crônicas está bem estabelecida. Os antioxidantes dietéticos encontrados em frutas e vegetais, como os polifenóis, podem contribuir para os seus efeitos benéficos de saúde, bem como atuar na prevenção e terapia de doenças.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo geral avaliar o tecido ovariano após a exposição sub-crônica ao cádmio bem como verificar o efeito do extrato hidroalcoólico de mirtilo (*Vaccinium ashei Reade*) frente à toxicidade deste metal em camundongas.

3.2. Objetivos específicos

- ❖ Avaliar o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de mirtilo *in vitro*, através da determinação da atividade scavenger do radical DPPH e de espécies reativas.
- ❖ Verificar o efeito da exposição sub-crônica (3 semanas) ao cádmio em ovários de camundongas, bem como o papel protetor do extrato de mirtilo, avaliando os seguintes parâmetros:
 - A atividade das enzimas δ -ALA-D, GPx, GST e 17 β -HSD
 - Os níveis de Espécies Reativas nos ovários após a exposição ao cádmio
 - O acúmulo de cádmio no tecido ovariano.
 - A viabilidade folicular dos ovários.
- ❖ Determinar os níveis de compostos fenólicos totais presentes no extrato hidroalcoólico de *Vaccinium ashei Reade* a fim de verificar a relação destes com os possíveis efeitos benéficos da terapia utilizada.

4 MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está apresentado da mesma forma que foi submetido ao periódico ***Food and Chemical Toxicology***.

Blueberry (Vaccinium ashei Reade) ameliorates ovarian damage induced by sub-chronic cadmium exposure in mice

Aryele Pinto Izaguirry^a, Melina Bucco Soares^a, Laura Musacchio Vargas^a, Cristiano Chiapinotto Spiazzi^a, Daniela dos Santos Brum^a, Simone NoreMBERG^{a,b}, Francielli Weber Santos^{a,*}

^aLaboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

*Correspondence should be sent to:

Francielli W Santos

Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

Phone: 55-55-3413-4321

FAX: 55-55-3413-4321

E-mail: francielliweber@yahoo.com.br

Abstract

Cadmium is one of the most toxic pollutants that disrupt both male and female reproductive system. This study was carried out to verify the effect of sub-chronic cadmium exposure (2.5 mg/kg during 3 weeks) on ovarian tissue in mice. Furthermore, we tested blueberry therapy as a protector against cadmium toxicity. We verified that cadmium exposure damaged the female reproductive system, evidenced by a significant enhance in reactive species (RS) levels, reduction in δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) activities as well as by the reduction on follicles viability in ovarian tissue. No alteration was observed on ovary glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) activities. Blueberry was effective in restoring RS levels, δ -ALA-D activity and it partially improves the follicles viability altered by sub-chronic cadmium exposure. However, this therapy was not able to restore 17 β -HSD activity. In addition, blueberry extract demonstrated antioxidant potential *in vitro* as verified by DPPH radical and RS scavenging activities as well as by the high total polyphenols content. Thus, we verified that cadmium accumulates in mice ovary after sub-chronic exposure causing damage on this tissue and blueberry presents antioxidant properties that could protect, at least in part, ovarian tissue from cadmium toxic effect.

Key-words: Cadmium; ovary; follicles viability; blueberry; δ -ALA-D; 17 β -HSD

1. Introduction

Cadmium is one of the most toxic pollutants which is widely distributed in the environment. Non-occupational human exposure to cadmium predominantly results from smoking, air pollution and consumption of cadmium contaminated foods and water (Järup and Åkesson, 2009). This metal presents a low rate of excretion from the body and a long biological half-life. For this reason, cadmium accumulates over time in blood, kidney, and liver (ATSDR, 2008) as well as in the reproductive organs, including the placenta, testis, and ovaries (Piasek et al., 2001).

Studies demonstrates that women have higher cadmium body burden than men, presenting higher concentrations of cadmium in blood, urine and kidney cortex (Vahter et al., 2007). The main reason for the higher body burden in women may be related to increased intestinal absorption of dietary cadmium at low iron stores (Kippler et al., 2007). Varga and collaborators (1993) demonstrated that cadmium accumulates in the human ovary between 30 and 65 years old. This metal has been shown to alter ovarian cell morphology and act as an ovarian endocrine disruptor (Zhang et al., 2008).

A variety of experiments have suggested that cadmium causes oxidative damage to cells. This metal has been demonstrated to stimulate free radical production, resulting in oxidative deterioration of lipids, proteins and DNA, and initiating various pathological conditions in humans and animals (Nordberg, 2009). Estradiol is the most potent female sex steroid and the one responsible for estrogen action in women (Vihko et al., 2001). The family of 17β -hydroxysteroid dehydrogenases (17β -HSDs) affects the availability of biologically active estrogens and androgens. Paksy et al. (1992) reported that cadmium enters the granulosa cells and causes a dose dependent decrease in estradiol production, which could be an effect mediated by interference of metal with the aromatase system.

Even though chelating agents have been tested to reduce the cadmium toxicity (Sompanit et al., 2010), some of them are burdened with undesirable side effects. For this reason, natural substances that present pharmacological benefits have been studied as a new approach to treat cadmium intoxication (Wang et al., 2012).

Emergent evidences suggest that eating more fruits and vegetables with antioxidant properties could help in preventing of several diseases. Blueberries (*Vaccinium* spp.) are one of the richest sources of antioxidant phytochemicals among fruits and vegetables. The blueberries fruit anthocyanins and proanthocyanidins are believed to be responsible for the beneficial biological activities (Bornsek et al., 2002),

such as prevention of urinary tract infections (Jepson & Craig, 2007), anticancer (Seeram, 2008) and antioxidant activities (Castrejón et al., 2008). In fact, blueberry fruit extracts shows antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* (Molan et al., 2008; Wang et al., 2012). It is well known that wide differences in antioxidant activities exist among cultivars and between species. Brazil has recently become a blueberry producer with a small production concentrated in the south and southeastern regions of the country (Rodrigues et al., 2011).

In this way, this study was carried out to verify the effect of sub-chronic cadmium exposure on ovarian tissue in mice. In addition, we evaluated the protective role of the fruits hydro-alcoholic extract of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade, bluegem cultivar) against cadmium toxicity. Antioxidant potential of this extract *in vitro* as well as the polyphenols content was also verified.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Cadmium chloride, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid, glutathione reductase from baker's yeast, 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced tetrasodium salt (NADPH), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), 17β -Estradiol, β -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD^+) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was purchased from Aldrich Chemical Co (USA). All the other reagents used in this study were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Preparation of extract

In order to match a domestic preparation an extraction type beverage was used. Crude hydro-alcoholic extract from one rabbiteye blueberry (*Vaccinium asheii*) cultivars ('Bluegem') was prepared by weighing fresh fruits (250 mg), macerated using a porcelain grail and pistil, in the dark, to preserve the antioxidant properties of its constituents and then mixed with 100 ml of hydro-alcoholic solution (4:1, distilled water:alcohol). The crushed berries in solution were put in centrifuge tubes. Tubes were centrifuged ($3000\times g$, 15 min) and the supernatant fluid was collected and used either within 1 h of collection or stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further work. The fruits were generously

provided by Maria do Carmo Bassols Raseira (Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, EMBRAPA, Pelotas, RS, Brazil).

2.3. Evaluation of antioxidant potential from blueberry extract *in vitro*

In order to determine the antioxidant potential of this obtained blueberry extract we evaluated the scavenging activity of 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, the ability to prevent reactive species (RS) production induced by sodium azide as well as we quantified the total polyphenols content. These experiments are important to justify the use of this extract in the prevention of ovary damage cadmium-induced.

2.3.1. DPPH radical scavenging activity

The DPPH stable radical was performed in accordance with Choi et al. (2002). Briefly, 85 μM DPPH was added to a medium containing blueberry extract at different concentrations (2.5-25 $\mu\text{g/mL}$). The medium was incubated for 30 min at room temperature. The decrease in absorbance was measured at 518 nm, which depicted the scavenging activity of blueberry extract against DPPH. Ascorbic acid (2.5-25 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control to determine the maximal decrease in DPPH absorbance. The values were expressed in percentage of inhibition of DPPH absorbance in relation to the control values without blueberry extract.

2.3.2. RS measurement

RS production in mice liver was induced by sodium azide, which causes mitochondrial dysfunction by inhibiting cytochrome oxidase activity (Chen et al., 2003). To estimate the level of liver homogenate RS production an aliquot of S1 (10 μl) was incubated with 10 μl of dichlorofluorescein (DCF; 1mM) in the presence or the absence of a pro-oxidant (10mM sodium azide), and blueberry extract (2.5-25 $\mu\text{g/mL}$). The reactive species levels were determined by a spectrofluorimetric method, using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) assay. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein is measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium.

2.3.3 Determination of total polyphenols content

Total polyphenols content (TP) of the blueberry extract was measured by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu method, with modifications (Singleton et al., 1999). Briefly, 1 mL of 1 N Folin-Ciocalteu reagent was added to a 1 mL of sample, and this mixture was allowed to stand for 2-5 min before the addition of 2 mL of 20% Na₂CO₃. The solution was then allowed to stand for 10 minutes before reading at 750 nm Lambda 35 UV/Vis Spectrophotometer Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA) using 1 cm quartz cells. The total polyphenol content was expressed as milligram of gallic acid equivalent per milliliter (mg GAE mL⁻¹).

2.4. Protective role of blueberry extract on mice ovary sub-chronically exposed to cadmium

2.4.1. Animals

Female adult Swiss albino mice (30-35 g) were used for this experiment. The animals were kept in appropriate animal cabinet with forced air ventilation, in a 12 hours light/dark cycle, at a controlled room temperature of 22 °C, with food (Puro Trato, RS, Brazil) and water *ad libitum*. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil) and all efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering. This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of Federal University of Pampa (Protocol n° 045/2012).

2.4.2. Exposure

A group of six mice was usually tested in each experiment. The mice were injected subcutaneously (s.c.) with CdCl₂ (2.5 mg/kg) (dissolved in saline at 0.25 mg/mL) and 30 min later they received orally (via gavage) 2.5 mg/kg blueberry extract five times weekly for a test period of 3 weeks. Animals were euthanized 24 h after the last cadmium treatment and then the ovaries were rapidly dissected, placed on ice and weighed. Tissues were immediately homogenized in cold 50mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10min at 3000×g to yield a pellet, that was discarded, and a low-speed supernatant (S1) obtained was used to determine glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), δ-aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D), 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) activities as well as the reactive species levels. Whole ovaries were weighted and digested with

nitric acid to determine cadmium content or ovary was fixed in Carnoy to evaluate the follicles viability.

The protocol of mice treatment is given below:

Group 1 - Saline (s.c.) + Hydro-alcoholic solution (4:1, distilled water:alcohol, gavage)

Group 2 - Saline (s.c.) + Blueberry extract (2.5 mg/kg, gavage)

Group 3 - CdCl₂ (2.5 mg/kg, s.c.) + Hydro-alcoholic solution (4:1, distilled water:alcohol, gavage)

Group 4 - CdCl₂ (2.5 mg/kg, s.c.) + Blueberry extract (2.5 mg/kg, gavage)

2.4.3. Reactive species (RS) levels

The reactive species (RS) levels were determined in ovary of mice by a spectrofluorimetric method (Loetchutin et al., 2005), using 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) assay. S1 was incubated with 10 µL of DCHF-DA (1mM). The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520nm (with 480 nm excitation) 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium.

2.4.4. δ-Aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D) activity

δ-ALA-D activity was assessed by measuring the formation of porphobilinogen (PBG), according to Sassa (1982) method, except that 45 mM sodium phosphate buffer and 2.4 mM ALA were used. Samples were homogenized in 0.9% NaCl in the proportion (w/v) 1/5 and centrifuged at 2400 × g for 15 min. An aliquot of 50 µL of homogenized tissue was incubated for 3 h at 37 °C. PBG formation was detected with the addition of modified Erlich's reagent at 555 nm.

2.4.5. Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity in S1 was assayed spectrophotometrically by the method of Wendel (1981), through the GSH/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of H₂O₂ at 340 nm. S1 was added in GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H₂O₂. In this assay, the enzyme activity is indirectly measured by means of NADPH decay. H₂O₂ is decomposed generating GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase presents in the

assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

2.4.6. Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm according to a previously described method (Habig, et al., 1974). The reaction mixture contained an aliquot of the homogenized tissue (S1), 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, 100 mM GSH and 100 mM CDNB, which was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

2.4.7. Viability of follicles

Ovarian fragments were dehydrated in alcohol, cleared with xylene, embedded in paraffin and serially sectioned (5 μ m). Every section was mounted onto a glass slide and stained with periodic acid-Schiff (PAS)/hematoxylin. All sections were analyzed with an optical microscope (400 and 1000X; Binocular, Olympus CX31, Tokyo, Japan) by a single, experienced examiner. Follicles were classified according to their developmental stage as a) primordial follicles (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte); b) developing follicles composed of primary follicles (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte) and secondary follicles (oocyte surrounded by more than one complete layer of cuboidal granulosa cells); and c) antral follicles (oocyte surrounded by zona pellucida, with several layers of granulosa cells and an antrum). Follicular quality was evaluated according Kim and Lee (2000), to basement membrane integrity, cell density, the presence or absence of pycnotic bodies, and oocyte integrity, including the general aspect of the cytoplasm, presence of granules, and color. To compare the follicle status in ovary, the ratio (%) of normal follicles was calculated by the equation of [(normal follicles/total follicles) X 100].

2.4.8. Determination of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) activity

To assay ovarian 17 β -HSD activity tissues were homogenized in a solution containing 20% glycerol, 5 mM potassium phosphate and 1 mM EDTA (1/10, w/v) and centrifuged at 10,000 x g for 30 min in an ultracentrifuge at 4°C (Jarabak et al., 1962). The supernatant fluid (200 μ L) was mixed with 950 μ l of 440 μ M sodium pyrophosphate buffer (pH 8.9), 250 μ l of bovine serum albumin (25 mg crystalline BSA) and 20 μ L of 0.3 mM 17 β -Estradiol. 17 β -HSD activities were measured after the

addition of 1 ml of 10 mM NAD⁺ to the cuvette in a UV spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu, Japan) at 340 nm against a blank without NAD⁺. The enzymatic activity was expressed as nmol NADH/min/mg protein.

2.4.9. Determination of cadmium content

Total cadmium content in the ovaries was determined in an analytical chemistry laboratory of the Universidade Federal de Santa Maria. The samples were digested in 0.5 ml concentrated nitric acid. Total Cd in the samples was determined using Analytik Jena ZEE nit 600 atomic absorption spectrometer (Jena, Germany) equipped with a transversal heated graphite furnace, a Zeeman-Effect background corrector, and an autosampler; using 1 g/l of Cd from Specsol (National Institute of Standards and Technology, USA standards).

2.4.10. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method as described (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

2.5. Statistical Analysis

All the data were expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by the Duncan's test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Evaluation of antioxidant potential from blueberry extract *in vitro*

3.1.1. DPPH radical scavenging activity

We verified that the extract (10 and 25 μ g/mL) demonstrated a significant DPPH scavenging activity (23.86 and 44.62 % of inhibition, respectively) (Table 1).

3.1.2. Reactive Species (RS) *in vitro*

Blueberry extract demonstrated a significant reduction in the RS levels increased by sodic azide in all evaluated concentrations.

3.1.3. The total polyphenols content

We detected that the polyphenols content in the blueberry extract was 558.27 μg GAE/mL.

3.2. Protective role of blueberry extract on mice ovary sub-chronically exposed to cadmium

3.2.1. RS levels

The cadmium exposure caused a significant enhance on RS content (around 2-folds) in relation to the control group (Figure 1). Blueberry therapy was effective in restoring this parameter to the control levels.

3.2.2. δ -ALA-D activity

Cadmium exposure induced a significant reduction on ovarian δ -ALA-D activity (around 30 %) and blueberry therapy was effective in restoring enzyme activity to the control levels (Figure 2).

3.2.3. GPx and GST activities

No alteration was observed on ovarian GPx and GST activities in the evaluated groups (Figures 3 and 4, respectively).

3.2.4. Viability of follicles

Sub-chronic cadmium exposure caused a significant decrease in the number of normal follicles (around 69 %). The blueberry therapy was able to partially ameliorate this parameter (Figures 5 and 6).

3.2.5. Determination of 17β -HSD activity

Sub-chronic cadmium exposure significantly reduced ovarian 17β -HSD activity (around 39% of inhibition). Blueberry therapy was not efficient to restore this parameter (Figure 7).

3.2.6. Cadmium content

Animals that have received sub-chronically cadmium (2.5 mg/kg) demonstrated an accumulation of this metal in ovarian tissue (around 12-folds) compared with the

control group (Figure 8). Blueberry extract was not able to reduce the cadmium concentration in ovaries.

4. Discussion

Ovaries are the female gonads composed of oocyte-containing follicles at several stages of development. Females are born with a finite number of the most immature follicular stage, termed primordial follicles, which, once destroyed, cannot be regenerated (Hirshfield, 1991). Environmental factors can cause follicular damage, resulting in impaired fertility (Mattison and Schulman, 1980).

In this work, we verified that sub-chronic cadmium exposure damaged the female reproductive system, evidenced by an increase in reactive species levels, reduction in δ -ALA-D and 17- β HSD activities as well as by the reduction on follicles viability in ovarian tissue. Additionally, we evidenced for the first time that blueberry fruit extract is effective in ameliorating cadmium toxicity.

Previously, we verified that acute cadmium exposure reduced the ovarian δ -ALA-D activity (Soares et al., 2013; Vargas et al., 2013). Importantly, in this work we verified that sub-chronic cadmium exposure also promoted a decrease on enzyme activity. This finding indicates that δ -ALA-D activity is an important marker of cadmium toxicity on ovarian tissue and it seems that sub-chronic exposure causes a similar inhibitory effect on this enzyme compared to acute exposure. A recent review article that has indicated δ -ALA-D enzyme as a marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations mentioned that cadmium presents a dual effect on this enzyme by activating or decreasing its activity. The results are not homogeneous, probably reflecting the source of enzyme, dose and duration of exposure (Rocha et al., 2012). In this study, blueberry extract was able to restore cadmium-inhibited enzyme activity. We believe that this effect is related to antioxidant properties of the extract, evidenced by the high levels of the total polyphenols. In addition, the blueberry extract presented an expressive antioxidant potential *in vitro*, evidenced by DPPH and reactive species assays. In fact, several components in blueberry fruit, including anthocyanins (Cao et al., 1998), have been shown to have antioxidant activity. Many reports have suggested that blueberry fruits have various biological activities, including prevention of urinary tract infections (Jepson and Craig, 2007), antioxidative (Castrejón et al., 2008) and anticancer activities (Seeram, 2008). It is probable that the antioxidant properties of the extract protected the sulfhydryl groups oxidation caused by

the metal, recovering δ -ALA-D activity. The blueberry extract was not effective in reducing cadmium accumulation in ovarian tissue, reinforcing this hypothesis.

Regarding RS determination, DCHF-DA reacts quickly in the presence of reactive species such as $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 and $\text{O}^{\bullet-}$ (Loetchutin et al., 2005). Reactive oxygen species (ROS) have been recently recognized as a new class of signaling molecules of interest in reproductive biology (Agarwal et al., 2005, 2006). In fact, studies have disclosed that ROS play an important role in sperm maturation and capacitation (Drevet, 2006) as well as it has been reported to participate in oocyte maturation to fertilization, embryo development and pregnancy (Iwata et al., 2003; Arenas-Rios et al., 2007). On the other hand, the free radicals production, including those containing oxygen atoms, and consequent oxidative damage is associated with tissue and cell damage (Block et al., 2002; Drew et al., 2001). In the present study, we showed that sub-chronic cadmium exposure caused an important increase on ovarian reactive species (RS) levels. We suppose that this observation is correlated with a significant reduction on follicles viability verified. Blueberry extract completely protected ovarian tissue against an increase on RS levels after cadmium exposure whereas this therapy was partially efficient to improve follicle viability.

To minimize the oxidative damage caused by ROS, cells possess a wide range of enzymatic systems including glutathione peroxidase (GPx). GPx activity is believed to play an important role in cellular antioxidant defense by reducing hydrogen peroxide and various hydroperoxides using glutathione as a reducing agent to generate water (Wendel, 1980). The glutathione S-transferase (GST) enzyme family catalyzes conjugation of GSH to xenobiotics (Jakoby, 1978). Endocrine organs such as the testis, adrenal and ovaries demonstrate remarkably high GST activities (Kraus and Kloft, 1980), which raises questions concerning possible physiological roles of these enzymes. In this study, no alteration was verified on ovarian GPx and GST activities following sub-chronic cadmium exposure. As far as we know, there are no studies demonstrating cadmium effect on GPx and GST activities in ovarian tissue. In testis, we verified that acute cadmium exposure did not change GPx activity whereas this metal reduced GST activity in mice (Spiazzi et al., 2013). Sub-chronic cadmium exposure caused an increase in GPx activity in rat testes and GST activity was not change (Wang et al., 2012).

Epidemiological research in humans shown that cadmium accumulates in the ovaries and blood of women (Varga et al., 1993), leading to histopathology alterations

in the ovary and uterus (Paksy et al., 1997; Massányi et al., 2007). In addition, animals exposed to cadmium presented alteration on ovary morphogenesis (Zhang et al., 2002; Piasek and Laskey, 1999), and inhibited the normal growth and development of the ovarian follicle (Zhang et al., 2002).

Cadmium has been shown to alter ovarian cell morphology and act as an ovarian endocrine disruptor. Piasek et al. (2002) reported that *in vivo* cadmium exposure interfered with ovarian estradiol production, and Zhang et al. (2008) found that cadmium suppressed serum progesterone and estrogen in female rats. Because both estrogens and androgens have the highest affinity towards their receptors in the 17β -hydroxy form, the 17β -HSD enzymes regulate the biological activity of sex hormones. In this study, we verified that sub-chronic cadmium exposure reduced ovarian 17β -HSD activity. This could be contributing with the reduction of the follicles viability observed. However, taking into account that blueberry therapy was able to partially improve the follicles viability but not 17β -HSD activity, we believe that the protective role of blueberry is due its antioxidant potential but not hormonal effect. Nampoothiri and Gupta (2006) also demonstrated that cadmium caused a significant decrease in 17β -HSD activity. Persson et al. (1991) suppose that this decrease could be attributed to indirect mechanisms such as reduced gonadotropin binding as well as direct interaction of metal with the amino acids present on the active site of the enzyme or to $-SH$ groups of cysteine residue present at the NAD^+ binding domain.

Taking into account the importance of studies to define the toxicity mechanisms of cadmium on ovarian tissue as well as to explore new therapeutic approaches to manage its toxicity, in this study we verified that cadmium accumulates in mice ovary after sub-chronic exposure causing damage on this tissue, evidenced by the increase on RS levels, inhibition of δ -ALA-D and 17β -HSD activities as well as by the reduction of the follicles viability. Moreover, we demonstrated that the natural compound (blueberry fruit extract) presents antioxidant properties that could protect, at least in part, ovarian tissue from cadmium toxic effect.

Acknowledgements

The financial support by CNPq and FAPERGS is gratefully acknowledged. CAPES and FAPERGS are also acknowledged for financial support (M.Sc. Fellowship) to A.P.I., L.M.V. and M.B.S.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K., 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 28.

Agarwal, A., Gupta, S., Sikka, S., 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 18, 325–332.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2008. Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Block, G., Dietrich, M., Norkus, E.P., Morrow, J.D., Hudes, M., Caan, B., Packer, L., 2002. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am. J. Epidemiol.* 156, 274–285.

Bornsek, S. M., Ziberna, L., Polak, T., Vanzo, A., Ulrih, N. P., Abram, V., Tramer, F., Passamonti, S., 2012. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chem.* 134, 1878–1884.

Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A., Prior, R. L., 1998. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1081–1087.

Castrejón, A. D. R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., Huyskens-Keil, S., 2008. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chem.* 109, 564–572.

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III, *J. Biol. Chem.* 278, 36027–36031.

Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 153(6):1161–8.

Drevet, J.R., 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 70–79.

- Drew, K.L., Rice, M.E., Kuhn, T.B., Smith, M.A., 2001. Neuroprotective adaptations in hibernation: therapeutic implications for ischemia–reperfusion, traumatic brain injury and neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 563–573.
- Habig, W., Pabst, M., Jokoby, W., 1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hirshfield, A.N., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 124, 43–101.
- Iwata, H., Ohta, M., Hashimoto, S., Nagai, Y., 2003. Free oxygen radicals are generated at the time of aspiration of oocytes from ovaries that have been stored for a long time. *Zygote* 11, 1–5.
- Jakoby, W.B., 1978. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 46, 383–414.
- Järup, L., Åkesson, A., 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 201–208.
- Jepson, R. G., Craig, J. C., 2007. A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 738–745.
- Kraus P., Kloft H.-D., 1980. The activity of glutathione-S-transferases in various organs of the rat. *Enzyme* 25, 158–160.
- Kim, J.K., Lee, C.J., 2000. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in γ -irradiated mouse. *Mutat. Res.* 449, 33–39.
- Kippler, M., Ekström, E.C., Lönnerdal, B., Goessler, W., Åkesson, A., El Arifeen, S., Persson, L.A., Vahter, M., 2007. Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladeshi women. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 221–226.
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.P., Makhetskorn, S., 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat. Phys. Chem.* 72, 323–331.
- Massányi, P., Lukác, N., Uhrín, V., Toman, R., Pivko, J., Rafay, J., Forgács, Z., Somosy, Z., 2007. Female reproductive toxicology of cadmium. *Acta Biol. Hung.* 58, 287–299.
- Mattison, D.R., Schulman, J.D., 1980. How xenobiotic chemicals can destroy oocytes. *Contemp. Obstet. Gynecol.* 15, 157.
- Molan, A. L., Lila, M. A., Mawson, J., 2008. Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. *Food Chem.* 107, 1039–1044.

- Nampoothiri L.P., Gupta S. 2006. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: A cellular model for ovarian toxicity. *Reprod. Toxicol.* 21, 179–185.
- Nordberg, G. F. 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 192–200.
- Paksy K, Vagra B, Lazar P., 1992. Cadmium interferes with steroid biosynthesis in rat granulosa and luteal cells in vitro. *Biometals* 5:245–52.
- Paksy, K., Rajczy, K., Forgács, Z., Lázár, P., Bernard, A., Gáti, I., Kaáli, G.S., 1997. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *J. Appl. Toxicol.* 17, 321–327.
- Piasek, M., Laskey, J.W., 1999. Effects of in vitro cadmium exposure on ovarian steroidogenesis in rats. *J. Appl. Toxicol.* 19, 211–217.
- Piasek, M., Blana, M., Kostial, K., Laskey, J.W., 2001. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod. Toxicol.* 15, 673–681.
- Piasek, M., Laskey, J.W., Kostial, R.K., Blana, M., 2002. Assessment of steroid disruption using cultures of whole ovary and/or placenta in rat and in human placental tissue. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75 (Suppl), S36–S44.
- Persson B, Krook M, Jornall H., 1991. Characteristics of short chain dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* 200, 537–43.
- Rocha, J.B.T., Saraiva, R.A., Garcia, S.C., Gravina, F.S., Nogueira, C.W., 2012. Aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. *Toxicol. Res.* 1, 85-102.
- Rodrigues, E., Poerner, N., Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Mendes, C. R., Fett, R., 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas* 31(4): 911-917.
- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 28, 133-145.
- Seeram, N. P. 2008. Berry fruits for cancer prevention: Current status and future prospects. *J. Agric. Food Chem.* 56, 630–635.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Soares M.B., Izaguirry A.P., Vargas L.M., Mendez A.S.L., Spiazzi C.C., Santos F.W., 2013. Catechins are not major components responsible for the beneficial effect of *Camellia sinensis* on the ovarian δ -ALA-D activity inhibited by cadmium. *Food Chem. Toxicol.* 55, 463–469.

- Sompamit, K., Kukongviriyapan, U., Donpunha, W., Nakmareong, S., Kukongviriyapan, V., 2010. Reversal of cadmium-induced vascular dysfunction and oxidative stress by meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in mice. *Toxicol. Lett.* 198, 77-82.
- Spiazzi C.C., Manfredini V., Silva, F.E.B., Flores É.M.M., Izaguirry A.P., Vargas L.M., Soares M.B., Santos F.W., 2013. γ -Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. *Food Chem. Toxicol.* 55, 526–532
- Vahter, M., Åkesson, A., Lidén, C., Ceccatelli, C., Berglund, M., 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ. Res.* 104, 85–95.
- Varga, B., Zsolnai, B., Paksy, K., Náray, M., Ungváry G, 1993. Age dependent accumulation of cadmium in the human ovary. *Reprod. Toxicol.* 7 (3), 225–228.
- Vargas, L. M., Soares, M. B., Izaguirry, A. P., Lüdtke, D. S., Braga, H. C., Savegnago, L., Wollenhaupt, S., Brum, D. S., Leivas, F. G., & Santos, F. W., 2013. Cadmium inhibits the ovary δ -aminolevulinate dehydratase activity in vitro and ex vivo: Protective role of seleno-furanoside. *J. Appl. Toxicol.* 33, 679–684.
- Vihko P., Isomaa V., Ghosh D., 2001. Structure and function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2. *Mol. Cell Endocrinol.* 171, 71–76.
- Zhang, W., Wu, Z., Li, H., 2002. Effects of cadmium as a possible endocrine disruptor upon the serum level of sex steroids and the secretion of gonadotropins from pituitary in adult rats. *Acta Med. Naqasaki.* 47, 53–56.
- Zhang, W., Pang, F., Huang, Y., Yan, P., Lin, W., 2008. Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. *Toxicol. Lett.* 182, 18–23.
- Wang, W., Sun, Y., Liu, J., Wang, J., Li, Y., Li, H., Zhang, W., 2012. Protective effect of theaflavins on cadmium-induced testicular toxicity in male rats. *Food Chem. Toxicol.* 50(9):3243-50.
- Wang, S. Y., Camp, M. J., Ehlenfeldt, M. K., 2012. Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chem.* 132, 1759–1768.
- Wendel, A., 1980. Glutathione peroxidase. In: Jakoby, W.B. (Ed.), *Enzymatic Basis of Detoxification*, vol. 1. Academic Press, New York, NY, pp. 333–353.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325-333.

Legends

Figure 1 – Reactive species (RS) levels in mice ovary sub-chronically exposed to CdCl₂ and the effect of blueberry (BB). The RS levels were expressed as units of fluorescence (UF), mean ± SD, *n* = 6. Two-way ANOVA was used to determine significant differences, followed by Duncan post-hoc test. Significant difference was considered when *p* < 0.05, and each letter was attributed to different statistical groups.

Figure 2 – δ-Aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D) activity in mice ovary sub-chronically exposed to CdCl₂ and the effect of blueberry (BB). Activity is expressed as nmol of porphobilinogen formed per gram of protein in one hour as mean ± SD, *n* = 6. Two-way ANOVA was used to determine significant differences, followed by Duncan post-hoc test. Significant difference was considered when *p* < 0.05, and each letter was attributed to different statistical groups.

Figure 3 – Glutathione Peroxidase (GPx) activity in mice ovary sub-chronically exposed to CdCl₂ and the effect of blueberry (BB). Activity is expressed as nmol of NADPH consumed per milligram of protein in one minute, mean ± SD, *n* = 6. Two-way ANOVA was used to determine significant differences, followed by Duncan post-hoc test. Significant difference was considered when *p* < 0.05, and each letter was attributed to different statistical groups.

Figure 4 – Glutathione S-Transferase activity (GST) in mice ovary sub-chronically exposed to CdCl₂ and the effect of blueberry (BB). Activity is expressed as nmol of conjugated CDNB per milligram of protein in one minute, mean ± SD, *n* = 6. Two-way ANOVA was used to determine significant differences, followed by Duncan post-hoc test. Significant difference was considered when *p* < 0.05, and each letter was attributed to different statistical groups.

Figure 5 – Follicles viability from mice ovary sub-chronically exposed to CdCl₂ and the effect of blueberry (BB). Results are expressed as % viable follicles, mean ± SD, *n* = 6. Two-way ANOVA was used to determine significant differences, followed by Duncan post-hoc test. Significant difference was considered when *p* < 0.05, and each letter was attributed to different statistical groups.

Figure 6 – Ovarian fragment (400x). **(6a)** (A) Viable antral follicle. (B) Degenerated antral follicle. (C) Viable secondary follicle. NO, Normal oocyte; GC, Granulosa cells; TC, Theca cells, DO, Degenerated oocyte; DGC, Degenerated granulosa cells; O, Oocyte; A, Antrum. **(6b)** Viable primary follicles. NO, Normal oocyte. **(6c)** Degenerated antral follicle. GC, Granulosa cells; TC, Theca cells, DO, Degenerated oocyte; DGC, A, Antrum.

Figure 7 – 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) activity in mice ovary sub-chronically exposed to CdCl_2 and the effect of blueberry (BB). Activity is expressed as nmol of NADH formed per milligram of protein in one minute, mean \pm SD, $n = 6$. Two-way ANOVA was used to determine significant differences, followed by Duncan post-hoc test. Significant difference was considered when $p < 0.05$, and each letter was attributed to different statistical groups.

Figure 8 – Cadmium content in mice ovary sub-chronically exposed to CdCl_2 and the effect of blueberry (BB). Data are expressed as $\mu\text{g Cd/mg}$ tissue, mean \pm SD, $n = 6$. Two-way ANOVA was used to determine significant differences, followed by Duncan post-hoc test. Significant difference was considered when $p < 0.05$, and each letter was attributed to different statistical groups.

Tables

Table 1. Blueberry extract effect on reactive species and DPPH scavenging activity *in vitro*.

Groups	Reactive Species (UF)	DPPH Scavenging Activity (%)
Control	100.68 ± 2.06 ^a	-----
Induced	466.88 ± 47.48 ^b	-----
2.5 µg/mL	219.86 ± 11.75 ^c	1.48 ± 0.29 ^a
5 µg/mL	144.9 ± 5.12 ^d	8.21 ± 1.17 ^{a,b}
10 µg/mL	89.30 ± 7.37 ^{a,e}	23.86 ± 5.93 ^b
25 µg/mL	53.34 ± 3.15 ^e	44.62 ± 2.25 ^c

All data are expressed as mean ± S.D. with $n = 6$. Different letters represent different statistical groups when $p < 0.05$ using two-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.

Figures

Fig. 1

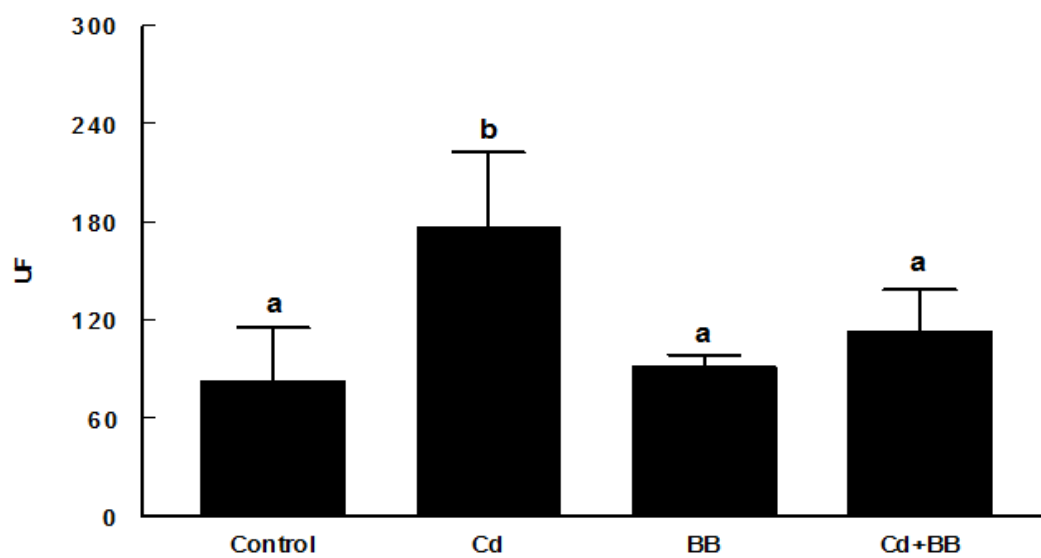


Fig. 2

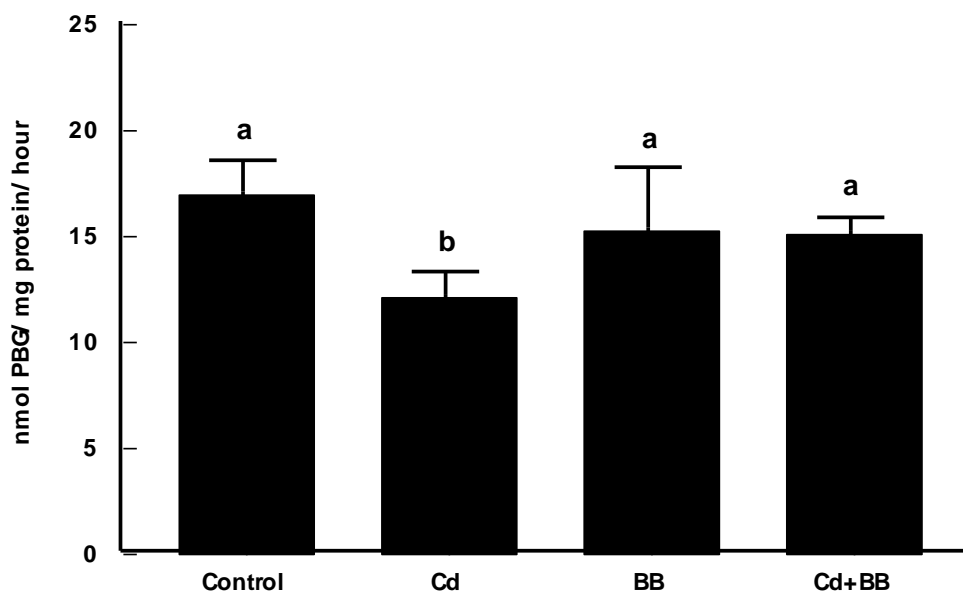


Fig. 3

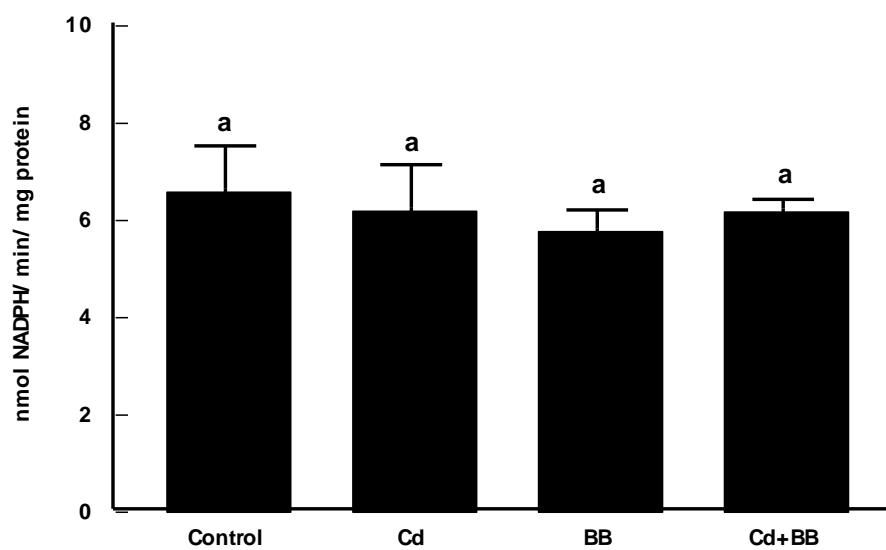


Fig. 4

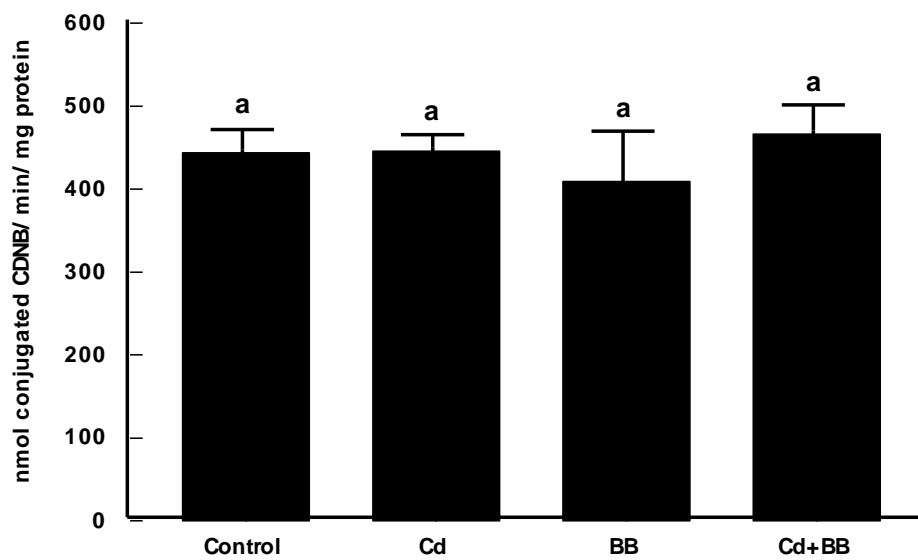


Fig. 5

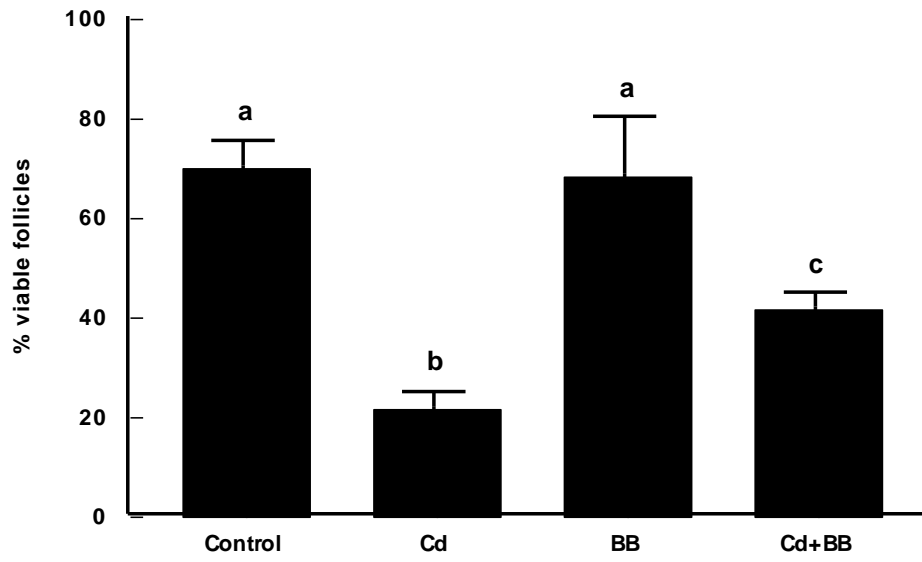


Fig. 6

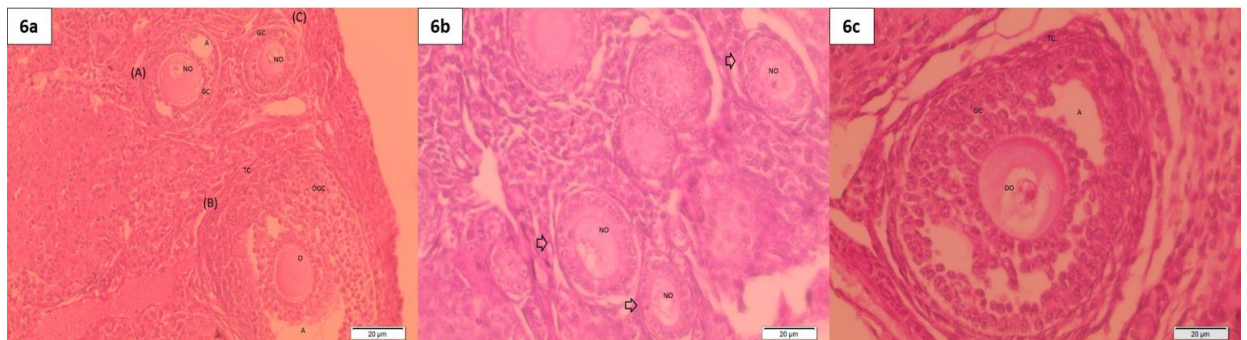


Fig. 7

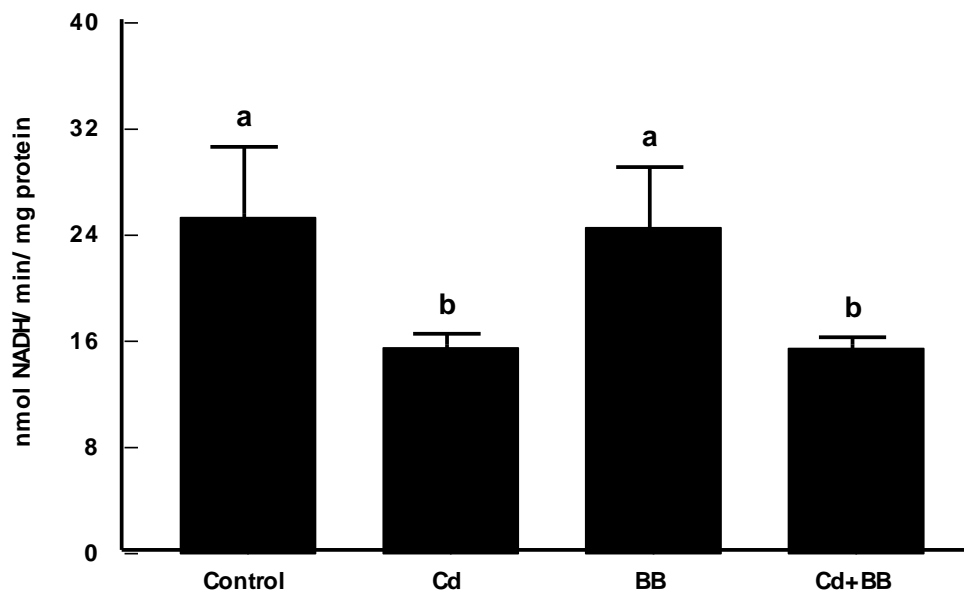
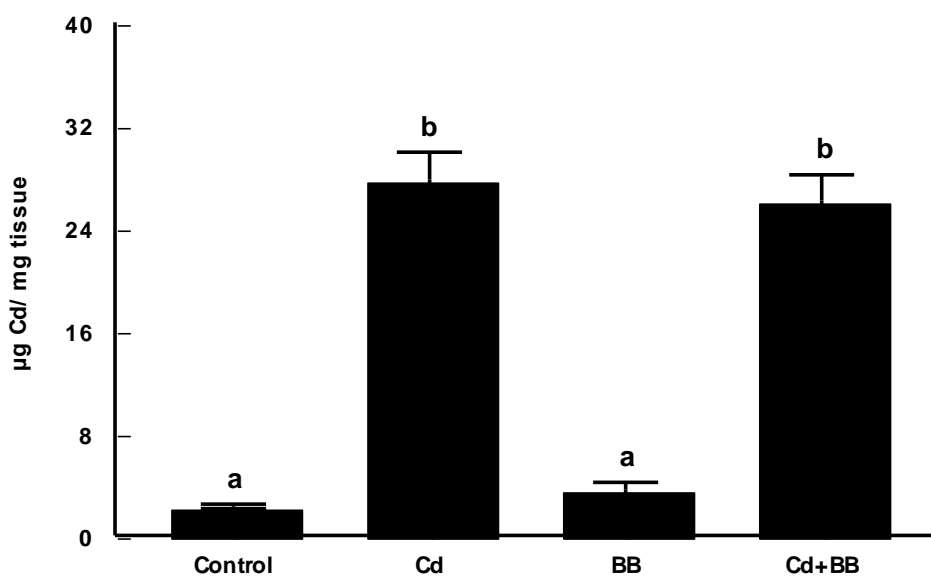


Fig. 8



5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos inferir que:

O extrato hidroalcoólico de mirtilo apresenta atividade antioxidante *in vitro*, evidenciada pela atividade scavenger de radical DPPH e espécies reativas, o que poderia ser atribuído ao seu elevado teor de compostos fenólicos totais (558,27 µg GAE/mL)

Após exposição sub-crônica ao CdCl₂, pode-se observar que o cádmio se acumula nos ovários de camundongas causando dano tecidual evidenciado pelo aumento de ER, bem como pela diminuição da atividade das enzimas 17β-HSD e δ-ALA-D, e ainda pela diminuição da viabilidade folicular.

A terapia utilizada, o extrato hidroalcoólico de Mirtilo (*Vaccinium ashei Reade*) não foi efetivo em proteger contra o acúmulo do metal, nem restaurar a atividade da enzima 17β-HSD. Entretanto, verificou-se que o tratamento com extrato de Mirtilo, foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de ER, prevenir a redução da atividade da enzima δ-ALA-D ovariana, bem como protegeu parcialmente da redução da viabilidade folicular. As enzimas GPx e GST não apresentaram nenhuma alteração com a exposição ao metal, bem como não foi verificado efeito *per se* da terapia. Um esquema representativo dos resultados está disponível no APÊNDICE A.

Apesar do tratamento não ter sido efetivo em proteger contra o acúmulo de cádmio no ovário, os resultados sugerem que o extrato hidroalcoólico de mirtilo apresenta propriedades antioxidantes que poderiam proteger o tecido ovariano dos efeitos tóxicos do cádmio, não atuando diretamente sobre a atividade hormonal regulada pela enzima 17β-HSD. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar quais os possíveis mecanismos de ação do cádmio e do extrato, e sobre quais outros parâmetros a nível de sistema reprodutivo estes poderiam estar atuando.

6 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Avaliação das principais antocianinas presentes no extrato hidroalcoólico de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)
- Tendo em vista a escassez de amostra obtida a partir do ovário de camundonga, pretendemos realizar outro tratamento a fim avaliar parâmetros que não foram possíveis neste tratamento. Determinação dos níveis de antioxidantes não enzimáticos, como Glutationa reduzida (GSH) e Ácido Ascórbico, e outros enzimáticos, como Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutationa Redutase (GR).
- Determinar os níveis de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e o dano de DNA através de ensaio cometa.
- Determinar os níveis de progesterona, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante, com o objetivo de investigar se o cádmio altera os níveis destes hormônios e se o mirtilo poderia interferir nestes parâmetros.
- Liofilizar o extrato hidroalcoólico de mirtilo, e avaliar o efeito deste sobre a exposição subcrônica ao cádmio, a fim de comparar com o efeito obtido com o extrato não liofilizado.
- Posteriormente, testar a terapia com extrato de mirtilo em um modelo de exposição crônica de camundongos machos ao cádmio, para posterior avaliação de parâmetros antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), avaliação histológica dos testículos, assim como avaliação espermática levando em consideração a concentração, motilidade, morfologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, U.; MISHRA, M.; PATRO, J.; PANDA, M. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. **Reproductive Toxicology**, v.25, p.84-88, 2008.
- AGARWAL, A.; NALLELLA, K.; ALLAMANENI, S.; SAID, T. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive Biomedicine Online**, v.8, p.616-627, 2004.
- ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; RISTOW, N. C.; CARPENEDO, S.; TREVISAN, R. Fenologia, produção e qualidade de frutos de mirtilo. **Pesq. agropec. bras.**,v.43, n.8, p.1011-1015, 2008.
- ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.C.B. **Cultivo do mirtilo** (*Vaccinium* spp.). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 8), p.99, 2006.
- ARAMINI, J.M., HIRAOKI, T., KE, Y., NITTA, K. AND VOGEL, H.J. Cadmium-113 NMR studies of bovine and human alpha-lactalbumin and equine lysozyme. **J. Biochem.**, v.117, p.623-628, 1995.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2008.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Detailed data table for the 2011 priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles, 2011.
- BANÃDOS, M. P. Blueberry production in South America. *Acta Horticulturae*, n.715, p.165-172, 2006.
- BANSAL, A.; BILASPURI, G. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*, 2011.
- BARREIROS, A. L. B.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, v. 29, p.113-123, 2006
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, p.123-130, 1999.
- BOMSER, J.; MADHAVI, D. L.; SINGLETARY, K.; SMITH, M. A. In vitro anticancer activity of fruit extracts from vaccinium species. **Planta Medica**, v.62, p.212-216, 1996.
- BORNSEK, S.M.; Ziberna, I.; Polak, T.; Vanzo, A.; Ulrih, N.P.; Abram, V.; Tramer, F.; Passamonti, S. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. **Food Chemistry**, v. 134, p.1878-1884, 2012.

CASTREJÓN, A. D. R., EICHHOLZ, I., ROHN, S., KROH, L. W., HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v. 109, p. 564–572, 2008.

CHILDERS, N.F.; LYRENE, P.M. Blueberries for growers, gardeners, promoters. **Florida: E. O. Painter Printing Company**, p.266, 2006.

DULEBOHN, R. V.; YI, W., SRIVASTAVA, A., AKOH, C., KREWER, G., FISCHER, J. Effects of blueberry (*Vaccinium ashei*) on DNA damage, lipid peroxidation, and phase II enzyme activities in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11700–11706, 2008.

ECK, P.; GOUGH, R.E.; HALL, I.V.; SPIERS, J.M. Blueberry Management In: GALLETTA, G.J.; HIMELRICK, D.G. **Small fruit crop management**. New Jersey: Prentice Hall. p. 273-333, 1990.

EHLENFELDT, M.K.; ROWLAND, L.J.; OGDEN, E.L.; VINYARD, B.T. Floral bud cold hardiness of *Vaccinium ashei*, *V. constablaei*, and hybrid derivatives and the potencial for producing Northern-adapted rabbiteye cultivars. **HortScience**, v.42, p.1131-1134, 2007.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p. 61-68, 1997.

GRACE, M. H.; RIBNICKY, D. M.; KUHN, P.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; YOUSEF, G.G.; RASKIN,I.; LILA, M. A. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. **Phytomedicine**, v.16, p.406–415, 2009.

GU, L.; KELM, M.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; CUNNINGHAM, D.; VANNOZZI, S. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normalphase HPLC_MS fluorescent detection method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4852–4860, 2002.

HAOUEM, S.; NAJJAR, M.; HANI, A.; SAKLY, R. Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.59, p.307–311, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *The American Journal of Medicine*, 91, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd Ed. ed.). New York: Oxford University Press. 50, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, p. 231-255, 2004.

HENGSTLER, J.G.; BOLM-AUDORFF, U.; FALDUM, A.; JANSSEN, K.; REIFENRATH, M.; GOTTE, W.; JUNG, D.; MAYER-POPKEN, O.; FUCHS, J.; GEBHARD, S.; BIENFAIT, H.G.; SCHLINK, K.; DIETRICH, C.; FAUST, D.; EPE, B.; OESCH, F. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, v.24, p.63-73, 2003.

HU, C.; ZAWISTOWSKI, J.; LING, W.; KITTS, D. D. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.5271-5277, 2003.

HU, H. Exposure to metals. *Prim. Care*, v. 27, p.983-996, 2000.

International Agency for Research on Cancer Monographs Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Industry, v. 58, IARC, p. 119-238, 1993.

INABA, T.; KOBAYASHI, E.; SUWAZONO, Y.; UETANI, M.; OISHI, M.; NAKAGAWA, H.; NOGAWA, K. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicology Letters*, v.159, p.192-201, 2005.

JARUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER, C.G. Health effects of cadmium exposure- a review of the literature and risk estimate. *Scan. Work Environ. Health*, v. 24, p.1-51., 1998.

JARUP, L.; AKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 238, p.201-208, 2009.

JEPSON, R. G.; CRAIG, J. C. A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, v.51, p.738-745, 2007.

JIHEN, E.; IMED, M.; FATIMA, H.; ABDELHAMID, K. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation. *Food Chem. Toxicol.* v.46, p.3522-3527, 2008.

KÄHKÄONEN, M. P.; HEINÄMÄKI, J.; OLLILAINEN V.; HEINONEN, M. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agric.*, v. 83, p.1403-1411, 2003.

KAJI, M. Role of experts and public participation in pollution control: the case of Itai-itai disease in Japan. *Ethics Sci Environ Polit*, v.12, p. 99-111, 2012.

KALT, W.; JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B. Blueberries and human health: a review of current research. *Journal of the American Pomological Society*, v.61, p.151-160, 2007.

- KAMEI, H.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M.; KOIDE, T.; UMEDA, T.; YUKAWA, T. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. **Cancer Investigation**, v.13, p.590–594, 1995.
- KLAASSEN, C.D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity, **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.39, p.267–294, 1999.
- KLIMISCH, H.-J. Lung deposition, lung clearance and renal accumulation of inhaled cadmium chloride and cadmium sulphide in rats. **Toxicology**, v.84, p. 103-124, 1993.
- KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v.711 p.193–201, 2011.
- LIU, J.; Qu, W.; Kadiiska, M. B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.238, p.209–214, 2009.
- LOPEZ, E.; ARCE, C.; OSET-GASQUE, M.J.; CANADAS, S.; GONZALEZ, M.P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. **Free Radic. Biol. Med.**, v.40, p.940–951, 2006.
- MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. **Indian Journal of Medical Research**, v.129, p. 357-367, 2009.
- MARKIDES, P. Anthocyanins as Food Colors. London: Academic Press., 1982.
- MASSÁNYI, P.; LUKÁČ, N.; UHRÍN, V.; TOMAN, R.; PIVKO, J.; RAFAY, J.; FORGÁCS, Z.; SOMOSY, Z. Female reproductive toxicology of cadmium. **Acta Biol. Hung.**, v.58, p.287–299, 2007.
- MATSUMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; TACHIBANAKI, S.; KAWAMURA, S.; HIRAYAMA, M. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3560–3563, 2003.
- MOLAN, A.L.; LILA, M.A.; MAWSON, J. Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1039–1044, 2008.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p.109-122, 2006.
- NAMPOOTHIRI, L. P.; GUPTA, S. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: A cellular model for ovarian toxicity. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 179–185, 2007.
- NETO, C. C. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. **Mol. Nutr. Food Res.** v.51, p.652–664, 2007.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, p.503–515, 2010.

OGNJANOVIĆ, B.; MARKOVIĆ, S.; ĐORĐEVIĆ, N., TRBOJEVIĆ, I., ŠTAJN, A.; SAIČIĆ, Z. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. **Reproductive Toxicology**, v.29, p. 191-197, 2010.

PAKSY, K.; VAGRA, B.; LAZAR P. Cadmium interferes with steroid biosynthesis in rat granulosa and luteal cells in vitro. **Biometals**, v.5, p.245–252, 1992.

PAKSY, K.; RAJCZY, K.; FORGÁCS, Z.; LÁZÁR, P.; BERNARD, A.; GÁTI, I.; KAÁLI, G.S. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. **J. Appl. Toxicol.**, v.17, p.321–327, 1997.

PIASEK, M.; LASKEY, J.W. Effects of in vitro cadmium exposure on ovarian steroidogenesis in rats. **J. Appl. Toxicol.**, v.19, p. 211–217, 1999.

PIASEK, M.; LASKEY, J.W.; KOSTIAL, R.K.; BLANUSA, M. Assessment of steroid disruption using cultures of whole ovary and/or placenta in rat and in human placental tissue. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v.75, p.36–44, 2002.

PREDKY, P. F. AND B. SARKAR. Effect of replacement of “zinc finger” zinc on estrogen receptor DNA interactions. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.5842–5846, 1994.

PRIOR, R. L.; LAZARUS, S. A.; CAO, G.; MUCCITELLI, H.; HAMMERSTONE, J. F. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/ mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1270– 1276, 2001.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am. J. Clin. Nutr.** v.78, p.570–578, 2003.

PUTAROV, T. C. Avaliação de fontes de selênio e seus efeitos no perfil metabólico e condição reprodutiva de cães. Dissertação de mestrado, Universidades Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2010.

RASEIRA, M. C. B; ANTUNES, L.E.C. A cultura do mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 121), p.69, 2004.

RAY, P.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v.24, p.981-990, 2012.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. D. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v.339, p.1523–1526, 1992.

ROCHA, J.B.T., SARAIVA, R.A., GARCIA, S.C., GRAVINA, F.S., NOGUEIRA, C.W. Aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicol. Res.** v.1, p.85-102, 2012.

- SANTOS, F. W., ORO, T., ZENI, G., ROCHA, J. B., NASCIMENTO, P. C., & W. NOGUEIRA, C. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicology Letters**, v.152, p. 255–263, 2004.
- SALEH, I.A.; SHINWARI, N.; MASHHOUR, A.; MOHAMED, G. E. D.; RABAH, A. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v.214, p.79–101, 2011.
- SCHWARTZE, E.W.; ALSBERG, C.L. Studies on the pharmacology of cadmium and zinc with particular reference to emesis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 21, p.1–22, 1923.
- SILVA, S. D. A.; ANTUNES, L. E. C.; ANTHONISEN, E. G.; LEMÕES, J. S.; GONÇALVES, E. D. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 30, n. 1, p. 180-184, 2008
- SIES, H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. **The American Journal of Medicine**, v.91, p. 31-38, 1991.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v.215, p.213-219, 1993.
- SOARES M.B.; IZAGUIRRY A.P.; VARGAS L.M.; MENDEZ A.S.L.; SPIAZZI C.C.; SANTOS F.W. Catechins are not major components responsible for the beneficial effect of *Camellia sinensis* on the ovarian d-ALA-D activity inhibited by cadmium. *Food Chem. Toxicol.* v.55, p.463–469, 2013.
- STEPHENS, G.A. Cadmium poisoning. **J. Ind. Hyg.**; v.2, p.129, 1920.
- STOHS S. J.; BAGCHI D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radic Biol Med**, v.18, 321–336, 1995.
- STOHS S. J.; BAGCHI D; BAGCHI M. Toxicity of trace elements in tobacco smoke. **Inhal Toxicol**, v.9, p.867–890, 1997.
- STRIK, B. Blueberry: an expanding world crop. **Chronica Horticulturae**, v.45, p.7-12, 2005.
- STRIK, B.C. Horticultural practices of growing highbush blueberries in the ever-expanding U.S. and global scene. **Journal of the American Pomological Society**, v.61, p.148-150, 2007.
- TATE, P.; KUZMAR, A.; SMITH, S. W.; WEDGE, D. E.; LARCOM, L. L. Comparative effects of eight varieties of blackberry on mutagenesis. **Nutrition Research**, v.23, p.971–979, 2003.
- THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p.304–315, 2008.

TREHANE, J. Blueberries, cranberries and other vacciniiums. **Cambridge: Timber Press**, p.256, 2004.

TRINCHELLA, F.; RIGGIO, M.; FILOSA,S.; VOLPE, M. G.; PARISI, E.; SCUDIERO, R. Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.144, p.272–278, 2006.

VARGA, B.; ZSOLNAI, B.; PAKSY, K.; NÁRAY, M.; UNGVÁRY G. Age dependent accumulation of cadmium in the human ovary. **Reprod. Toxicol.**, v.7, n.3, p.225–228, 1993.

VARGAS, L. M.; SOARES, M. B.; IZAGUIRRY, A. P.; LÜDTKE, D. S.; BRAGA, H. C.; SAVEGNAGO, L.; WOLLENHAUPT, S.; BRUM, D. S.; LEIVAS, F. G.; SANTOS, F. W. Cadmium inhibits the ovary δ -aminolevulinate dehydratase activity in vitro and ex vivo: Protective role of seleno-furanoside. **J. Appl. Toxicol.**, v.33, p.679–684, 2013.

VIHKO P.; ISOMAA V.; GHOSH D. Structure and function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2. **Mol. Cell Endocrinol.** v.171, p.71–76, 2001.

ZHANG, Z., KOU, X., FUGAL, K., & MCLAUGHLIN, J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.688–691, 2004.

ZHANG, W.; JIA, H. Effect and mechanism of cadmium on the progesterone synthesis of ovaries. **Toxicology**, v. 239, p. 204–212, 2007.

ZHANG, W., PANG, F., HUANG, Y., YAN, P., LIN, W. Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. **Toxicol. Letters**, v.182, p.18–23, 2008.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research**, v.533, p. 107-120, 2003.

WANG, J.; MAZZA, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN γ - activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.850–857, 2002.

WENNEBERG, A. Neurotoxic effects of selected metals. **Scand. J. Work Environ. Health**, v.20, p.65–71, 1994.

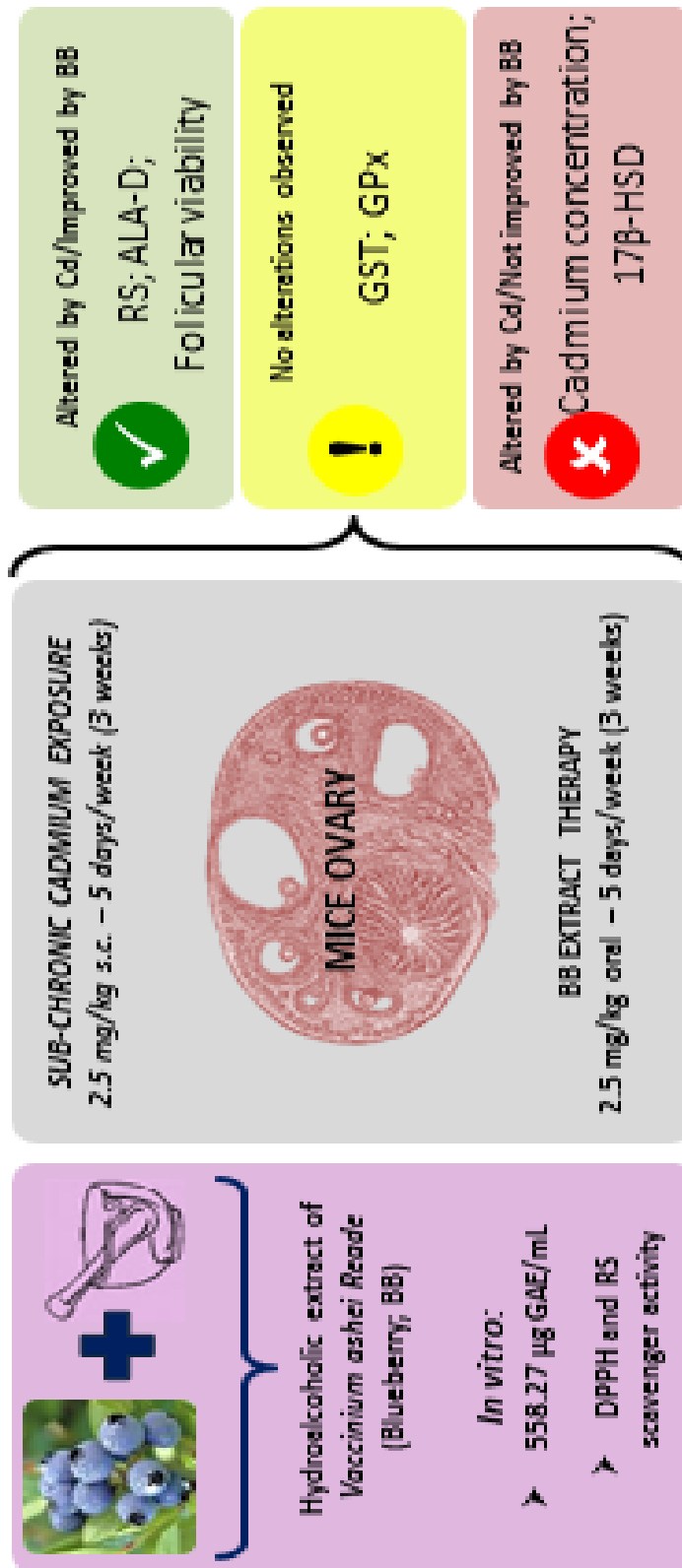
WHO. Cadmium (Environmental Health Criteria No. 134). Geneva: WHO, 1992.

WHO. World Health Organization, Preventing Disease Throught Healthy Environments. *Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern*. Geneva: World Health Organization. 2010.

WHO, World Health Organization, Chemical Fact Sheets: Guidelines for Drinking-Water Quality, fourth ed. World Health Organization, Geneva. 2011.

YI, W.; FISCHER, J.; KREWER, G.; AKOH, C. C. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p7320–p7329, 2005.

APÊNDICE A – Esquema representativo dos resultados



ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.648, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413-4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

Data: 24 de Abril de 2013

PROCOLO N° 045/2012

Pesquisador: FRANCIELLI WEBER SANTOS CIBIN

Campus: URUGUAIANA

Telefone: (55) 99688269

Título: EFEITO DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA REPRODUTIVO E PAPEL PROTETOR DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

E-mail: francielliweber@yahoo.com.br

Após a análise detalhada do projeto de pesquisa a relatoria do CEUA-Unipampa emite parecer **FAVORÁVEL** para o cadastro do protocolo e execução do referido projeto

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luiz E. Henkes'.

Luiz E. Henkes
Professor Adjunto
Coordenador do CEUA/Unipampa

ANEXO B – Carta de submissão do artigo à revista Food and Chemical Toxicology

Enc: A manuscript number has been assigned: FCT-D-13-01338

Entrada

Francielli Weber Santos fw@unipampa.edu.br
para mim

Inglês > português Traduzir mensagem

Profa. Francielli Weber Santos Cibin
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA
Campus de Urugualana
Fone: 55 34134321

----- Mensagem encaminhada -----

De: Food and Chemical Toxicology <fct@elsevier.com>
Para: francielliweber@yahoo.com.br; franciellibin@unipampa.edu.br
Enviadas: Sábado, 6 de Julho de 2013 11:13
Assunto: A manuscript number has been assigned: FCT-D-13-01338

Ms. Ref. No.: FCT-D-13-01338
Title: Blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) ameliorates ovarian damage induced by sub-chronic cadmium exposure in mice
Food and Chemical Toxicology

Dear Dr. Santos,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number FCT-D-13-01338 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made.

To track the progress of your manuscript, please log in to <http://ees.elsevier.com/fct> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Your username is: francielliweber@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/fct/automail_query.asp.

Thank you for submitting your manuscript to Food and Chemical Toxicology.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Food and Chemical Toxicology